



Tuberculosis porcina (II): diagnóstico laboratorial y medidas de prevención y control

● **Waldo L. García-Jiménez^{1,2} y Francisco J. Salguero¹**

¹Departamento de Patología y Enfermedades Infecciosas. Facultad de Veterinaria. Universidad de Surrey, Reino Unido

²Unidad de Patología Infecciosa. Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura

Las infecciones producidas por micobacterias en el ganado porcino no producen un cuadro clínico-lesional característico. El diagnóstico de laboratorio es esencial para confirmar la infección en animales y la presencia de micobacterias patógenas en muestras clínicas, así como su posterior identificación y tipificación.

PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO ANTE MORTEM

En primer lugar podemos disponer de técnicas para el diagnóstico *in vivo* de esta enfermedad. Para ello se emplean principalmente pruebas basadas en la respuesta celular de tipo retardado como la intradermorreacción tuberculínica (IDTB) y la detección de IFN- γ específico. Estas pruebas son las mismas que se vienen utilizando desde hace años en el ganado bovino dentro del Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina en nuestro país.

La IDTB simple (IDTBs) es la técnica empleada de rutina dentro de las campañas de saneamiento ganadero. La prueba consiste básicamente en la aplicación intradérmica de antígenos específicos de micobacterias (tuberculinas), concretamente derivados proteicos purificados (PPDs). Para la realización de la prueba de IDTBs se aplican únicamente antígenos extraídos de *M. bovis* AN5 (PPD bovina) mientras que para la IDTB comparada (IDTBc) se inyectan en dos localizaciones diferentes a) la PPD bovina y b) antígenos extraídos de *M. avium* subsp. *avium* D4 ER (PPD aviar).

La realización de esta prueba está muy bien estandarizada en el ganado bovino y se han llevado a cabo trabajos para conseguir una mejor estandarización en el caprino (Bezou y cols., 2011). Sin embargo, aunque se pueda usar en los cerdos con los mismos fines que en el ganado bovino y caprino, es una técnica que no se realiza de forma rutinaria y por ello la información existente sobre su utilidad real es más limitada, aunque recientemente se ha llevado a cabo algún trabajo con esta finalidad (Oliveira y cols., 2014).

Para su realización en el bovino y caprino se requiere la inoculación intradérmica de 0,1 ml de PPD en una zona depilada, limpia y desinfectada del tercio medio de las tablas del cuello. En los cerdos se emplea la misma cantidad de tuberculina, pero se suele inocular en la superficie dorsal o en la base de la oreja (Oliveira y cols., 2014). Posteriormente, el criterio que se sigue es la habitual lectura de la respuesta inmune provocada, concretamente una reacción de hipersensibilidad retardada, transcurridas 48-72 horas desde la aplicación. Una reacción positiva puede presentar engrosamiento de la zona donde se inoculó la tuberculina, ulceración, enrojecimiento y dolor.

La principal ventaja de la IDTBc con respecto a la IDTBs es su mayor especificidad, en detrimento eso sí de la sensibilidad, pues permite hacer un diagnóstico diferencial entre la infección por miembros del CMTB y la infección por otras micobacterias no incluidas en el CMTB (Álvarez y cols., 2008). Este factor es importante en el caso de los cerdos ya que se describen con frecuencia casos de infección por *M. avium* subsp. *avium* (Agdestein y cols., 2014; De Val y cols., 2014) o por *M. avium* subsp. *hominisuis* que ha demostrado tener cierto potencial zoonótico (Leão y cols., 2014).

La otra técnica que podemos emplear para el diagnóstico *in vivo*, es la prueba basada en la cuantificación de IFN- γ específico. Es una técnica *in vitro* ampliamente empleada en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Esta prueba, al igual que la IDTB, tiene como fundamento la medición de la respuesta celular de tipo retardado, permitiendo mediante una técnica de ELISA la detección del IFN- γ específico liberado por los linfocitos de sangre periférica (principalmente linfocitos T) tras el contacto con el antígeno (Wood y cols., 1991). Se realiza a partir de muestras de sangre tomadas con anticoagulante siguiendo un protocolo semejante al descrito para el ganado bovino. No obstante, existen en el mercado test diagnósticos específicos para su empleo en el porcino.

Otra posibilidad en el diagnóstico de la tuberculosis en el ganado porcino son las pruebas diagnósticas de base humoral. La detección de anticuerpos frente a miembros del CMTB puede servir de complemento a las pruebas diagnósticas basadas en la respuesta celular de tipo retardado. Entre las principales ventajas de estos sistemas están su bajo coste, la necesidad de una única toma de muestras, la rapidez con la que se pueden realizar y la estabilidad de los anticuerpos durante el transporte, almacenamiento y manejo de las muestras (Green y cols., 2009).

A pesar de ello, actualmente estos sistemas están menos desarrollados que los basados en la respuesta celular y por ello no se emplean de forma rutinaria en el diagnóstico oficial de la tuberculosis. Su uso es mayor en el campo experimental, empleándose diferentes antígenos y métodos de interpretación, e incluso diferentes sistemas de detección. No obstante, el método de detección más popular es el ELISA para la detección de anticuerpos frente a los antígenos MPB70 y MPB83.

El objetivo es disponer de una prueba relativamente sencilla basada en la detección de anticuerpos específicos que posea una sensibilidad y especificidad adecuadas. Su utilidad sería mayor para el diagnóstico de animales en fases avanzadas de la enfermedad, que incluso podrían no responder a las técnicas basadas en la respuesta celular, y que sí presenten anticuerpos frente a las micobacterias, por lo que puede resultar en un método complementario muy a tener en cuenta.

PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO POST MORTEM

Por lo que respecta al diagnóstico *post-mortem*, la prueba de referencia o "gold standard" para la confirmación de la infección por uno de los miembros del CMTB sigue siendo la detección directa de la bacteria por examen bacteriológico en muestras de tejido que presentan una lesión granulomatosa compatible con esta infección (Figura 1).

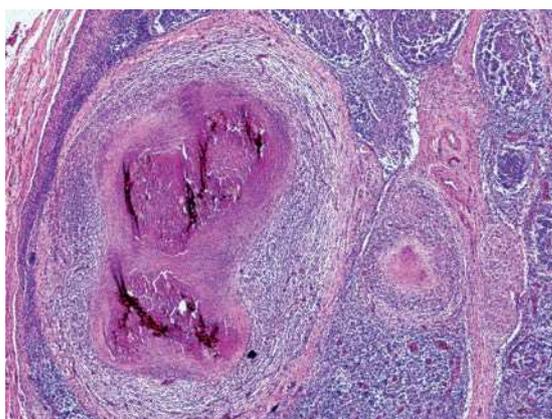
Para llegar al diagnóstico definitivo se debe recurrir a las técnicas microbiológicas, gracias a las cuales, y a partir de muestras de tejidos, se consigue el aislamiento del agente etiológico en medios de cultivo específicos líquidos o sólidos, como el MGIT, Middlebrook 7H11 o Löwenstein-Jensen (Figura 2). Previo al cultivo, es recomendable realizar un examen microscópico mediante la tinción específica de micobacterias (alcohol ácido resistentes) con la técnica de Ziehl-Nielsen. Este procedimiento simple, barato y rápido, pone de manifiesto la presencia de las micobacterias, proporcionando una orientación diagnóstica preliminar muy útil, aunque no permite diferenciar la especie y la sensibilidad es limitada. Finalmente, tras el cultivo microbiológico se debe proceder a la identificación del agente aislado, que se realiza habitualmente por técnicas moleculares basadas en la detección por PCR de secuencias



Procesado laboratorial del linfondo mandibular de un cerdo afectado de tuberculosis.



Detalle del crecimiento de colonias de *Mycobacterium bovis* en medio de cultivo Löwenstein-Jensen.



Granulomas producidos por *Mycobacterium bovis* en el linfondo retrofaringeo de un cerdo, observados mediante histopatología.

de ADN específicas del CMTB. A su vez, las técnicas de biología molecular, como el *spoligotyping*, número variable de repeticiones en tándem (VNTR) o secuenciación del



genoma completopermiten la caracterización genética de los aislamientos para la posterior realización de estudios epidemiológicos.

Por su parte, el diagnóstico histopatológico puede ser de gran ayuda como otra herramienta complementaria. El granuloma tuberculoso es la lesión característica de esta enfermedad (*Figura 3*). La utilidad del análisis histopatológico es mayor en los animales con infecciones recientes y que normalmente no presentan lesiones macroscópicas ya que nos va a permitir detectar esos granulomas no visibles. En los jabalíes se ha estimado que este tipo de lesiones no visibles puede darse en el 10% de los animales afectados de tuberculosis (*García-Jiménez y cols., 2013*) por lo que suponemos que se puede dar una situación similar en el porcino.

PREVENCIÓN Y CONTROL

Dado que la tuberculosis en el ganado porcino es una enfermedad multifactorial, tanto la prevención como el control de la misma va a ser una tarea complicado en algunas ocasiones dependiendo de la situación epidemiológica. Para finalizar, vamos a hacer referencia a algunas de las medidas a nuestro alcance.

Una situación ideal para la prevención sería la administración de vacunas eficaces frente a la enfermedad. Sin embargo y a pesar de los avances en este campo, la vacunación todavía no es una alternativa real en la actualidad.

Debido a ello, las principales herramientas de las que disponemos son la implementación de medidas de bioseguridad y manejo adecuadas y tomar medidas para que nuestros animales mantengan un estatus inmunitario óptimo que les ayude a evitar la infección o en el caso de que esta ocurra, que consigan tenerla controlada hasta el punto de que no contagien a otros animales.

Empezando por las primeras podemos citar aquellas medidas que intentan evitar el contacto de los cerdos con animales infectados o con agua o alimento contaminados por ellos. En este sentido se han diseñado distintos tipos de vallados que consiguen aislar de forma eficiente la fauna salvaje de la doméstica (*Figura 4*), muy importante para el ganado porcino en extensivo. Sin embargo, el coste elevado de su instalación o la dificultad en su mantenimiento pueden limitar su utilidad. Debido a que generalmente estos vallados se extienden por varios kilómetros van a estar muy expuestos a daños por animales incontrolados, vandalismo, o accidentes meteorológicos que con una simple brecha en su continuidad pueden anular por completo su eficacia.

Si no es factible que el área ocupada por los cerdos se aisle del entorno con vallado cinagético adecuado, al menos debe poderse evitar el contagio directo e indirecto en puntos de interés común (*Barasona y cols., 2013*). Son especialmente peligrosos los puntos de agua localizados sobre terrenos arcillosos que utilizan

los jabalíes para bañarse conocidos como “bañas” (*Figura 5*). El aislamiento de charcas en zonas de fácil acceso para ambas especies y el impedimento de que los cerdos accedan a charcas situadas en el interior de zonas de abundante vegetación que puedan servir para el “encame” de jabalíes son también medidas imprescindibles. Para otras especies, como el bovino, se han diseñado comederos específicos que evitan que los jabalíes se alimenten en ellos y que resultan todavía más eficaces cuando en ellos se administran alimentos por los que el jabalí muestra menor apetencia. Esta medida se antoja más complicada en el porcino debido a que los animales presentan el mismo tamaño y los mismos hábitos alimentarios.

Finalmente, tenemos a nuestro alcance medidas que refuercen el sistema inmunitario de los animales. La nutrición equilibrada es muy importante y la aportación de correctores vitamínicos y minerales, especialmente aquellos enriquecidos con vitamina D (que es básica para la activación de los macrófagos), pueden combinarse adecuadamente para lograr el objetivo de fortalecer el sistema inmune.

Se ha demostrado que la inmunosupresión agrava la tuberculosis y favorece su transmisión, y esto se ha visto con enfermedades víricas del jabalí, como la enfermedad de Aujeszky o la circovirus porcina, así como con enfermedades parasitarias (*Risco y cols., 2014*). El control de estos procesos mediante la vacunación sistemática contra las enfermedades víricas en animales jóvenes, que son precisamente los más vulnerables a infectarse de tuberculosis, y con desparasitaciones periódicas, podría ser clave para potenciar el sistema inmunitario de nuestros cerdos de forma que disminuyamos el riesgo de contraer esta enfermedad.

CONCLUSIÓN

El diagnóstico laboratorial se antoja necesario en numerosas ocasiones para confirmar la infección por tuberculosis en los cerdos. Contamos con una amplia variedad de técnicas tanto para el diagnóstico in vivo como para la confirmación mediante aislamiento microbiológico. En este aspecto, resultan muy interesantes las técnicas de tipificación molecular, ya que nos permiten investigar el posible origen de los brotes y con ello tomar las medidas adecuadas para controlarlo.

En cuanto a la prevención y control, una bioseguridad adecuada junto con el mantenimiento de un estado inmunitario correcto de los animales, mediante inmunizaciones frente a otros agentes y una correcta nutrición, son las principales medidas en las que podemos incidir. El desarrollo de vacunas eficaces frente a la tuberculosis sería el método ideal para combatir esta zoonosis, y es por ello es éste uno de los campos de investigación en los que más se está trabajando. 🐷



Referencias bibliográficas

- Agdestein A., I. Olsen, A. Jorgensen, B. Djonne y T. B. Johansen. 2014. Novel insights into transmission routes of *Mycobacterium avium* in pigs and possible implications for human health. *Veterinary Research*, 45.
- Álvarez J., L. de Juan, J. Bezós, B. Romero, J. L. Sáez, F. J. R. Gordejo, V. Briones, M. A. Moreno, A. Mateos, L. Domínguez y A. Aranaz. 2008. Interference of paratuberculosis with the diagnosis of tuberculosis in a goat flock with a natural mixed infection. *Veterinary Microbiology*, 128: 72-80.
- Barasona J. A., K. C. VerCauteren, N. Saklou, C. Gortazar y J. Vicente. 2013. Effectiveness of cattle operated bump gates and exclusion fences in preventing ungulate multi-host sanitary interaction. *Preventive Veterinary Medicine*, 111: 42-50.
- Bezós J., J. Álvarez, L. D. Juan, B. Romero, S. Rodríguez, E. Castellanos, J. L. Sánchez-Llorente, A. Mateos, L. Domínguez y A. Aranaz. 2011. Factors influencing the performance of an interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis in goats. *Veterinary Journal*, 190: 131-135.
- De Val B. P., L. Grau-Roma, J. Segalés, M. Domingo y E. Vidal. 2014. Mycobacteriosis outbreak caused by *Mycobacterium avium* subsp. *avium* detected through meat inspection in five porcine fattening farms. *Veterinary Record*, 174: 96.
- García-Jiménez W. L., F. J. Salguero, P. Fernández-Llario, R. Martínez, D. Risco, J. Gough, A. Ortiz-Peláez, J. Hermosode-Mendoza y L. Gómez. 2013. Immunopathology of granulomas produced by *Mycobacterium bovis* in naturally infected wild boar. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 156: 54-63.
- Green L. R., C. C. Jones, A. L. Sherwood, I. V. Garkavi, G. A. Cangelosi, T. C. Thacker, M. V. Palmer, W. R. Waters y C. V. Rathe. 2009. Single-antigen serological testing for bovine tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16: 1309-1313.
- Leão C., A. Canto, D. Machado, I. S. Sanches, I. Couto, M. Viveiros, J. Inácio y A. Botelho. 2014. Relatedness of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* clinical isolates of human and porcine origins assessed by MLVA. *Veterinary Microbiology*, 173: 92-100.
- Oliveira F. C. S., S. R. Pinheiro, S. S. Azevedo, C. S. A. B. Santos, W. Lilenbaum, F. R. M. Soto, E. Roxo y S. A. Vasconcellos. 2014. Standardization of the immunoallergic skin test applied for the diagnosis of tuberculosis and mycobacterioses in swine (*Sus scrofa*) experimentally sensitized with oil suspensions of inactivated *Mycobacterium bovis* or *M. avium*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34: 123-128.
- Risco D., E. Serrano, P. Fernández-Llario, J. M. Cuesta, P. Gonçalves, W. L. Garcia-Jiménez, R. Martínez, R. Cerrato, R. Velarde, L. Gómez, J. Segalés y J. H. De Mendoza. 2014. Severity of bovine tuberculosis is associated with co-infection with common pathogens in wild boar. *PLoS ONE*, 9.
- Wood P. R., L. A. Corner, J. S. Rothel, C. Baldock, S. L. Jones, D. B. Cousins, B. S. McCormick, B. R. Francis, J. Creeper y N. E. Tweddle. 1991. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Australian Veterinary Journal*, 68: 286-290.