

Fotografía: Ximena Cardona L.

Uso de marcadores moleculares en la detección de enfermedades infecciosas en bovinos

Ximena Cardona L.
Bióloga
Universidad de Antioquia
ximenacl@colanta.com.co
Colombia

Resumen

El diagnóstico de las enfermedades infecciosas se realiza mediante la detección directa o indirecta de los agentes que la producen. Con los métodos directos se detectan los componentes de los agentes infecciosos, tales como los ácidos nucleicos, las proteínas estructurales y no estructurales, y las enzimas, entre otros. Los métodos indirectos detectan los anticuerpos inducidos por las infecciones.

En uno de los métodos directos se utiliza la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), técnica de biología molecular capaz de diagnosticar la presencia de virus, bacterias, protozoarios y hongos, identificando regiones específicas de sus ácidos nucleicos (ADN y ARN).

Abstract

Infectious diseases diagnosis can be done by detecting, direct or indirectly, the agents that produce it. With direct methods, infectious agents are detected by their components, e.g. nucleic acids, non-structural and structural proteins, and enzymes.

Indirect methods can detect antibodies induced by infection.

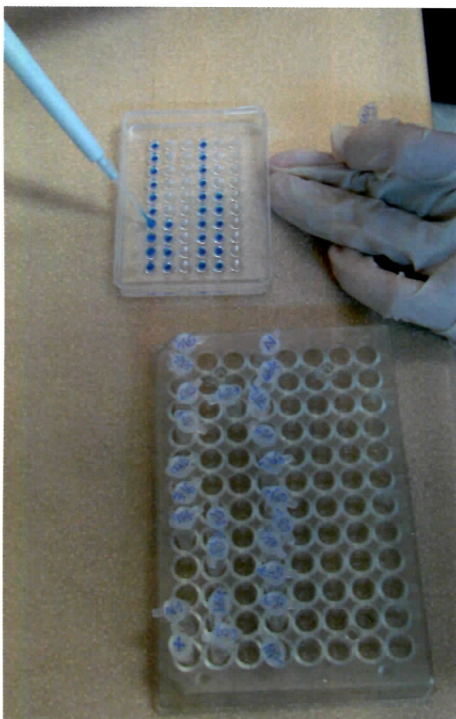
One of the direct methods uses the Chain Reaction PCR (polymerase) molecular biology technique capable of diagnosing the presence of viruses, bacteria, protozoa and fungi, identifying specific regions of their nucleic acids (DNA and RNA).

MEJORAMIENTO
GENÉTICO

Introducción

El método indirecto más común de detección de agentes infecciosos es la prueba ELISA (del inglés *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), técnica mundialmente usada para determinar si un anticuerpo particular está presente en la muestra de sangre de un paciente. Se basa en la unión de un antígeno inmovilizado a su anticuerpo, el cual ha sido enlazado a una enzima. De darse la unión antígeno-anticuerpo, la enzima es capaz de generar un cambio detectable como el color.

Los métodos más comunes de detección directa son el aislamiento o el cultivo *in vitro*, la microscopía electrónica y la detección y amplificación del material genético (PCR) (Figura 1).

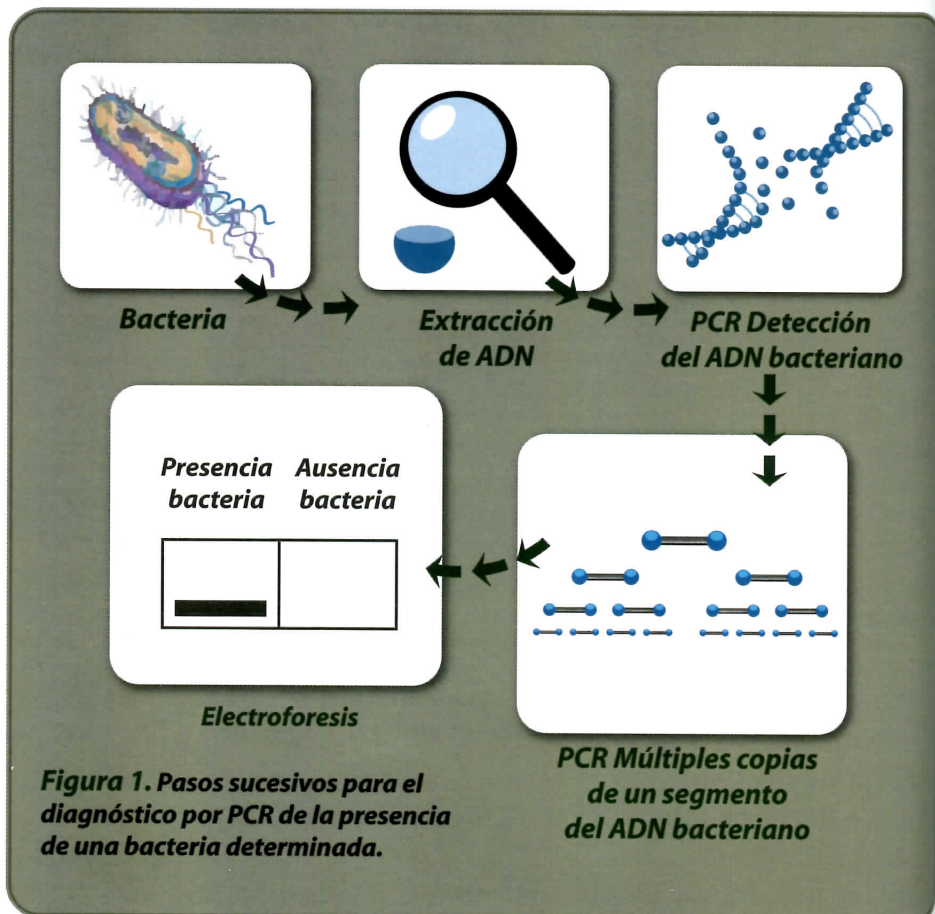


La Reacción en Cadena de la Polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular que fue desarrollada en los años 80, cuyo objetivo es identificar una región específica del ADN (material genético) y obtener en pocas horas millones de copias de dicho fragmento particular.

La técnica PCR tiene multitud de aplicaciones:

- Identificación de personas (cadáveres).
- Pruebas de paternidad, maternidad o parentesco en humanos y animales.

- Identificación de agresores en casos penales.
- Diagnóstico de enfermedades hereditarias y genéticas en humanos y animales (ejemplos: síndrome freemartin en bovinos, síndrome del estrés porcino, granulocitopatía bovina – BLAD).
- Identificación de variantes genéticas de interés económico en animales de producción (ejemplo: alelos del gen kappa-caseína en bovinos, bufalinos y caprinos; alelos del gen IGF2 en porcinos, entre otros).
- Detección de presencia de virus, bacterias y protozoarios en humanos y animales.



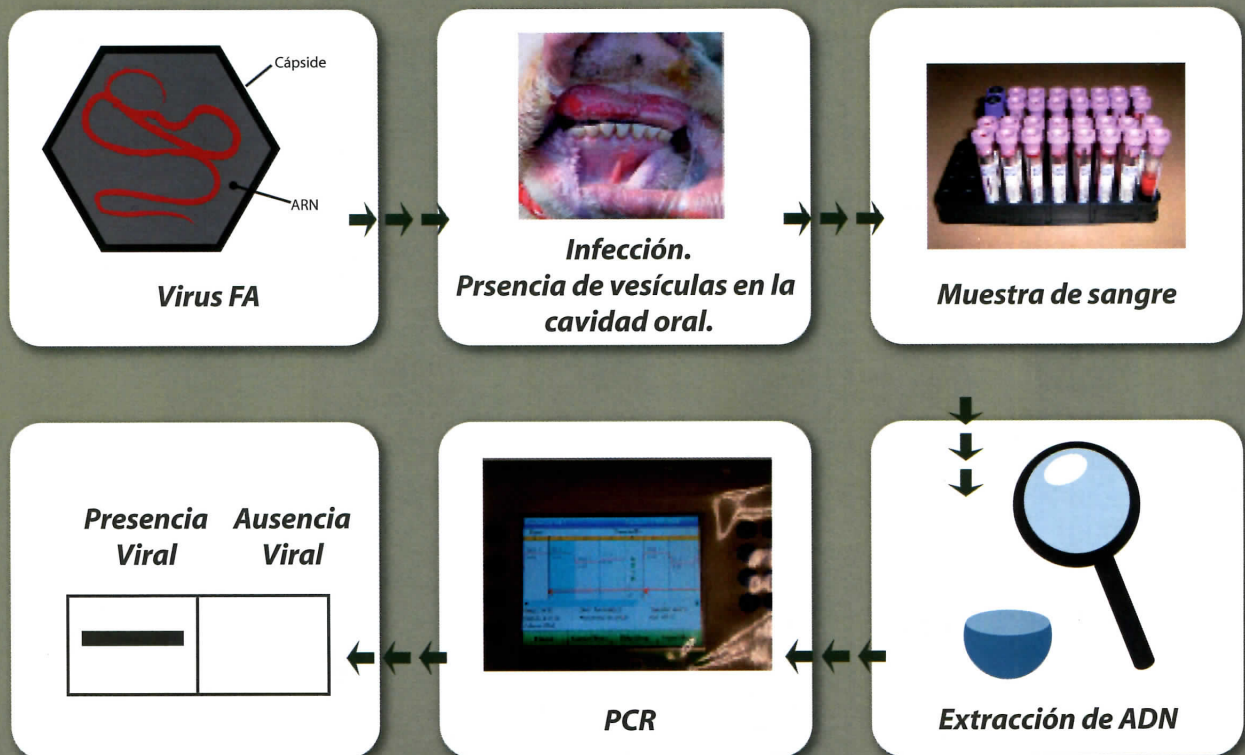
La primera aplicación de la técnica PCR en las enfermedades infecciosas fue la detección de *Escherichia coli* en cultivos de heces, por Monley en 1980. Más tarde aumentó en forma considerable la disponibilidad de sondas de ADN capaces de identificar agentes bacterianos, virales, micóticos y parasitarios. En la actualidad es posible detectar cualquier patógeno, a pesar de la información limitada de su secuencia; además se puede obtener información de su virulencia y sensibilidad a fármacos.

Ejemplo: detección por PCR de enfermedad infecciosa producida por virus

Fiebre aftosa. La fiebre aftosa o glosopeda (FA) es causada por un virus del género *Aftovirus*, de la familia *Picornaviridae*. Existen siete variedades del virus: O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3 y Asia1. La infección con un serotipo determinado no confiere inmunidad contra otros. De las especies domésticas, el ganado vacuno, porcino, ovino, caprino y los búfalos resultan susceptibles a la FA (FAO, 1984). La infección provoca la aparición de vesículas en las patas, dentro y alrededor de la cavidad oral, y en las glándulas mamarias de las hembras.

Se puede utilizar la PCR para detectar y amplificar los fragmentos del genoma del virus para su diagnóstico, a partir de muestras de epitelio, leche, sangre y muestras faringoesofágicas (Amarel-Doel et al., 1993; Bastos, 1998) (Figura 2). La PCR tiene una sensibilidad comparable a la del aislamiento de virus (Alexandersen et al., 2002, Reid et al., 2001), y los procedimientos automatizados mejoran el rendimiento de la muestra (Reid et al., 2003). Se ha estandarizado la técnica para distinguir cada uno de los siete serotipos.

Figura 2. Contaminación de un bovino por parte del virus FA y los pasos sucesivos para el diagnóstico por PCR.





Ejemplo: detección por PCR de enfermedad infecciosa producida por protozoarios

Babesiosis bovina. La babesiosis bovina está causada por protozoarios del género *Babesia* que parasitan los glóbulos rojos. Las especies que afectan al ganado bovino son dos – *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* – y la garrapata *Boophilus microplus* es el vector principal (Friedhoff, 1988), caracterizándose por la presencia de fiebre, hemoglobinuria y anemia hemolítica.

Los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han demostrado ser muy sensibles, particularmente en la detección de *B. bovis* y *B. bigemina* en animales portadores infectados (Calder et al., 1996). Para el diagnóstico de *Babesia bovis* se han diseñado secuencias para detectar y amplificar fragmentos del gen SSrRNA (Calder et al., 1996), que han demostrado alta sensibilidad y son capaces de identificar niveles de menos de 30 eritrocitos infectados por mililitro de sangre, lo que equivale a una parasitemia de aproximadamente 0,000001%.

Ejemplo: detección por PCR de enfermedades infecciosas producida por bacterias

Mastitis bovina (MB). Es la inflamación de la glándula mamaria, por lo general debido a una infección microbiana. Esta enfermedad representa pérdidas de miles de dólares cada año para los productores de leche de todo el mundo, debido principalmente a la disminución en el volumen de leche en detrimento de la calidad y de mayores costos de producción. Las bacterias responsables de la MB se clasifican como ambientales (*Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus parauberis* y *Streptococcus uberis*) o contagiosas (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*) (Bramley, 1996; Smith, 1996).

La técnica de PCR ha sido descrita como un método para identificar los agentes patógenos implicados en las infecciones intramamarias de las hembras bovinas debido a su precisión, alto límite de detección y rapidez, a partir de muestras de leche. En diferentes investigaciones, a través de la PCR, se han detectado y amplificado regiones del ADN bacteriano muy específicas para cada bacteria (Giovannoni et al., 1988). Se ha evaluado el nivel de sensibilidad de la prueba de PCR para la detección de las células bacterianas. Los límites de detección de la prueba de PCR realizadas en muestras de leche cruda inoculadas ha sido hasta de 10 unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro (Cremonesi et al., 2006).



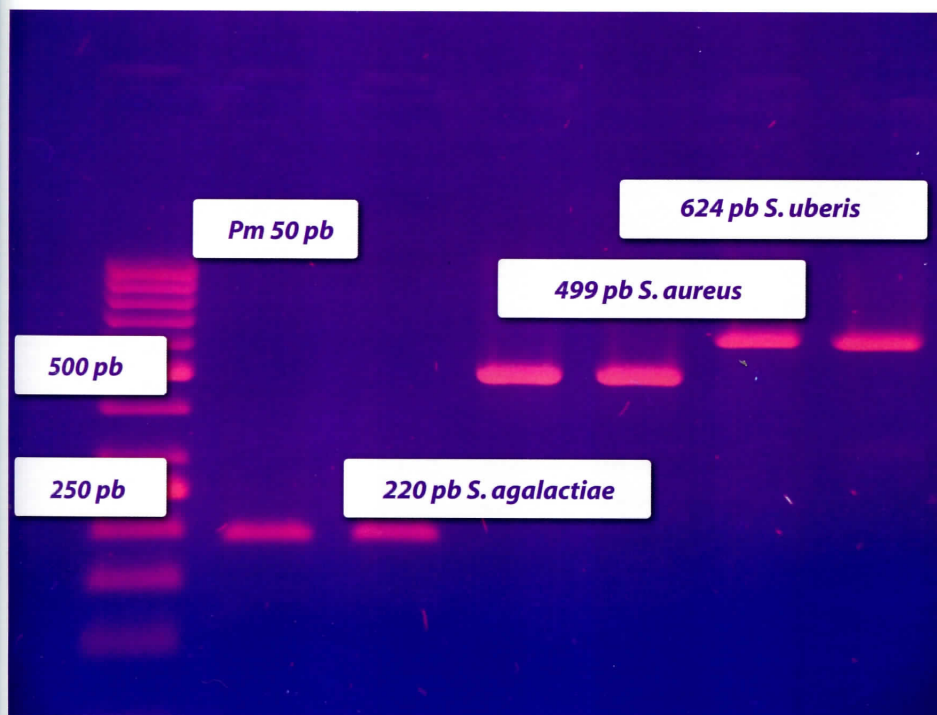


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa BPF 2%.

Carril 1: marcador de peso molecular 50 pb.

Carril 2 y 3: ADN extraído de muestras de leche inoculadas con *S. agalactiae*. Amplificación fragmento 220 pb.

Carril 4 y 5: ADN extraído de muestras de leche inoculadas con *S. aureus*. Amplificación de fragmento de 499 pb.

Carril 6 y 7: ADN extraído de muestras de leche inoculadas con *S. uberis*. Amplificación de fragmento de 624 pb.

Fuente: Resultados parciales investigaciones Departamento Asistencia Técnica COLANTA.

Conclusiones

Las experiencias de las dos últimas décadas indican que las técnicas de la PCR finalmente sustituirán a muchos de los métodos directos clásicos de detección de agentes infecciosos. Es claro que la PCR está reemplazando el aislamiento de virus o el cultivo de bacterias para la detección de agentes que son difíciles o imposibles de cultivar.

Hay varias razones para esta tendencia. El aislamiento de virus o el cultivo de bacterias para la detección de agentes requiere:

1. La presencia y la viabilidad de los microorganismos que se replican (virus o bacterias).

2. Cultivos celulares caros y mantenimiento de las instalaciones.

3. El diagnóstico, en algunas ocasiones, se tarda varias semanas.

Aunque los ensayos de la PCR inicialmente eran caros y complicados, hoy en día son herramientas relativamente baratas, seguras y fáciles de utilizar en los laboratorios de diagnóstico. Generalmente, la sensibilidad y la especificidad de la PCR son mayores que los procedimientos ELISA de captura del antígeno. La introducción de varios métodos de la PCR en tiempo real, de extracción del ácido nucleico, ha dado como resultado hoy en día un gran volumen de trabajos y ensayos muy fiables, rápidos y sólidos para el diagnóstico molecular.

La principal ventaja de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) radica en la posibilidad de obtener resultados utilizando sólo nanogramos de ADN obtenido de las muestras de leche, lo que permite la eliminación de los cultivos y facilita el análisis.

Adicional al diagnóstico de patógenos como virus, bacterias, hongos y protozoos, la PCR se utiliza a nivel mundial para el diagnóstico de enfermedades hereditarias y genéticas, pruebas de parentesco e identificación de variantes genéticas de interés económico en animales de producción, entre otros. ●



BIBLIOTECA

Referencias

ALEXANDERSEN, S. et al. 2002. Quantities of infectious virus and viral RNA recovered from sheep and cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus O UK 2001. *In: J. Gen. Virol.* Vol. 83, no. 8, p. 1915–1923.

AMAREL-DOEL, C. M. F. et al. 1993. Detection of foot-and mouth disease viral sequences in clinical specimens and ethyleneimine -inactivated preparations by the polymerase chain reaction. *In: Vaccine.* Vol. 11, p. 415–421.

BASTOS, A. D. S. 1998. Detection and characterization of foot-and-mouth disease virus in sub-Saharan Africa. Onderstepoort. *In: J. Vet. Res.,* Vol. 65, p. 37–47.

BRAMLEY, A. J. Current concepts of bovine mastitis. National Mastitis Council, Madison, Wis. 1996.

CALDER, J. A. M. et al. 1996. Monitoring *Babesia bovis* infections in cattle by using PCR-based tests. *In: J. Clin. Microbiol.,* Vol. 34, p. 2748–2755.

CREMONESI, P. 2006. Improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. *In: J. Dairy Sci.* Vol. 89, p. 163–169.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Emerging Diseases of Livestock. Vol. 1. The Diseases and their Diagnosis, Geering W.A. Rome: FAO, 1984, p. 43–51.

FRIEDHOFF, K. T. Transmission of *Babesia*. *In: Babesiosis of Domestic Animals and Man,* Ristic M., ed. CRC Press. Boca Raton, Florida. 1988, p. 23–52.

GIOVANNONI, S.J. 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *In: J. Bacteriol.* Vol. 170, p. 720–726.

REID, S. et al. 2000. Primary diagnosis of foot-andmouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction. *In: J. Virol. Methods,* p. 167–176.

REID, S. et al. 2001. Diagnosis of footand- Mouth disease by real-time fluorogenic PCR assay. *In: Vet. Rec.,* Vol. 149, p. 621–623.

REID, S. M. et al. 2003. Evaluation of automated RT-PCR to accelerate the laboratory diagnosis of foot-and-mouth disease virus. *In: J. Virol. Methods.* Vol. 107, no. 2, p. 129–139.

SMITH, B. P. Large animal internal medicine, 2 ed. Mosby, Boston: Mass, 1996, p. 1181–1193.



Fotografía: Ximena Cardona L.