

EL DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO DE LAS ENFERMEDADES SUBCLÍNICAS DEL CERDO. REALIDADES Y PERSPECTIVAS

Carlos J. Perfumo. Cátedra de Patología Especial. Fac. de Ciencias Veterinarias UNLP

cjperfumo@fcv.unlp.edu.ar

“El estudio de lo causado debe siempre **preceder** al estudio de las **causas**”
J.T. Done. Internacional Pig Veterinary Society Congress, México 1982

Introducción

En poblaciones no inmunes, la introducción de un agente infeccioso se traduce por brotes de enfermedad clínica, fáciles de detectar por los índices de morbilidad o mortandad, ejemplo de ello es la reciente infección por el coronavirus de la encefalomiелitis hemoaglutinante que produjo, en las 3 semanas que duró el cuadro, una mortalidad del 50% de los nacidos vivos (5). En oposición, las infecciones endémicas o de agentes ante los cuales se aplican medidas de prevención y control (vacunación, medicación) permanecen subclínicas y sólo se reflejaron por bajos registros productivos (< GDP; >CA), a no ser que apliquemos para su diagnóstico una combinación de métodos tradicionales y de biología molecular.

¿Por Qué Es Importante El Diagnóstico De Las Enfermedades Subclínicas?

Cada enfermedad infecciosa en una granja porcina, tiene su propia dinámica que esta dada, de lo general a lo particular por: el diseño de la granja (1 sitio vs 3 sitios); flujo de animales, planes de controles específicos; dosis/ serotipos /biotipos de los agentes prevalentes en el establecimiento; coinfecciones virales/bacterianas, existencia de subpoblaciones no inmunes y por lo tanto susceptibles y medidas de bioseguridad internas y externas. La modificación de estos factores puede inducir que una infección subclínica en el tiempo (¿años?) se manifieste clínicamente en forma abrupta.

Así mismo una infección subclínica puede, por largo tiempo, permanecer *per se* y sólo se traducirá por animales retrasados, lotes desperejados y/o mortalidad en goteo actuando como un “enemigo silencioso” de los índices productivos y económicos de la granja no siempre conocidos por el veterinario y/o el responsables del establecimiento.

Existen en la actualidad programas de erradicación a nivel granja de agentes específicos por ej. *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, sin embargo, los mismos pueden fracasar si no se conocen las infecciones intercurrentes que pueden confundir, en alguna de las etapas, el proceso de diagnóstico. Por las razones apuntadas y debido a su repercusión económica, es necesario conocer que agentes se encuentran en las granjas convencionales de la Argentina, (ver tablas 1, 2 y 3), así como los posibles métodos para su diagnóstico, con énfasis en el aspecto anatomopatológico.

El Diagnóstico Anatomopatológico De Las Entidades/Infecciones Subclínicas y Su Correlación Etiológica

Durante años y aún en vigencia en sanidad porcina se ha puesto énfasis en: a.- el estudio anatomopatológico sistemático en granja por categorías de animales; b.- realización de perfiles inmunoserológicos, bacteriológicos y virológicos (más raros) longitudinales o transversales y c.- inspección de vísceras en frigoríficos en forma

aleatoria o programada y toma de muestra para estudios complementarios (bacteriología, histopatología, IHQ).

Su aplicación a una granja comercial de 1000 madres, durante 1 ½ año, con visitas periódicas, la realización de 879 necropsias, 83 estudios histopatológicos y 50 estudios bacteriológicos permitieron determinar en porcentaje y por sistemas las causas de muerte "naturales" de las categorías de crecimiento/engorde. Pero aún más importante posibilitó la detección del caso testigo de infecciones subclínicas por *E. rhusiopathiae* serotipo 10, *A. pleuropneumoniae* serotipo 7, circovirus porcino tipo 2 en lesiones de síndrome de dermatitis y nefropatía, enteropatía proliferativa y hemorrágica por *L. intracellularis*, lesiones tempranas de raquitismo y de constrictura rectal (2,6,10). Cuando el mismo procedimiento se aplicó para determinar las causas de mortalidad predestete, sobre 3153 necropsias los resultados por semanas (1 a 3) y por categoría permitió la corrección del manejo en forma semanal y de esa forma reducir la mortalidad en lactancia (7). Dicho procedimiento aplicado a las causales de descarte y mortalidad en reproductoras en 2 granjas en la Argentina (4) y 1 en USA (8) comprobó en la primera que la cistitis y pielonefritis y en la segunda los problemas locomotores fueron los más significativos desde el punto de vista anatomopatológico. En todos estos trabajos, el pivote sobre el cual giró el diagnóstico fueron los hallazgos anatomopatológicos macroscópicos ya que se trabajó con animales hallados muertos y salvo excepciones sacrificados con fines diagnósticos. Así mismo, dado el número de animales inspeccionados requirió un procedimiento numérico de registro de 3 dígitos en los que por ej. 100 indicó el aparato o sistema comprometido (ej: aparato respiratorio), de 10 en 10 entre 100 y 200 para los diferentes diagnósticos macroscópicos de neumonía (ej: 110 pleuroneumonía) y de 111 a 119 las posibles bacterias involucradas en los cuadros de pleuroneumonía (ej: 111= *A. pleuropneumoniae*, 112= *P. multocida*, 113= etc).

Este diseño y estrategia diagnóstica requiere de tiempo, esfuerzo físico y experiencia en diagnóstico postmortem, por lo cual si no se reúnen dichas condiciones se corre el riesgo de ser un procedimiento poco sensible en identificar infecciones en estadios **preclínicos, subclínicos o convalecientes** y poco específico en el diagnóstico diferencial (si no hay un soporte de estudios de laboratorio complementarios) considerando la interacción existente entre los diferentes agentes.

En la actualidad la irrupción de las diferentes técnicas de PCR ha revolucionado el diagnóstico etiológico, permitiendo la identificación del DNA o mRNA de bacterias, toxinas bacterianas, virus y parásitos, particularmente protozoarios.

Si bien son numerosas las ventajas de estas técnicas, en nuestro medio no se ha extendido su uso como diagnóstico de rutina en laboratorios de diagnóstico privados por su alto costo inicial de equipos. A esto se le suman algunas desventajas tales como: a) alta sensibilidad de algunas variantes de PCR que la hacen no apropiada para estudios de prevalencia, b) la no diferenciación entre microorganismos vivos de los muertos; c) escaso poder discriminatorio en infecciones persistentes ej. PCV-2. Para estas entidades en las que la sola presencia del virus/ agente es "necesaria pero no suficiente" el diagnóstico individual se basa en los signos clínicos, las lesiones histopatológicas y la detección y cuantificación de la inmunomarcación del agente por técnicas de IHQ o de hibridación "in situ".

Perspectivas

Como resultado del conocimiento del genoma humano y del de numerosas especies animales incluyendo el cerdo, en fecha reciente se ha introducido el concepto de **Biología Sistémica** (11). El mismo enfoca, con una perspectiva "holística", el estudio de los sistemas vivos basado en el análisis integrado y sistémico a nivel intracelular, celular, orgánico y metabólico apoyado por los conocimientos de biología, matemáticas, bioinformática, estadística así como de equipamientos

sofisticados. Estos procedimientos replantean la reclasificación y diagnóstico de las enfermedades animales como está ocurriendo con las del hombre (1). El mismo incluye 3 sub-disciplinas:

Transcriptomic: monitorea el ARN-m entre 100 y 1000 genes en forma simultánea mediante la técnica de microarray tecnología o DNA chips.

Proteomic: analiza simultáneamente gran número de proteínas en tejidos, cultivos celulares o a nivel subcelular a través de 2-D gel electroforesis, cromatografía de fase líquida, espectrometría de masa o electroforesis capilar.

Metabolomic: analiza diferentes metabolitos en células y líquidos biológicos mediante resonancia nuclear magnética.

Estudios proteómicos realizados de cerdos infectados con *A. pleuropneumoniae* demostraron la presencia de potenciales marcados biológicos de infección en el lavado bronquioalveolar como son los péptidos antimicrobianos: prophenin 2, PR-39 y una proteína fijadora de Ca (calgranulin), siendo el PR-39 un marcador accesible para identificar cerdos clínicamente sanos pero convalecientes de la infección (1). Su determinación podría ser de utilidad en granjas convencionales de venta de reproductores.

¿Cómo Se Puede Adaptar O Integrar La Patología Diagnóstica Celular O Subcelular A Esta Era Genómica?

Recientemente se ha diseñado la técnica de Tissue Microarray Technology para estudios retrospectivos de marcadores tumorales (9). La misma consiste en obtener cilindros de tejidos de 0,6 mm de diámetro por 3mm de profundidad de numerosas partes de un bloque de parafina de un órgano, de diferentes órganos de un animal o de numerosos animales que constituyen un caso, los que se colocan en recipiente de microarray. Por este procedimiento, una muestra en un portaobjetos incluye entre 500 y 1000 submuestras, en las que pueden ser estudiados el ADN, ARN o proteínas por técnicas de IHQ, hibridación in situ o IFI en forma simultánea. Esto aumenta la velocidad de análisis de gran número de muestras, reduce los costos, facilita la estandarización de las observaciones, su análisis estadístico y en conjunción con las otras técnicas genómicas una visión integral del problema diagnóstico.

Conclusiones

En patología, el primer paso que es la observación macroscópica, constituye la base del diagnóstico individual de un caso clínico poblacional. En los cuadros subclínicos (infección inicial o convaleciente), en los que los cambios a simple vista no son evidentes, la histopatología sumada a la IHQ cuantitativa contribuyen a comprender la etiopatogenia de la infección. En un futuro, adecuación de la técnica de tissue microarray u otras a la patología diagnóstica de los animales de producción en conjunción con la información aportada por las técnicas de la biología sistémica nos dará una nueva dimensión de nuestra especialidad y nos permitirá una mejor caracterización de los cuadros subclínicos.

Bibliografía

- 1.- Hening-Pauka, I.; Jacobsen, I.; Blecha, F.; Waldmann, K.H.; Gerlach, G.F. Differential proteomic analysis reveals increased cathelicidin expression in porcine bronchoalveolar lavage fluid after an *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. Vet. Res. 37: 75-87, 2006.

- 2.- Machuca, M.; Segalés, J.; Idiart, J.R.; Sanguinetti, H.R.; Perfumo, C. J. Síndrome de dermatitis y nefropatía porcina en Argentina. Lesiones patológicas y detección de circovirus porcino. *Rev. Med. Vet.* 81: 337-339, 2000.
- 3.- Loscalzo, J.; Kohane, I.; Lazlo-Barabasi, A. Human disease classification in the postgenomic era: A complex systems approach to human pathology. *Molecular Systems Biology* 3: 1-11, 2007.
- 4.- Perfumo, C.J.; Sanguinetti, H., j. r. Idiart, J.R.; Massone, A.; Vigo, G.; Machuca, M., Moredo, F.; Giacoboni, G.; Quiroga, A. Hallazgos anatomopatológicos asociados a la muerte de reproductoras porcinas en dos granjas con manejo intensivo en confinamiento. *Rev. Med. Vet.* 84:84-88, 2003.
- 5.- Quiroga, M. A., Cappuccio, J., Piñeyro, P., Basso, W., Moré, G.; Kienast, M.; Schonfeld, S.; Cáncer, J.L.; Arauz, S., Pintos, M.; Nanni, M., Hirano, N.; Perfumo, C.J. Hemoagglutinating encephalomyelitis coronavirus infection in pigs in Argentina. *Emerging Infectious Diseases.* 14:484-486, 2008
- 6.- Ross, P., Sanz, M.; Sernia, C. Bustos, J., Sanguinetti, H.R., Risso, M.A.; Moredo, F.; Vigo, G.; Idiart, J., Perfumo, C.J. Causes of death in growing and fattening pigs in a farrow-to-finishing operation. Evaluation of their prevalence. *Proceedings 31st Annual Meeting American Association of Swine Practitioners, March 11-14, 2000, pg. 61-69, Indianapolis, Indiana USA*
- 7.- Sanz, M.; Sernia, C.; Viale, G., Bustos, L.; Sanguinetti, H.; Risso, M.; Venturini, L.; Idiart, J.; Perfumo, C. - Why should piglets dead at the pre-weaning period be post-mortem examined and statistically analysed at weekly intervals? . *Proceedings 32nd Annual Meeting American Association of Swine Practitioners, February 24-27, 2001, pg. 69-74, Nashville, Tennessee USA*
- 8.- Sanz, M.; Roberts, J.D.; Perfumo, C.J.; Alvarez, R.M.; Donovan, T.; Almond, G. An Assessment of sow mortality in a large herd. *Swine Health Prod.* 15:30-36, 2007
- 9.- Torhorst, J.; Bucher, C.; Kononen, J.; Haas, P.; Zuber, M.; Kocli, O.R.; Mross, F.; Dieterich, H.; Moch, H.; Mihastsch, M.; Kallioniemi, Sauter, G. Tissue microarray for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am. J. Pathol.* 159:2249-2256, 2001.
- 10.- Vigo, G.; Sánchez, M.L.; Moredo, F.; Samus, S.; Pereyra, N.; Sanguinetti, H.R.; Perfumo, C.J. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: serotipos aislados y estudios epizootiológicos de casos de erisipela porcina. *Rev. Med. Vet.* 85: 57-60, 2004.
- 11.- Witkamp, R.F. Genomic and systemic biology- How relevant are the developments to veterinary pharmacology, toxicology and therapeutics. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 28:235-245, 2005.

Tablas:

Tabla 1. Virus identificados en granjas convencionales de la RA

Presentes	¿Posibles?
1.-PCV tipo 2*	Rubulovirus
2. Suid herpes virus 2*	Sapovirus
3.-Rota virus tipos A*	Influenza A
4.-Coronavirus*	Norovirus
5. -EMC*	Hepatitis E
6.-Pox virus*	PRRS
7-Virus de la enf. Aujeszky*	Torovirus
8.-Encefalomielitis hemoaglutinate*	Hepevirus
9.-Parvovirus	

Tabla 2. Bacterias y Micoplasmas identificadas en granjas convencionales de la RA

Presentes	¿Posibles?
10. <i>E. coli</i> *(ETEC, EDEC, AEEC)	O:157 H
11. - <i>Salmonella</i> Cholerasuis y Typhimurium*	
12. - <i>Pasteurella multocida</i> A y D*	
13. - <i>Bordetella bronchiseptica</i> *	
14. - <i>Streptococcus suis</i> *	
15. - <i>Lawsonia intracellularis</i> *	
16. - <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> *	<i>B. pilosicoli</i>
17. - <i>Clostridium perfringens</i> tipo A*	<i>C. perfringens</i> tipo C <i>Clostridium difficile</i>
18. - <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> *	Otros serotipos
19. - <i>Haemophilus paraseis</i>	
20. - <i>Actinobacillus suis</i>	
21. - <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> *	Otros serotipos
22. - <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> *	
23. - <i>Mycoplasma hyosinoviae</i> *	
24. - <i>Mycoplasma hyorhinis</i> *	
25. - <i>Mycoplasma haemosuis</i> *	

Tabla 3. Parásitos identificadas en granjas convencionales de la RA

Presentes	¿Posibles?
26. - <i>Isospora suis</i> *	<i>Estrongyloides ransomi</i> *
27. - <i>Eimeria</i> spp	<i>Microsporidia</i>
28. - <i>Cryptosporidium</i> sp*	
29. - <i>Blastocystis</i> spp*	
30. - <i>Toxoplasma gondii</i> *	
31. - <i>Ascaris suum</i>	
32. - <i>Metastrongylus</i> spp	
33. - <i>Sarcocystis</i> spp*	
34. - <i>Balantidium coli</i>	