

IMPORTANCIA DEL DIAGNOSTICO FRENTE A LAS ENFERMEDADES EMERGENTES

*José Darío Mogollón DMV PhD, María Antonia Rincón M. DMV MsC
Universidad Nacional de Colombia – Instituto Colombiano Agropecuario ICA*

Introducción

Como en todo proceso biológico, las enfermedades en las poblaciones porcinas han continuado evolucionando. Hacia finales de los 90, varios países de Europa se vieron afectados por la reaparición de enfermedades como la Fiebre Aftosa y la Peste Porcina Clásica las cuales fueron controladas y erradicadas después de enormes repercusiones económicas. En Norteamérica, algunas de las enfermedades endémicas han sido erradicadas o controladas hasta reducir su impacto como en el caso de la Disentería porcina, la Rinitis Atrófica o la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina.

Colateralmente, la industria implemento cambios tecnológicos como el incremento en el tamaño de las explotaciones y la intensificación de la producción. Uno de los más notables es la adopción bastante generalizada tanto en países desarrollados como en vía de desarrollo, de las técnicas de producción de alta salud que han conllevado a resultados positivos en los parámetros productivos de crecimiento – finalización.

No obstante, estos sistemas de producción porcina moderna han creado de forma inadvertida condiciones apropiadas como altas densidades y patrones de flujo de los animales que facilitan la transmisión de los agentes infecciosos de animales infectados a susceptibles y la evolución los microorganismos hasta alcanzar mayor virulencia sin causar enfermedad clínica (2).

Este último hecho se ha asociado con la reaparición de problemas sanitario causados por habitantes normales de las mucosas del cerdo como el Haemophilus parasuis (poliserositis), Streptococcus suis (meningitis) y Actinobacillus suis, los cuales raras veces causaban enfermedad severa. También ha ocurrido la emergencia de nuevos síndromes, la mayoría asociados a enfermedades virales causando significativas pérdidas económicas en la industria tales como el PRRS, enfermedades Asociadas a Circovirus tipo 2 (PCV-2) y la Influenza porcina (9).

En este nuevo escenario también se ha venido observando un aumento en la mortalidad en el periodo de crecimiento – finalización. Hasta hace pocos años, una mortalidad de 2 – 3% en el engorde o en los destetes se consideraba un mal resultado pero en algunos países de Europa porcentajes menores del 5% son satisfactorios.

Analizando la tendencia actual de la mortalidad tanto en Estados Unidos como en Europa se aprecia un incremento ascendente alrededor del 7 – 8% lo cual se ha relacionado con los profundos cambios en la genética. Frente a un desafío, el genotipo magro registra reducción en el desempeño e incremento de la tasa de mortalidad (1).

La emergencia de enfermedades, los cambios en los flujos de producción y la dinámica de las infecciones crearon una compleja interacción entre agentes infecciosos virales y bacterianos ocasionando severos problemas de tipo respiratorio o entérico, lo cual implica que se deba entender la dinámica de las enfermedades en las diferentes fases de producción para diseñar los planes estratégicos de prevención y control (8).

El control de estos complejos comienza con un diagnóstico preciso. En muchos casos esos patógenos virales o bacterianos son indistinguibles mediante la evaluación de los signos clínicos o de las lesiones macroscópicas y por consiguiente se necesita identificar por medio de métodos de laboratorio los agentes participantes para luego establecer el rol que pueda estar desempeñado cada uno dentro del problema en cuestión.

Estrategias de diagnóstico y estudio de las enfermedades emergentes

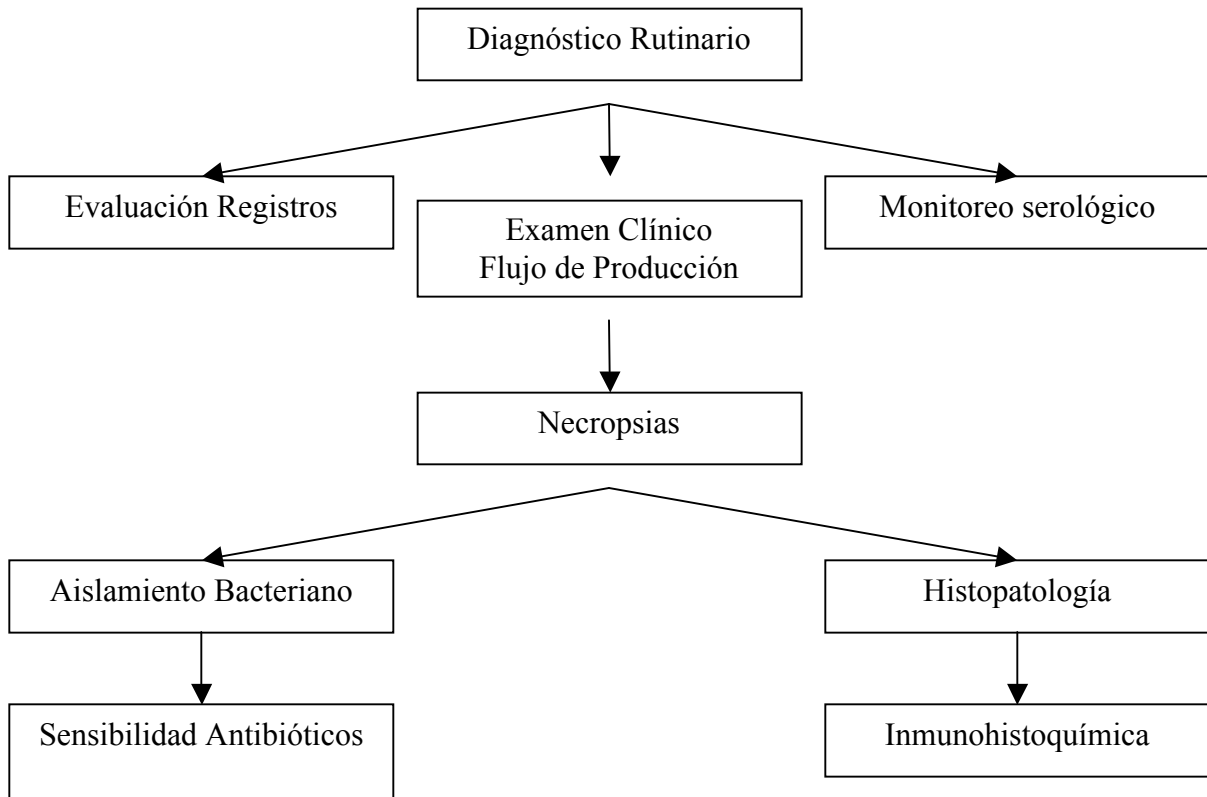
La vieja percepción sobre las enfermedades infecciosas en la cual la exposición a un agente infeccioso inevitablemente conducía a enfermedad ha sido cuestionada por ser una descripción simplista. En el caso de las poblaciones porcinas no todos los individuos responden de igual manera frente a un agente infeccioso y ocurre una interacción multifacética entre el microorganismo y el cerdo la cual puede resultar en la eliminación del microbio, en la generación de portadores asintomáticos o en la expresión clínica de la infección. Ahora bien, el resultado depende del estado inmunológico de la población (y de los individuos), de la carga antigénica y de las características de virulencia de la cepa.

Los patrones epidemiológicos de las enfermedades varían dentro y entre las explotaciones porque las bacterias y los virus cambian y porque los sistemas de producción intensivos y su entorno crean nuevas oportunidades para la aparición de nuevos agentes infecciosos. En general, es muy difícil estar completamente seguros que una enfermedad en particular es completamente nueva en la población porcina en el sentido que se diagnóstico por primera vez o que se trata de un patógeno que ha estado por mucho tiempo en la población y a resurgido como un causante de enfermedad.

Uso de los métodos de diagnóstico rutinario

Debido a su complejidad, el diagnóstico de las enfermedades respiratorias y entéricas de los porcinos es un continuo desafío. En términos prácticos, el principal objetivo es determinar que agente (s) infeccioso (s) circulan en la línea de producción o en el pie de cría. El proceso rutinario de diagnóstico debe incluir (Figura 1):

Figura 1. Diagnóstico de las enfermedades emergentes.
Uso de los métodos de diagnóstico Rutinario



Evaluación de los registros de producción

Estos ayudan a identificar el periodo de tiempo en el cual la población porcina en estudio viene siendo afectada. (por la sintomatología clínica). Es conveniente efectuar un seguimiento en los momentos de aplicación (diaria individual) de antibióticos, evaluar las curvas o registros de mortalidad acumulada por semana en la línea de producción y caracterizar esa mortalidad por: edad, sexo y peso de los animales afectados, etc.

Dentro de las comparaciones que se deben hacer entre los lotes de animales existentes en las diferentes fases del ciclo de producción esta el origen de los animales, flujo de los animales (traslados, reagrupamientos), tipo de instalaciones (flujo continuo, tres sitios o multisitios, TD – TDF), sistema de manejo zootécnico (densidad, higiene, desinfección, vacío sanitario), ventilación natural o ambiente controlado, etc. También es importante, determinar las características del sistema de aclimatación de hembras y reproductores de reemplazo y el tiempo de aislamiento y recuperación. Una vez se detecta el punto o

momento crítico en el cual está ocurriendo el brote en la línea de producción, se pueden muestrear varios animales, 2 a 3 semanas antes del inicio del problema para confirmar el diagnóstico.

Si la problemática incluye alteraciones reproductivas es conveniente analizar el tamaño de las camadas, el porcentaje de nacidos muertos, el porcentaje de momias y abortos, la edad de las hembras afectadas (jóvenes o viejas) y la fase de la gestación comprometida.

Selección de los animales para muestreo

La selección adecuada de los animales para exámenes de rutina ya sea para necropsia o serología es el paso más importante para realizar un diagnóstico preciso y oportuno.

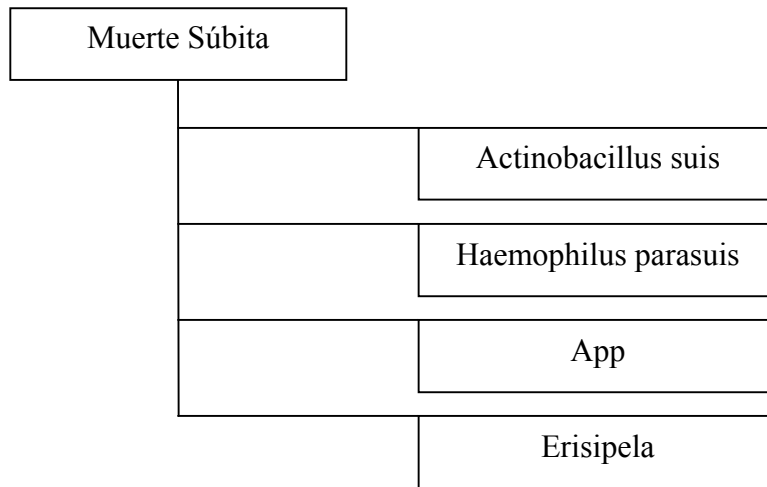
La evaluación clínica de las diferentes fases del ciclo de producción es determinante para establecer el tipo de sintomatología existente en los animales afectados (por ejemplo: signos respiratorios, digestivos, nerviosos o sistémicos), sin embargo se debe tener en cuenta que muchos de esos signos son inespecíficos y que se requiere realizar un diagnóstico diferencial (Figura 2).

Se debe tomar un tiempo prudencial observando los cerdos y obteniendo una historia clínica completa antes del sacrificio de los animales y la colección de las muestras. Es claro que el muestreo de cerdos encontrados muertos o que lleven varios días o semanas con tratamiento con antibióticos no son los más adecuados si el propósito es aislar una bacteria (ie: *Haemophilus parasuis*). Igualmente, el análisis de animales crónicamente enfermos, en mal estado corporal (colas) puede desviar el diagnóstico hacia el aislamiento de patógenos oportunistas o secundarios y hacia la descripción de lesiones histopatológicas en resolución del problema que nada tienen que ver con los agentes primarios. (6)

En ocasiones, es necesario realizar un muestreo en diferentes intervalos de tiempo para detectar todos los agentes participantes principalmente cuando la situación de campo es muy compleja como en el caso de enfermedades respiratorias. La mejor opción es seleccionar animales para necropsia en la fase aguda del problema.

Como en la mayoría de los casos la progresión de la enfermedad no es uniforme se requiere evaluar varios lotes de animales para registrar el mayor número de signos clínicos y lesiones sobre todo en enfermedades que impactan varios órganos y/o tejidos como sería el caso de las enfermedades sistémicas del cerdo y las asociadas al PCV-2 de tal forma que es necesario seleccionar y sacrificar como mínimo 5 a 10 animales para obtener un diagnóstico poblacional.

Figura 2. Diagnóstico diferencial de ciertas enfermedades emergentes que producen muerte súbita.



Exámenes de necropsia

Para obtener un diagnóstico patológico presuntivo y tratar de establecer la causa (s) de los signos clínicos observables es conveniente realizar la necropsia de cerdos con diferentes edades en el mismo día de la visita. Este proceso de estratificación de necropsias puede ofrecer una visión rápida del flujo temporal del agente infeccioso a través del sistema de producción.

En los sistemas de producción grandes y de multisitios dilucidar las causas de mortalidad es de gran relevancia. En este caso se pueden realizar auditorias de necropsia examinando un gran número de animales a través de todo el sistema con el fin de coleccionar la mayor cantidad de información en un corto periodo de tiempo. Este proceso de auditorias permite determinar la prevalencia de una enfermedad a través del tiempo (ejemplo, poliserositis en el destete o a comienzos del crecimiento).

Histopatología

Una vez realizada la necropsia de animales afectados se debe tomar fragmentos de tejido de los órganos que presenten lesiones o que se relacionen con los signos clínicos. Estos se deben fijar en formalina bufferada al 10%. El examen de las lesiones histopatológicas y su distribución es fundamental para establecer un diagnóstico presuntivo. La detección del antígeno por medio de la Inmunohistoquímica asociado a lesiones en los tejidos ayuda a confirmar el diagnóstico microscópico así como el aislamiento viral o bacteriano. En ciertos casos, como en las lesiones asociadas al PCV2 se aplica la Hibridación "In - situ" para detectar el ácido nucleico viral pero esta técnica no está siempre disponible en todos los laboratorios de diagnóstico.

Aislamiento Bacteriano

Para efectos diagnósticos, el organismo debe aislarse de tejidos afectados o lesionados relacionados con la enfermedad y no de tejidos sanos. En el caso de bacterias asociadas a mucosas como el *Actinobacillus suis* (*A. suis*), *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*) o el *Streptococcus suis* (*S. suis*), se pueden aislar de la cavidad nasal y las amígdalas en animales sanos. Los aislamientos de *H. parasuis* tienen significado diagnóstico cuando se obtienen de meninges, pleura, pericardio, peritoneo, hígado, bazo y articulaciones y en el caso del *S. suis* cuando provienen de encéfalo, líquido cefalorraquídeo y articulaciones. En casos de enfermedad relacionada con *A. suis* este se puede aislar de pleuritis fibrinosa o de pulmones con necrosis y hemorragia y también de sitios sistémicos como bazo, hígado, riñón o ganglios linfáticos. Estos aislamientos deben someterse a pruebas de susceptibilidad de los antibióticos por medio de pruebas de difusión en gel o microdilución con el propósito de diseñar una posible estrategia de tratamiento (6, 7).

Monitoreo serológico

El monitoreo serológico por medio de un muestreo estratificado o longitudinal es útil para establecer la dinámica de los patógenos circulantes de acuerdo con el flujo de los animales. Este tipo de estudio ayuda a revelar el momento en que ocurre la infección o en que etapa de producción persiste el agente infeccioso.

Esta metodología nos permite evaluar el pasado histórico de la enfermedad en la población y conocer si la población ha estado expuesta a un agente infeccioso en particular. Se debe tener en cuenta que ciertas infecciones emergentes son en su mayoría subclínicas y esta sería una forma de reconocer su presencia.

Uso de los métodos de diagnóstico especializado

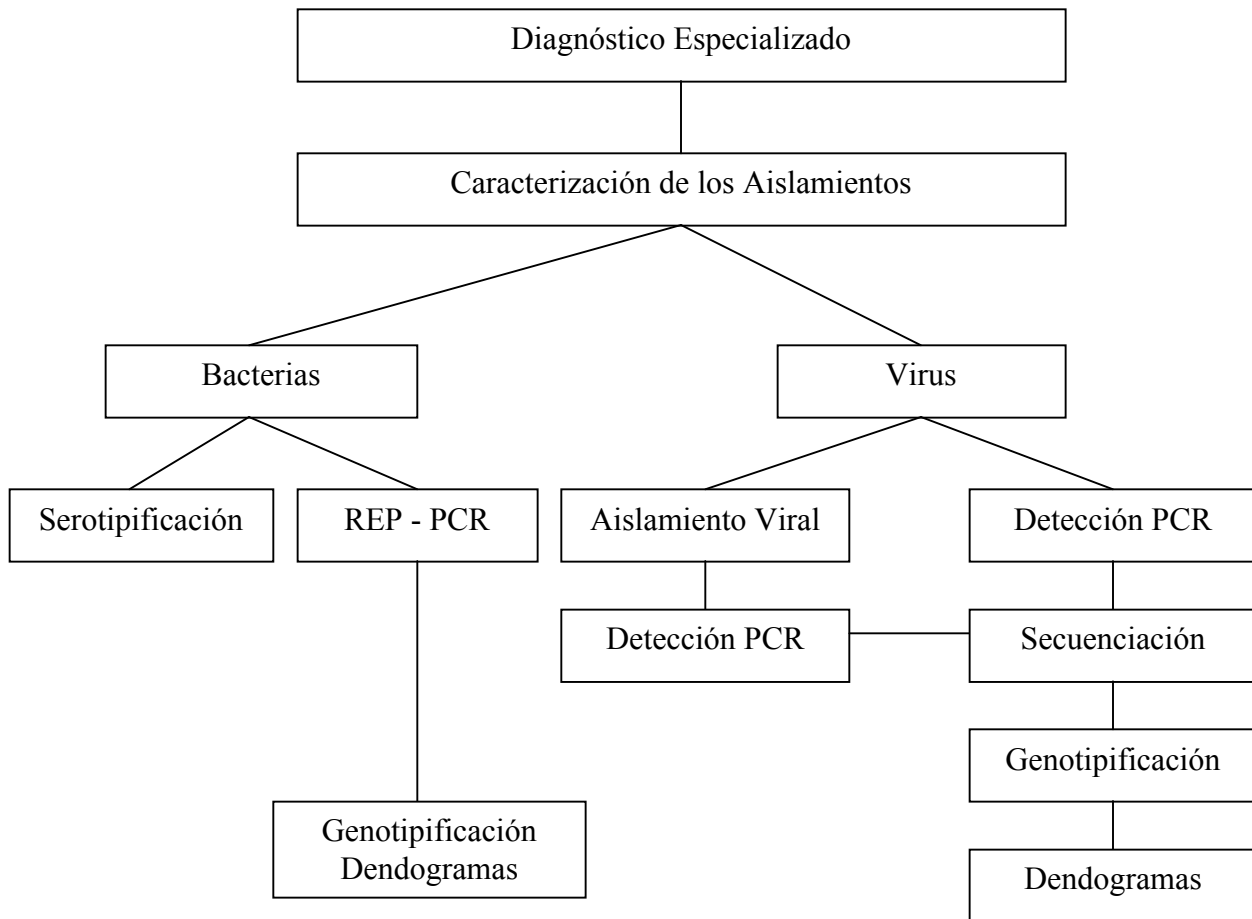
En las poblaciones porcinas existen muchos organismos ubicuos como por ejemplo la *Escherichia coli* para los cuales no es suficiente su detección del agente, sino que es necesario caracterizarlo desde el punto de vista fenotípico y genotípico para determinar ciertos rasgos patogénicos. En el caso de los virus emergentes ubicuos como el Circovirus Porcino tipo 2 PCV2 se requiere no solo detectar las lesiones microscópicas típicas de la enfermedad sino también estimar la carga (cantidad) de virus y su distribución en el tejido afectado (11).

Muchos de los agentes infecciosos emergentes (virales o bacterianos) tienen una considerable diversidad genética y la información obtenida mediante la genotipificación permite conocer las cepas prevalentes en la granja, en la zona o en el país de tal forma que pueden ser utilizadas para la elaboración de bacterinas como en el caso de *H. parasuis* o *S. suis* (Figura 3), también para la selección de vacunas virales comerciales o para la producción de biológicos con cepas virales autóctonas.

Por otro lado, en condiciones de campo se presenta una compleja interrelación entre los agentes infecciosos, algunos de los cuales anteceden la aparición de otros y potencializan

su efecto patógeno como en el caso de la combinación de *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Pasteurella multocida* que puede aumentar la severidad de las lesiones producidas por PCV2 en el pulmón (8), circunstancias en las cuales debe aplicarse no solo métodos de diagnósticos rutinarios sino también complementarlos con especializados para determinar y caracterizar todos los agentes participantes (7).

Figura 3. Diagnóstico de las enfermedades emergentes
Uso de los métodos de diagnóstico especializado



Aislamiento viral

Durante el proceso de necropsia se toman las muestras de tejidos (por ejemplo tejido linfoide, bazo, ganglios linfáticos, amígdala) o los hisopos (traquéales) necesarios para llevar a cabo el aislamiento viral en cultivos celulares o huevos embrionados (Influenza aviar). Una vez se aísla el virus se identifica su presencia por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Hemaglutinación .Inmunofluorescencia o Inmunoperoxidasa según el caso y luego se tipifica.

Serotipificación

Cuando se estudia la presencia de bacterias emergentes como el *H. parasuis* o el *S. suis* se requiere en lo posible fuera de su aislamiento, la tipificación puesto que existen 15 y 35 serotipos diferentes respectivamente. La serotipificación proporciona cierta información antigénica del aislamiento que junto con la genotipificación ayuda en el diseño de un plan de control. (6, 10)

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La detección de fragmentos del ácido nucleico del virus del PRRS por medio de RT – PCR se usa comúnmente en muestras como suero, semen y tejidos de animales afectados (empleando cebadores dirigidos contra el marco de lectura ORF7). En el caso de los virus Influenza tipo A, la detección del gen de la nucleoproteína en pulmones afectados por medio de la técnica RT– PCR tiene una alta sensibilidad y especificidad, no requiere de virus vivo, es rápida y la relación costo beneficio es excelente. (3)

Dentro de las bacterias de difícil crecimiento como el *H. parasuis* la PCR es una buena herramienta para la detección de ADN en exudado fibrinoso de la pleura, pericardio, peritoneo, bazo, articulaciones y meninges.

En organismos ubicuos como el PCV2, el PCR cualitativo solo determina que el cerdo ha estado expuesto al virus y no ofrece gran ayuda diagnóstica para diferenciar entre la enfermedad asociada a Circovirus (PMWS) y la infección con PCV2 puesto que prácticamente todos los cerdos están infectados al sacrificio. En contraste, el uso de PCR en tiempo real permite cuantificar la carga viral en el suero de un animal y ayuda a predecir si un animal tiene o va a desarrollar PMWS pero su uso rutinario no es práctico y solo se indica en procesos de investigación.

Genotipificación

Esta es una herramienta epidemiológica muy valiosa y se puede usar para la vigilancia y el control de *H. parasuis*, *S. suis* y *A. suis*. Para este tipo de estudio se aplican métodos de biología molecular como ERIC – PCR cuya información generada, permite construir dendrogramas de acuerdo con la relación genética existente entre los aislamientos realizados en una granja o entre granjas y facilitando la selección de una cepa para la elaboración de vacunas (6, 7, 10). Generalmente, las cepas virulentas tienden a formar grupos homogéneos (genotipos) y tienen a colonizar tarde después del destete.

Secuenciación y relación filogenética

La secuenciación de nucleótidos de ciertos fragmentos del genoma del virus de la Influenza porcina o del PRRS, continúa siendo de gran importancia a medida que ocurren nuevos cambios o mutaciones virales.

Por ejemplo, existe variación genética entre los aislamientos de PRRS debido a eventos de mutación durante la replicación viral, los cuales a su vez le permiten al virus adaptarse o evolucionar a medida que ocurren cambios en el huésped o en el ambiente. Adicionalmente *In vivo* coexisten aislamientos como cuasiespecies. Por lo general se selecciona el marco de lectura ORF5 para la secuenciación parcial de nucleótidos de aislamientos del PRRS, pues esta es una de las regiones más variables del genoma. En el caso del virus de la influenza la secuenciación del gen de la Hemaglutinina permite discriminar los virus circulantes en una granja o un sistema de producción y facilita el seguimiento de los cambios genéticos que han ocurrido en un determinado periodo de tiempo los cuales se reflejan en propiedades antigénicas que el sistema inmune no puede reconocer eficientemente (3, 5).

Actualmente se conocen varias razones para determinar las secuencias de nucleótidos de aislamientos de PRRS o Influenza. Uno de los propósitos más frecuentes es diferenciar los aislamientos de campo de los virus vacunales. Otra de las razones básicas es establecer las cepas circulantes en un sistema de producción después de un diagnóstico inicial de la enfermedad. Además la evaluación periódica de las cepas presentes y su relación filogenética permite conocer si han aparecido nuevas cepas, o si más de una cepa está presente en un sistema de producción o una región geográfica. También esta metodología se puede usar para investigar el origen de un virus y cuando una nueva cepa se introdujo en el sistema de producción. (5)

Interpretación de resultados

El profesional que trabaja en los sistemas de producción porcina modernos debe tener las habilidades para observar y descubrir cuidadosamente las enfermedades. Debe correlacionar la historia, el examen clínico, los datos de los registros de producción y determinar cuando, como y cuales métodos de diagnóstico debe usar para dilucidar un problema de enfermedad emergente. Además, debe desarrollar la habilidad y el conocimiento para interpretar el significado de los resultados de laboratorio.

Es importante que también utilice los conocimientos de patología para formular un posible diagnóstico y al mismo tiempo para explicar mediante mecanismos básicos e hipótesis la participación de todos los factores que condujeron al proceso de enfermedad. Con base en análisis integral de la situación, se debe implementar los correctivos de manejo necesarios y proponer una estrategia de control y prevención.

Conclusiones

El enfoque moderno en el control de las enfermedades emergentes consiste en implementar sistemas de diagnóstico integral y de vigilancia epidemiológica que permitan detectar en forma temprana la aparición de estos problemas además de fortalecer las medidas de Bioseguridad tanto externas como internas para disminuir el riesgo potencial de su introducción en una población o sistema de producción porcino.

Referencias

1. Christianson W.T. The paradox of increasing mortality and health expenditures. Allen D. Leman conference proceedings 2006 pag 23 – 32.
2. Golberg T.L. An evolutionary view of disease emergence: Why and how organisms become pathogens, and implications for emerging disease. 37th AASV Proceedings 2006, pag 373 – 374.
3. Gramer M.R. Defining swine influenza virus. J. Swine health production 2005, 13(3) 157 – 160.
4. Gramer M. Respiratory Disease in the growing pigs: Selecting materials for submission and making the diagnosis. Allen D. Leman Conference proceedings. 2006, 33:47 – 51.
5. Kleiboeker S.B, Schommer S.K. Interpretation of PRRSV sequencing. Applying PRRS diagnostic tools. 36th AASV annual meeting seminar 2: 22 – 30.
6. Oliveira S, Pijoan C. Haemophilus parasuis: New trends and diagnosis, epidemiology and control. Vet. Microbiol. 2004, 94 – 1 -12.
7. Oliveira S. Actinobacillus suis. An update on genotyping and antibiotic susceptibility. Allen D. Leman Swine conference Proceedings 2006, 33:93 – 95.
8. Pallares F.J, Ospriessing P,G, Sorden S.D etal. Porcine Circovirus type 2 (PCV2) coinfections in US field cases of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS). J. Vet Diag Invest 2002, 19: 515 – 519.
9. Pijoan C, Torremorell M, Dee S. Pig Health and production – past, present, future. 18th IPVS Congress proceedings 2004 1: 1- 2.
10. Torremorell M, Calsamiglia M, Pijoan C. Colonization of suckling pigs by Streptococcus suis with particular reference to pathogenic serotype 2 strains can. J. Vet Res. 1992 62: 21 – 26.
11. Yaager M. Diagnosis of PCV-2 associated disease – A diagnostic pathologist perspective. 30th AASV proceedings. 2007, pag 519 – 523.