

Limitaciones en el diagnóstico del SRRP (y II)

Cinta Prieto Suárez

Dpto. de Sanidad Animal.

Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid

En nuestra anterior entrega (Mundo Ganadero nº 198, mayo 2007), se repasó en qué situaciones era recomendable para el diagnóstico del SRRP en una explotación, optar por la determinación de la presencia del agente causal (diagnóstico etiológico) o bien por la detección de los anticuerpos específicos inducidos por éste (diagnóstico serológico). A continuación, se abordan las limitaciones de cada uno de estos métodos.

A grandes rasgos podemos hacer, tal y como se describió en la primera parte de este artículo, una división entre los sistemas de diagnóstico que determinan la presencia del agente causal del Síndrome Reprodutor y Respiratorio Porcino (SRRP), el virus SRRP (VSRRP) o diagnóstico etiológico, y los sistemas que detectan la infección de forma indirecta, midiendo el desarrollo de anticuerpos específicos frente al virus o diagnóstico serológico.

¿Qué limitaciones tiene el diagnóstico etiológico del SRRP?

La determinación de la presencia del VSRRP en muestras clínicas puede aportar información valiosa, pero hay que tener presente que existen distintos métodos y que todos ellos tienen ventajas e inconvenientes.

Una forma irrefutable de diagnosticar la enfermedad consiste en realizar el aislamiento e identificación del agente causal. Sin embargo, este sistema no se utiliza más que con fines experimentales dado que es necesario un equipamiento y una experiencia de la que no disponen la mayoría de los laboratorios de diagnóstico.

Otra forma de determinar la presencia del virus en muestras clínicas consiste en el empleo de tinciones inmunológicas que se pueden utilizar para determinar la presencia del virus en cortes histológicos de tejidos como el pulmón o distintos órganos linfoides. Aunque existen distintos procedimientos, las técnicas más utilizadas son la inmunohistoquímica y la hibridación *in situ*. Estas dos técnicas tienen la ventaja de que permiten evaluar la presencia de lesiones histológicas a la vez que se determina la presencia del virus, además de

poder utilizarse en estudios retrospectivos al realizarse sobre tejidos fijados con formalina y embebidos en parafina. Su principal limitación es la sensibilidad, que es relativamente baja, sobre todo en el caso de la inmunohistoquímica. Además, es necesario contar con un equipamiento específico y experiencia para interpretar los resultados de las tinciones. Esta circunstancia, unida al hecho de que no es posible automatizar, ni simplificar la lectura de las tinciones, limita considerablemente su utilización en la práctica.

La técnica más utilizada en los laboratorios de diagnóstico, y sin lugar a dudas la más familiar para los veterinarios de campo, es la transcripción inversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), primero sencilla y posteriormente anidada (RT-nPCR). Sin embargo, a pesar de utilizarse de forma rutinaria en el diagnóstico, en muchos casos se desconocen las utilidades, y sobre todo las limitaciones, reales de la técnica. Para obtener resultados fiables y aplicativos debemos tener en cuenta una serie de condicionantes entre los que destacan los relacionados con la patogenia de la infección y la selección de las muestras, y los relacionados con las características inherentes a la técnica, fundamentalmente la sensibilidad y la especificidad.

Patogenia de la infección

En primer lugar, para obtener unos resultados adecuados, debemos conocer la patogenia de la infección por este virus y la distribución del mismo en los diferentes órganos y tejidos, ya que la selección de las muestras inadecuadas nos puede llevar a un diagnóstico incorrecto. La muestra más fácil de obtener, y sobre la que se realiza esta técnica con mayor frecuencia, es el suero. Sin embargo, es evidente que la determi-



nación del virus sobre esta muestra se limitará al periodo de viremia, que tiene una duración media de 2-3 semanas en los animales adultos y 4-5 semanas en los animales en crecimiento (Prieto y Castro, 2005). Pasado este tiempo, las muestras de suero darán un resultado negativo sin que esto signifique que el virus no está presente en los animales estudiados. Por el contrario, la presencia del VSRRP en distintos órganos será posible durante periodos más prolongados de tiempo, sobre todo si consideramos muestras de órganos del sistema linfóide y particularmente nódulos linfáticos o tonsilas. En estas localizaciones se ha llegado a determinar la presencia del virus durante periodos de más de 8 meses (Wills *et al*, 2003). Esta dinámica de infección ha planteado importantes problemas de diagnóstico para la determinación de los animales portadores ya que, pasado el periodo inicial de viremia, que por otra parte es relativamente corto en los animales adultos, se hace prácticamente imposible determinar si un animal vivo es portador del virus o no.

En su conjunto, todos estos datos indican que la obtención de un resultado positivo mediante RT-PCR indicará que un animal está infectado, mientras que la obtención de un resultado negativo debe tomarse con mucha precaución ya que, aunque el virus no esté presente en el suero de los animales, puede encontrarse en otras localizaciones y, potencialmente, eliminarse e infectar a otros animales. Es decir, un resultado

Un resultado negativo con RT-PCR debe tomarse con precaución ya que, aunque el virus no esté presente en el suero, puede encontrarse en otras localizaciones

negativo no garantiza que los animales estudiados estén libres del virus. La única excepción la constituirían los animales seronegativos procedentes de granjas libres de la enfermedad. Por el contrario, los animales seronegativos procedentes de granjas positivas podrían ser portadores, ya que se ha descrito la presencia del virus en los órganos linfoides después del descenso de los anticuerpos por debajo de los niveles detectables por ELISA. Aunque este fenómeno es infrecuente, ya que normal-

mente los anticuerpos tienen una duración superior al periodo en que los animales son portadores, hay que tener en cuenta que es posible y que puede tener implicaciones epidemiológicas importantes.

Selección de muestras para realizar la técnica de RT-PCR

- Enfermedad reproductiva. Cuando se quieren diagnosticar brotes de la enfermedad en su forma reproductiva las mejores muestras son las procedentes de animales nacidos débiles, ya que este tipo de animales suelen nacer infectados, portan el virus en distintos órganos y permanecen virémicos durante periodos prolongados de tiempo. Por el contrario, no es conveniente utilizar muestras procedentes de fetos abortados ya que la muerte de los fetos tras la infección hace que comiencen los procesos de autólisis, los cuales conducen rápidamente a la degra-

dación del virus y su ácido nucleico, lo que puede dar lugar a un falso negativo en los análisis.

- **Muestras de semen.** El virus se puede eliminar en el semen durante periodos muy prolongados de tiempo, habitualmente de forma intermitente. El problema es que esta eliminación no se puede prever, ni hay ningún indicador fiable de la misma, de forma que sólo la determinación directa del virus en cada eyaculado permite descartar la presencia del VSRRP. Por tanto, un resultado negativo en un verraco seropositivo, sólo indica que esa muestra probablemente está libre del virus, pero no indica lo que pueda pasar con otros eyaculados de ese mismo verraco.

Características de la RT-PCR

Aunque generalmente se admite que una de las principales ventajas de la RT-PCR es su elevada sensibilidad, se trata de una técnica que no está estandarizada entre laboratorios. Es decir, cada laboratorio ha desarrollado una técnica de forma independiente a otros y esto hace que tanto la sensibilidad como la especificidad sean muy variables. En la sensibilidad intervienen distintos aspectos, entre los que destacan el sistema de aislamiento del ARN a partir de la muestra biológica, el diseño de los cebadores que se utilizan para la amplificación del ácido nucleico y las condiciones de la reacción. Esto hace que existen diferencias muy significativas en la sensibilidad que obtiene cada laboratorio. Sirva como ejemplo un trabajo muy reciente en el que se han comparado los resultados obtenidos sobre las mismas muestras en distintos centros de diagnóstico (Truyen *et al*, 2006). En conjunto, sólo el 80% de las muestras fueron diagnosticadas correctamente, variando la frecuencia de falsos resultados entre el 0% y el 43,33% con una mayor incidencia de problemas de sensibilidad que de especificidad. Estos datos son bastante reveladores e indican que un resultado negativo no siempre es garantía de la ausencia del virus. Además, la costumbre de mezclar varias muestras en un solo análisis para abaratar los costes hará más patente la falta de sensibilidad ya que partimos de una cantidad menor de cada una de las muestras en origen. Por tanto, un resultado negativo indica que el laboratorio no ha determinado la presencia de virus en la muestra, lo cual no garantiza totalmente que la muestra esté libre de virus.

¿Qué limitaciones tiene el diagnóstico serológico del SRRP?

La alternativa al diagnóstico etiológico es el serológico. Sin embargo, también en este caso hay limitaciones que se deben tener en cuenta.

Dinámica de aparición de anticuerpos

Dado que vamos a determinar la presencia de anticuerpos específicos debemos saber cuál es la dinámica de aparición de

los mismos, que dependerá del tipo de anticuerpo que estemos detectando. Las IgM son inmunoglobulinas de aparición rápida pero que se mantienen durante periodos cortos de tiempo. Así, es posible determinar su presencia desde aproximadamente el día 5 post-infección (pi) y hasta la tercera o cuarta semana pi. De aparición algo más tardía son las IgG, que son el tipo de inmunoglobulinas que detectan la mayoría de los kits empleados rutinariamente en los laboratorios de diagnóstico. Estas inmunoglobulinas pueden detectarse en un número significativo de animales a partir del día 9-10 pi en infecciones experimentales, siendo todos los animales seropositivos a partir del día 20-21 pi. Sin embargo, hay indicios de que los animales infectados de forma natural en el campo pueden tardar algo más en desarrollar anticuerpos específicos y se considera que la seroconversión se produce entre 2 y 3 semanas después de la exposición al virus. La duración de estos anticuerpos es muy variable ya que dependerá de factores individuales y de la técnica de diagnóstico que se utilice. Como media, se puede

considerar que el título máximo de anticuerpos se alcanzará aproximadamente 3-4 semanas después de la seroconversión y que los animales serán seropositivos durante un periodo de al menos 4-6 meses. Finalmente, la aparición de cantidades significativas de anticuerpos neutralizantes es más tardía y, aunque en títulos muy bajos, se pueden detectar a partir del día 9 pi en infecciones experimentales. El título máximo se alcanza como media en torno a los dos meses pi, descen-

diendo después paulatinamente y detectándose títulos muy bajos durante periodos prolongados.

En el diagnóstico, la utilización conjunta de técnicas que permitan la detección de distintos tipos de anticuerpos puede ayudar a determinar en qué momento pi nos encontramos (Kolb, 1996). Por ejemplo, la determinación conjunta de IgM e IgG nos puede ayudar a determinar si estamos ante una infección aguda, que se caracterizará por la presencia de IgM o ante una infección más antigua, en la que sólo detectaremos IgG.

Sensibilidad y especificidad de las técnicas

La limitación más importante de la serología guarda relación con la sensibilidad de las distintas técnicas. Para el diagnóstico de la infección por el VSRRP se han desarrollado distintos sistemas que incluyen la inmunofluorescencia indirecta, muy utilizada en Estados Unidos, sobre todo en los primeros años tras la aparición de la enfermedad, la inmunoperoxidasa en monocapa, utilizada en Europa de la misma forma que la inmunofluorescencia indirecta en Estados Unidos, y técnicas inmunoenzimáticas (ELISA).

Tanto la inmunofluorescencia como la inmunoperoxidasa en monocapa tienen como principal limitación la capacidad para detectar anticuerpos frente a cepas distintas de aquella que provocó su desarrollo. Es decir, la alta variabilidad del virus hace que exista poca reactividad cruzada entre cepas.

La serología tiene valor para determinar si una granja está infectada o no, pero tiene escaso valor para predecir qué individuos dentro de una granja están infectados

Esto tiene implicaciones prácticas muy importantes en el diagnóstico ya que podemos obtener falsos negativos con mucha frecuencia en un virus como éste, que presenta una elevada variabilidad antigénica.

En el caso de las técnicas de ELISA, éstas están estandarizadas y comercializadas, de forma que los resultados que se pueden obtener con el mismo kit en diferentes laboratorios se asume que son similares. Sin embargo, como cada kit de diagnóstico utiliza diferentes antígenos para tapizar las placas, existen diferencias importantes en los resultados obtenidos con los distintos kits disponibles en el mercado, aún en el mismo laboratorio, como el mismo personal y las mismas muestras. Mateu *et al* (2007) han determinado recientemente la existencia de diferencias significativas en la clasificación de los sueros como positivos o negativos a título individual, hasta el punto de oscilar el porcentaje de positividad entre el 36,3% y el 63,9% en un estudio en el que se comparaban tres ELISA comerciales para determinar la presencia de anticuerpos frente al VSRRP.

Como resumen, se puede decir que la serología tiene valor para determinar si una granja está infectada o no, pero tiene escaso valor para predecir qué individuos dentro de una granja están infectados. Además, cuando se quiere hacer un seguimiento de una granja o grupo de animales se debe utilizar siempre el mismo kit de diagnóstico.

Aún más conflictiva es la determinación de IgM ya que en este caso unimos a las diferencias individuales y entre reactivos, el hecho de que las IgM tienen de forma natural una

especificidad mucho menor que las IgG, por lo que existe un riesgo elevado de resultados erróneos, tanto por falsos positivos como por falsos negativos.

Además, otro error muy frecuente consiste en la “sobreinterpretación” de los resultados de la serología. Hay que tener claro que un valor de S/P ratio (Sample to Positive ratio) no indica el título de anticuerpos presente en un suero en particular, por lo que la utilización de este valor para determinar el título de anticuerpos e incluso para “adivinar” el momento en que se ha producido la infección es un error, ya que por un lado existe una gran variabilidad individual en la capacidad de respuesta de los animales a la infección por este virus, y por otro, los resultados del propio análisis pueden variar en las distintas determinaciones y los distintos lotes del kit comercial, lo que invalida la comparación de muestras obtenidas en momentos diferentes y analizadas en días distintos.

Otras limitaciones

Otras dos limitaciones importantes de la serología son que por un lado no nos permite determinar el grado de protección que tienen los animales, ya que se ha demostrado que no existe ninguna correlación entre la cantidad de anticuerpos totales que presenta un individuo y su protección frente a reinfecciones y por otro no nos permite diferenciar los animales vacunados de los animales infectados, ya que no existen vacunas marcadas en el mercado. Ambas cosas en conjunto limitan el valor de la serología para determinar el grado de protección de una población. ●

“El efecto barrera
revolucionaria nuestra
vida interior”

Levucell® SB

Levadura viva para cerdas y lechones

Protege tanto las cerdas como los lechones.

Levucell® SB es una levadura viva específica, *Saccharomyces cerevisiae boulardii* CNCM I-1079, autorizado en la UE para cerdas gestantes y lactantes y para lechones (E1703).

Levucell® SB :

- protege la fase de parto (menos pérdida de peso, mejora la ingestión),
- proporciona mejor confort para la cerda en la fase del parto (reduce el estrés),
- asegura lechones vigorosos y sanos,
- mejora la homogeneidad de la camada al destete.

