

ACTUALIZACIÓN DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA MEDIANTE MUESTRAS DE FLUIDOS ORALES

Jeffrey J. Zimmerman DVM PhD

College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames Iowa USA

INTRODUCCION

La premisa de esta discusión es que nosotros, los productores, veterinarios y especialistas de la salud del cerdo, necesitamos mejores datos sobre las enfermedades infecciosas para (1) apoyar la sanidad de cerdo y tomar de decisiones financieras (negocio) a nivel de piara, (2) informar sobre las condiciones de enfermedad de ámbito regional, y (3) acelerar el control de enfermedades en nuestros respectivos países.

Cada día en las granjas, veterinarios y productores porcinos toman decisiones de salud de la piara que afectan la rentabilidad. Frente a la incertidumbre, equilibrar sus decisiones entre el tamaño y la probabilidad de pérdidas económicas si las medidas preventivas son mantenidas vs. el costo de la prevención si no se produce la enfermedad. Estas decisiones pueden guiarse por la experiencia, consejos, rumores o tradición familiar, pero raramente por datos actualizados de salud específicos de la granja.

Cada día en oficinas alrededor del mundo, funcionarios de salud pública, funcionarios de salud animal, representantes de comercio y representantes electos, regulan, planean y responden a situaciones de salud animal utilizando datos obsoletos, fragmentados o inexactos de las enfermedades infecciosas.

Para tomar mejores decisiones, necesitamos mejores datos de las enfermedades infecciosas

Tenemos excelentes pruebas de diagnóstico, soberbios métodos analíticos (epidemiología, estadísticas, modelado, etc.) y personas altamente capacitadas que sabe cómo usar estas herramientas. Pero el costo de datos basados en la recopilación y prueba de diagnóstico de muestras "antiguas" (sangre, heces o hisopos nasales) es demasiado caro para traer a estos poderosos recursos al uso rutinario (Dohoo, 1993; James, 2005). Si queremos elevar el nivel de la resolución de enfermedades infecciosas al siguiente nivel, necesitamos una estrategia más eficiente para recopilar datos de enfermedades infecciosas de las poblaciones porcinas.

DESARROLLOS Y APLICACIONES EN HUMANOS

Diagnósticos basados en fluidos orales son relativamente nuevos en medicina veterinaria, pero se han utilizado ampliamente en diagnóstico en medicina humana, particularmente en los últimos 25 años (Prickett y Zimmerman, 2010). Descubrimientos relacionados con el VIH estimularon el desarrollo actual de diagnósticos basados en fluidos orales en medicina humana.

Específicamente, el aislamiento del VIH ("virus tipo III en células T leucémicas humanas") y la detección de anticuerpos de VIH en los fluidos orales (Archibald et al., 1986; Groopman et al., 1984) mostraron que los diagnósticos de VIH podrían basarse en fluidos orales en lugar de suero.

La mayoría de los actuales ensayos basados en fluidos orales para el diagnóstico de enfermedades infecciosas en los seres humanos está orientada en la detección de anticuerpos. Este enfoque es apoyado por una serie de descubrimientos que comenzaron con la demostración de proteínas séricas en fluidos orales humanos en 1960 (Ellison et al., 1960) y la presencia de esos anticuerpos en fluidos orales sólo si también estuvieron en el suero del individuo (Kraus y Konno, 1963). La prueba de movimiento de anticuerpos del suero a la cavidad oral fue proporcionada por Challacombe et al (1978), quien demostró que anticuerpos IgG, IgM y IgA marcados con radio isótopos que fueron inyectado en monos Rhesus fueron detectados en fluidos bucales poco después. La producción local de anticuerpos por células plasmáticas en las glándulas salivales y tejido linfóide asociado a los conductos (DALY) fue establecida también en esa época (Beckenkamp, 1985; Brandtzaeg, 1981, 1989; Crawford et al., 1975; Mestecky 1987, 1993; Morrier y Barsotti, 1990; Nair y Schoeder, 1986). Las células plasmáticas mostraron secretar IgA en saliva en conjunción con las células epiteliales ductales y acinares expresando receptores específicos para IgA. IgM e IgG también resultaron ser secretadas localmente, pero en menor concentración (Challacombe et al., 1997).

El éxito de diagnósticos de VIH en fluidos orales junto con otras mejoras en la tecnología de diagnóstico, ha provocado el desarrollo de una amplia variedad de ensayos para otras enfermedades infecciosas y no infecciosas, drogas, hormonas y marcadores de enfermedad (Mandel, 1993; Tabak, 2007). Este proceso es estimulado por el éxito de la adaptación de la tecnología de diagnóstico para la matriz de fluidos oral y el hecho de que los fluidos orales son fácilmente recogidos, tratados y almacenados (Chiappin et al., 2007). La facilidad de toma de muestras de fluido oral ha facilitado grandes estudios epidemiológicos sobre agentes infecciosos significativos, por ejemplo, VIH en África (Connolly et al., 2004; Fylkesnes y Kasumba, 1998) y Tailandia (Frerichs et al., 1994) y el sarampión en Europa (Ramsay et al., 1997), Etiopía (Nigatu et al., 2008), Brasil (de Azevedo Neto et al., 1995; Oliveira et al., 1998) y África (Ohuma et al., 2009).

DESARROLLOS EN SALUD PORCINA

La investigación en inmunología básica en cerdos refleja los hallazgos en otras especies y antígenos y/o anticuerpos específicos contra la mayoría de los patógenos de cerdos y se han reportado en fluidos orales de cerdo. Corthier (1976) describió por primera vez la detección de anticuerpos contra el virus de la fiebre porcina clásica (CSFV) en los fluidos orales porcinos. Trabajos posteriores demostraron que la inoculación intranasal o intramuscular con CSFV produce niveles detectables de anticuerpos en suero y fluidos orales (Corthier y Aynaud, 1977). En los cerdos infectados con *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), Loftager et al (1993) encontró que IgA fue detectable en fluidos orales antes de que aparecieran en suero y concluyó que un ensayo de IgA en líquido oral podría ser un método práctico para detectar una infección de APP. Además de CSFV y APP, una lista parcial de los agentes o anticuerpos en fluidos orales incluiría: virus de la peste porcina africana (Greig y Plowright, 1970), *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Bender et al, 2010), virus de fiebre aftosa (Eblé et al., 2004), virus de la Influenza tipo A (Detmer et al, 2011; Irwin et al., 2010; Romagosa et al, 2011), circovirus porcinos tipo 2 (Prickett et al., 2008a; Prickett et al, 2011), PRRSV (Kittawornrat et al., 2010; Prickett et al., 2008b), torque tenovirus (Pogranichniy et al., 2010; Ramírez et al., 2012), virus de la gastroenteritis transmisible (DeBuysscher y Berman, 1980) y el virus de la estomatitis vesicular (Stallnecht et al., 1999). Acumulativamente, estos informes sugieren que los fluidos orales podrían utilizarse para controlar una amplia gama de agentes infecciosos de la especie porcina.

APLICACIONES EN SALUD PORCINA

Colección de muestras Fluidos orales son fácilmente colectados de los cerdos suspendiendo una cuerda en una ubicación accesible (vídeo en <http://vetmed.iastate.edu/vdpam/disease-topics/oral-fluids>). La cuerda de algodón es recomendable porque es altamente absorbente y biodegradable. Las cuerdas son colgadas a la altura de los hombros del cerdo en un área limpia del corral por 20 a 30 minutos y los fluidos orales son recuperados de los cerdos cuando estos mastican la cuerda. Para extraer la muestra, el extremo inferior (húmedo) de la cuerda es insertado en una bolsa de plástico limpia y exprimido manualmente o mecánicamente. El líquido extraído es recuperado al cortar una esquina de la bolsa de plástico y verter el líquido en un tubo. El volumen de la muestra recogida depende de la edad y el número de cerdos que contribuyen a la muestra, pero Kittawornrat et al (2010) reportó un volumen de muestra media de aproximadamente 16 ml por animal en un estudio de PRRSV en individualmente alojados.

Analizando fluidos orales A la fecha, la mayoría de muestras de fluidos orales porcinos son analizadas por PCR debido a que ensayos para detección de anticuerpos

empiezan a estar disponibles. *Una advertencia: los ensayos de PCR deben optimizarse para la matriz de fluidos orales para evitar falsos resultados negativos. Asegúrese de que el laboratorio con que se trabaja ha realizado el proceso de validación*

Como ejemplo de monitoreo basado en PCR, Ramírez et al (2012) siguió ~ 12.150 cerdos en 10 áreas de destete-finalización de 10 granjas mediante fluidos orales recogidos y probados a intervalos de 2 semanas para PCV2, PRRSV, virus de la gripe A (IAV) y genogroups 1 (TTV1) y 2 (TTV2) de Torque tenovirus. El estudio concluyó que: (1) las muestras de fluidos orales podrían recogerse y enviarse al laboratorio por personal en el sitio y (2) el análisis de una variedad de parámetros de producción en el contexto de la circulación de patógeno podría proporcionar información oportuna para apoyar las intervenciones para prevenir, controlar, o eliminar a agentes infecciosos. Por lo tanto, un enfoque basado en la PCR puede eficientemente y eficazmente detectar la circulación de los agentes patógenos en granjas.

Más recientemente, los ensayos de anticuerpos se han adaptado a fluidos orales (Kittawornrat et al., 2012; Langenhorst et al., 2011). Basado en muestras de fluido orales positivas (n = 492) y negativas (n = 367), Kittawornrat et al (2012) estimaron que la sensibilidad y especificidad diagnóstica de una prueba de ELISA para detectar IgG contra PRRS en fluidos orales, utilizando un punto de corte ≥ 0.40 , fue 94,7% (IC 95%: 92.4, 96.5) y 100% (95% CI: 99.0, 100.0) respectivamente. Basándose en estos datos, se concluyó que esta prueba podría proporcionar un enfoque eficaz y rentable para el monitoreo rutinario de PRRSV en piaras comerciales y en programas de eliminación de PRRSV. Este ensayo se ha ofrecido en el laboratorio de diagnóstico de la Universidad Estatal de Iowa (ISU VDL) desde noviembre de 2011 y ha sido implementado o evaluado en laboratorios de diagnóstico que sirven a los productores de carne de cerdo en Canadá y Estados Unidos. Por supuesto, la exitosa adaptación de una prueba de ELISA sugiere que otros ensayos de anticuerpos para otros patógenos también podrían modificarse a fluidos orales.

La diferencia entre estos dos enfoques (monitoreos basados en PCR vs anticuerpos) reflejan las características de los ensayos. Mientras los ensayos basados en la PCR son útiles para detectar la circulación inmediata de agentes patógenos, los ensayos basados en anticuerpos son informativos sobre inmunidad de la pira y la historia de una infección en la población. Debido a que reflejan diferentes fases de la infección, se puede seleccionar la mejor prueba para la necesidad. Así, mas que la superioridad de una prueba, tener ambos ensayos proporciona mayor ventaja.

Aceptación de pruebas en fluidos orales Debido a su conveniencia, las muestras de fluidos orales se han

convertido en pruebas de rutina en muchas granjas en Estados Unidos. En VDL ISU, el tipo de muestra "fluidos orales porcinos" entró en el sistema de manejo de información de laboratorio en febrero de 2010. Durante el resto del 2010, se recibieron 10,329 muestras de fluido orales para pruebas. El número de muestras que se aumentó a 32,517 en 2011. En las primeras 6 semanas del 2012, el VDL ISU recibió 6.032 muestras de fluido orales para las pruebas. Si continúa este ritmo para el resto del año 2012, recibirán el laboratorio > 52.000 muestras de fluido orales. Por supuesto, el VDL ISU es sólo uno de varios laboratorios de diagnóstico en los Estados Unidos que proporcionan pruebas en fluidos orales a los veterinarios y productores de cerdos.

DESAFÍOS

Como cualquier tecnología en desarrollo, la implementación del diagnóstico basado en fluidos orales enfrenta desafíos. La más evidente es la falta de un completo paquete de ensayos diseñados para funcionar en fluidos orales. En particular, ensayos validados para la detección de CSFV, ASFV y FA mediante fluidos orales serían bienvenidos debido a la promesa de monitoreos epidemiológicos más baratos, más eficaces para estas enfermedades. La creación de nuevos ensayos es actualmente un área de investigación activa en diversos laboratorios de todo el mundo. Así, este problema debe ser resuelto a medida que investigadores desarrollen nuevos ensayos basados en fluidos orales.

Un desafío más sutil radica en la capacidad de monitoreo para generar datos. El poder de este enfoque es el potencial de generar un flujo semicontinuo de información en los planos nacionales, regional/área y de granjas. El reto radica en el hecho de que pocos laboratorios de diagnóstico están dispuestos a proporcionar resultados como conjuntos de datos longitudinales y pocos productores y veterinarios están capacitados para analizar estadísticamente esta información por determinar sus efectos sobre la salud y productividad, y entonces, tomar decisiones y diseños de intervención basados en estos análisis.

CONCLUSIONES

Si queremos elevar la resolución de las enfermedades infecciosas al siguiente nivel, necesitamos un proceso que permita coleccionar y analizar en forma barata un número suficiente de muestras a intervalos suficientemente frecuentes para capturar datos de enfermedades infecciosas en poblaciones de cerdos como un proceso de análisis y respuesta continuos. A nivel granja, la integración de datos de vigilancia con registros genealógicos proporcionará los medios para: (1) identificar la circulación de patógenos específicos; (2) cuantificar sus efectos sobre la salud y productividad del cerdo; (3) orientar las intervenciones a patógenos específicos y poblaciones; y (4) optimizar el momento de la intervención. A nivel regional, la vigilancia

epidemiológica basada en fluidos orales podría hacer programas de control más en "tiempo real", prácticos y asequibles. A nivel nacional, una infraestructura de vigilancia basada en ensayos optimizados para fluidos orales facilitará la rápida recopilación de datos para programas nacionales de control - eliminación o de contención/eliminación de enfermedades exóticas.

REFERENCIAS

- Archibald DW, Zon L, Groopman JE, et al. 1986. Antibodies to human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III) in saliva of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients and in persons at risk for AIDS. *Blood* 67:831-834.
- Beckenkamp G. 1985. Distribution pattern of the cellular oral immune system in the major and minor salivary glands, immunochemical findings. *HNO* 33:196-203.
- Bender JS, Shen HG, Irwin CK, et al. 2010. Characterization of *Erysipelothrix* species isolates from clinically affected pigs, environmental samples, and vaccine strains from six recent swine erysipelas outbreaks in the United States. *Clin Vaccine Immunol* 17:1605-1611.
- Brandtzaeg P. 1981. Transport models for secretory IgA and secretory IgM. *Clin Exp Immunol* 44:221-232.
- Brandtzaeg P. 1989. Salivary immunoglobulins. In: *Human saliva: clinical chemistry and microbiology*. CRC press, Boca Raton. p. 1-51.
- Challacombe S, Russel M, Hawkes J, et al. 1978. Passage of immunoglobulins from plasma to the oral cavity in rhesus monkeys. *Immunol* 35:923-931.
- Challacombe S, Rahman D, O'Hagan D. 1997. Salivary, gut, vaginal and nasal antibody responses after oral immunization with biodegradable microparticles. *Vaccine* 15:169-175.
- Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Paolo EF. 2007. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta* 383:30-40.
- Connolly C, Shisana O, Colvin M, Stoker D. 2004. Epidemiology of HIV in South Africa--results of a national, community-based survey. *S Afr Med J* 94:776-781.
- Corthier G, Aynaud J. 1977. Comparison of the immune response in serum and bucco-pharyngeal secretions following immunization by different routes with a live hog cholera virus vaccine Thiverval strain. *Ann Rech Vet* 8:159-165.
- Corthier G. 1976. Swine fever: influence of passive immunity on pig immune response following vaccination with a live virus vaccine (Thiverval strain). *Ann Rech Vet* 7:361-372.
- Crawford J, Taubman M, Smith D. 1975. Minor salivary glands as a major source of secretory immunoglobulin A in the human oral cavity. *Science* 190:1206-1209.
- DeBuysscher E, Berman D. 1980. Secretory immune response in intestinal mucosa and salivary gland after

- experimental infection of pigs with transmissible gastroenteritis virus. *Am J Vet Res* 41:1214-1220.
- de Azevedo Neto RS, Richards A, Nokes DJ, et al. 1995. Salivary antibody detection in epidemiological surveys: a pilot study after a mass vaccination campaign against rubella in São Paulo, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89:115-118.
- Detmer SE, Patnayak DP, Jiang Y, et al. 2011. Detection of influenza a virus in porcine oral fluid samples. *J Vet Diagn Invest* 23:241-247.
- Dohoo IR. 1993. Monitoring livestock health and production: Service - epidemiology's last frontier? *Prev Vet Med* 18:43-52.
- Eblé P, Bouma A, de Bruin M, et al. 2004. Vaccination of pigs two weeks before infection significantly reduces transmission of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 22:1372-1378.
- Ellison SA, Mashimo PA, Mandel ID. 1960. Immunochemical studies of human saliva. *Journal of Dental Research* 39:892-898.
- Feddes R, Fraser D. 1994. Non-nutritive chewing by pigs: implications for tail-biting and behavioral enrichment. *Trans ASAE* 37: 947-950.
- Frerichs RR, Silarug N, Eskes N, et al. 1994. Saliva-based HIV-antibody testing in Thailand. *AIDS* 8:885-894.
- Fylkesnes K, Kasumba K. 1998. The first Zambian population-based HIV survey: saliva-based testing is accurate and acceptable. *AIDS* 12:540-541.
- Greig A, Plowright W. 1970. The excretion of two virulent strains of African swine fever virus by domestic pigs. *J Hyg (Lond)* 68:673-682.
- Groopman J, Salahuddin S, Sarngadharan M, et al. 1984. HTLV-III in saliva of people with AIDS-related complex and healthy homosexual men at risk for AIDS. *Science* 226:447-449.
- Irwin CK, Prickett JR, Zimmerman J, et al. 2010. RT-PCR detection of H3N2 influenza virus in oral fluid samples from experimentally infected pigs. *Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians. Omaha, Nebraska, pp. 365-366.*
- James A. 2005. The state of veterinary epidemiology and economics. *Prev Vet Med* 67:91-99.
- Kittawornrat A, Prickett J, Chittick W, et al. 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: Will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance? *Virus Res* 154:170-176.
- Kittawornrat A, Zimmerman JJ. 2011. Toward a better understanding of pig behavior and pig welfare. *Anim Health Res Rev* 12:25-32.
- Kittawornrat A, Prickett J, Wang C, et al. 2012. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in oral fluid specimens using a commercial PRRSV serum antibody ELISA. *J Vet Diagn Invest* 24:262-269.
- Kraus F, Konno J. 1963. Antibodies in saliva. *Ann N Y Acad Sci* 106:311-329.
- Langenhorst RJ, Lawson S, Kittawornrat A, et al. 2012. Development of a fluorescence microsphere immunoassay for detection of PRRSV infection using oral fluid samples as an alternative to serum-based assays. *Clin Vaccine Immunol* 19:180-189.
- Loftager M, Eriksen L, Nielsen R. 1993. Antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in mucosal secretions and sera of infected pigs as demonstrated by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Res Vet Sci* 54:57-62.
- Mandel ID. 1993. Salivary diagnosis: promises, promises. *Ann N Y Acad Sci* 694:1-10.
- Mestecky J. 1987. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *Ann N Y Acad Sci* 7:265-276.
- Mestecky J. 1993. Saliva as a manifestation of the common mucosal immune system. *Ann N Y Acad Sci* 694:184-194.
- Millman T, Brooks R. Jr., Zimmerman J, Irwin C. 2009. Role of behavior in non-invasive disease surveillance of swine influenza virus. *J Anim Sci* 87 E-Suppl iii.
- Morrier J, Barsotti O. 1990. [Secretary IgA and the oral cavity: general review] <original> IgA sécrétoire et cavité buccale: revue générale. *Actualités Odonto-Stomatologiques* 44:349-364.
- Nair P, Schroeder H. 1986. Duct associated lymphoid tissues (DALT) of minor salivary glands and mucosal immunity. *Immunol* 57:171-180.
- Nigatu W, Nokes DJ, Enqueslassie F, et al. 1999. Detection of measles specific IgG in oral fluid using and FITC/anti-FITC IgG capture enzyme linked immunosorbent assay (GACELISA). *J Virol Methods* 83:135-144.
- Ohuma EO, Okiro EA, Bett A, et al. 2009. Evaluation of a measles vaccine campaign by oral-fluid surveys in a rural Kenyan district: interpretation of antibody prevalence data using mixture models. *Epidemiol Infect* 137:227-233.
- Oliveira SA, Siqueira MM, Brown DW, et al. 1998. Salivary diagnosis of measles for surveillance: a clinic-based study in Niterói, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92:636-638.
- Pogranichnyi RM, Prickett J, Main R, et al. 2010. Torque teno virus TTV in commercial wean-to-finish populations concurrently infected with PRRSV, PCV2 and influenza virus. *International Scientific and Practical Conference on "Modern systems of Biosecurity and Biosafety as the Basis for Infectious Diseases Control Strategy in Veterinary and Human Medicine."* Feodosia, Ukraine, pp. 52-53.
- Prickett J, Simer R, Christopher-Hennings J, et al. 2008b. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: A longitudinal study under experimental conditions. *J Vet Diagn Invest* 20:156-163.



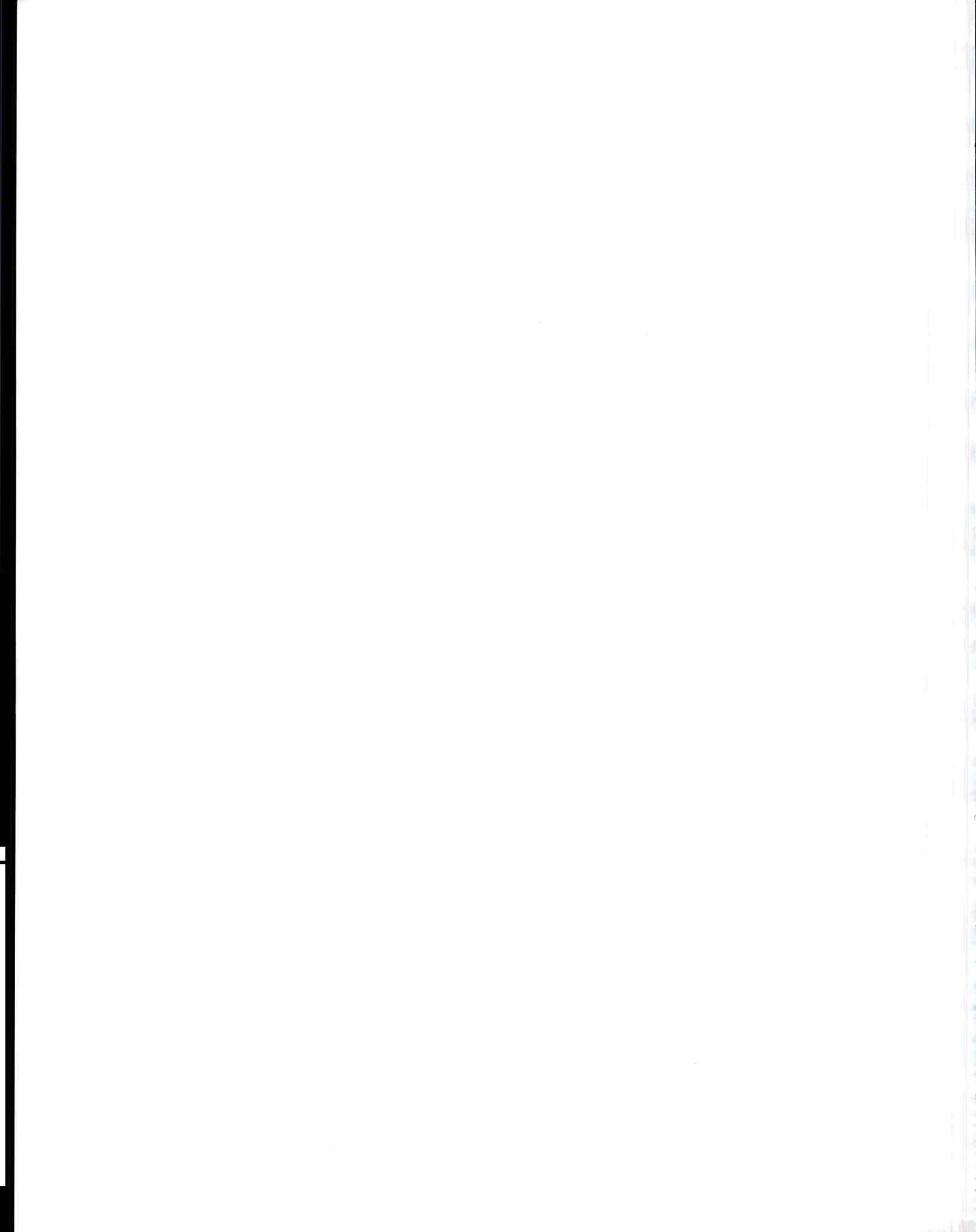
- Mejora ingesta alimenticia
- Reduce pérdida de peso al destete
- Lechones más pesados al destete



- Mejora el crecimiento del lechón
- Mejora conversión alimenticia

Visite www.ProfitablePigs.com para conocer más acerca de Levucell SB.

Para más información: **Lallemand Nutrición México, SA de CV**
Tel.: 045.833.155.80.96
e-Mail: bramirez@lallemand.com



Prickett J, Simer R, Yoon K-J, et al. 2008a. Surveillance of commercial growing pigs for PRRSV and PCV2 infections using pen-based oral fluid samples: A pilot study. *J Swine Health Prod* 16:86-91.

Prickett JR, Zimmerman JJ. 2010. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *Anim Health Res Rev* 11:207-216.

Prickett JR, Johnson J, Murtaugh MP, et al. 2011. Prolonged detection of PCV2 and anti-PCV2 antibody in oral fluids following experimental inoculation. *Transbound Emerg Dis* 58:121-127.

Ramirez A, Wang C, Prickett JR, et al. Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Prev Vet Med* 104:292-300.

Ramsay M, Brugha R, Brown D. 1997. Surveillance of measles in England and Wales: implications of a national saliva testing programme. *Bull World Health Organ* 75:515-521.

Romagosa A, Gramer M, Joo HS, Torremorell M. 2011. Sensitivity of oral fluids for detecting influenza A virus in populations of vaccinated and non-vaccinated pigs. *Influenza and Other Respiratory Viruses* DOI: 10.1111/j.1750-2659.2011.00276.x.

Stallknecht D, Howerth E, Reeves C, Seal B. 1999. Potential for contact and mechanical vector transmission of vesicular stomatitis virus New Jersey in pigs. *Am J Vet Res* 60:43-48.

Tabak LA. 2007. Point-of-care diagnostics enter the mouth. *Ann N Y Acad Sci* 1098:7-14.

Zonderland J, Vermeer M, Vereijken G and Spolder M. 2001. Measuring a pig's preference for suspended toys by using an automated recording technique. In: *Proceedings of the International Symposium of the C.I.G.R. Animal Welfare Considerations in Livestock Housing Systems, 2nd Technical Section, Technical University of Zielona Góra, Poland*, pp. 147-156.

XLVII Congreso Nacional AMVEC 2012

Comentarios:

