

Avances de técnicas moleculares para el diagnóstico de enfermedades virales de los animales, aplicadas en el INIA

Trujillo U. María A
Bracamonte Magali B
Castro María
Obando Cesar
Hidalgo Mayra
Brett Mariela
Medina Gladys
Conde Florangel

*Investigadores. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas.
INIA CENIAP. Sanidad Animal.
Correo electrónico: mtrujillo@inia.gob.ve*

En las últimas décadas se ha observado un incremento de las enfermedades emergentes y reemergentes a nivel mundial, las cuales constituyen un serio problema para la comunidad internacional por el impacto sanitario y económico que provocan, ya que son elevados los costos de las medidas de control muchas veces basadas en el sacrificio de los animales infectados y los que han estado en contacto con estos. A este problema se suman las actuales tendencias de globalización, el incremento en el movimiento internacional de pasajeros, animales, productos y subproductos de origen animal y las relaciones económicas en diferentes regiones del mundo, constituyen un problema de seguridad regional, nacional y global, se debe contar con los medios para un diagnóstico rápido y efectivo de las enfermedades, incluso en los casos donde el polimorfismo clínico y el numeroso conjunto de diferenciales dificultan el diagnóstico conclusivo, para tomar las medidas necesarias y oportunas.

La implantación de técnicas de diagnóstico altamente específicas y sensibles contribuye de manera importante con los sistemas de salud animal y la salud pública del país. La difusión de estas metodologías permitirá incorporar al sistema diagnóstico nacional otras instituciones como universidades y entes privados entre otros, ampliando el sistema nacional de diagnóstico veterinario y fortaleciendo los programas nacionales de control de enfermedades.

En el marco del convenio Cuba-Venezuela se ejecutó un proyecto donde se emplearon técnicas de biología molecular, específicamente la de PCR con algunas de sus variantes, para la detección de agentes infecciosos utilizando cebadores específicos, donde se evaluó su capacidad para un

diagnóstico más eficiente de enfermedades en las diferentes especies de producción y de interés económico para ambos países.

A continuación, algunas definiciones:

Biología molecular: Ciencia que trata de explicar el funcionamiento de los seres vivos de acuerdo con las estructuras de sus constituyentes y las interrelaciones funcionales entre las macromoléculas que los forman.

Técnica molecular: Toda aquella actividad que aplica los conocimientos científicos relacionados con la constitución genética de los seres vivos.

Cebador: Se conoce con el nombre de **cebador** o **primer** a una secuencia polinucleotídica de longitud variable, no inferior a cinco nucleótidos. Cebador y **primer** son nombres equivalentes, es decir, uno es la traducción del otro. Cebador se refiere a todo dispositivo capaz de iniciar una reacción física o química.

Avances en el diagnóstico molecular de la fiebre aftosa

La Fiebre Aftosa es una enfermedad de declaración obligatoria en nuestro país, por su elevada morbilidad y mortalidad en la ganadería bovina principalmente, afectando la producción nacional y las posibilidades de poder competir en el mercado internacional. Su diagnóstico oportuno y veraz, contribuiría enormemente en el éxito de los programas de control y erradicación de esta enfermedad. En tal sentido se logro estandarizar técnicas de diagnóstico molecular de los virus vesiculares que afectan principalmente a los bovinos, entre las cuales se mencionan:

- Optimización de la técnica reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR) para detección de virus tipo "O" de fiebre aftosa (Figura1).
- Optimización de la técnica RT-PCR para detección de virus tipo "A" (Figura 2).
- Estandarización y optimización de la técnica RT-PCR para el gen 3D del virus de fiebre aftosa
- Ensayos de RT-PCR de muestras provenientes del banco de epitelios del laboratorio con diagnósticos negativos al virus de fiebre aftosa.
- Se logró la estandarización de la técnica de RT-PCR para el género alfavirus (una ronda, dos primers).

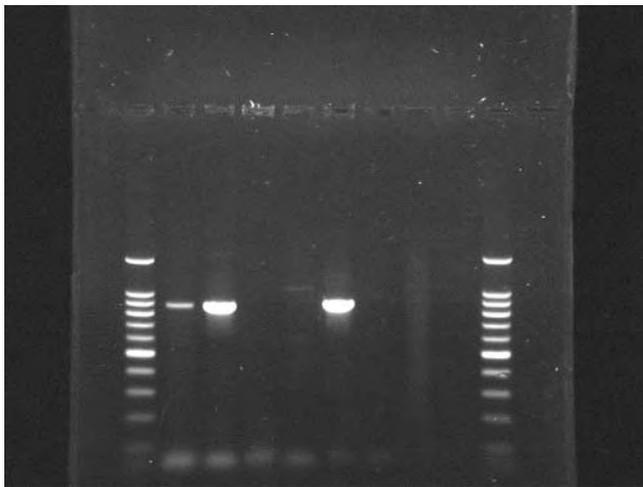


Figura 1. RT-PCR fiebre aftosa tipo A.

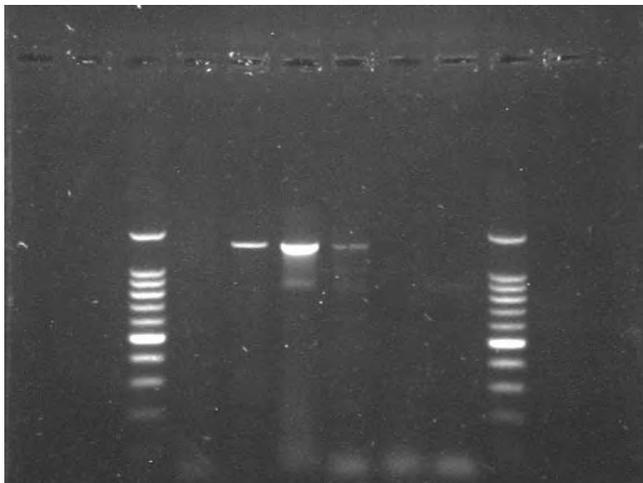


Figura 2. RT-PCR fiebre aftosa tipo O.

Avances en el diagnóstico molecular de patología virales que afectan a las aves

La aplicación de metodologías de biología molecular para caracterizar algunos patógenos, como es el caso de bronquitis infecciosa aviar (Figura 3), enfermedad infecciosa de la bursa y newcastle, ha sido un gran avance para el control de estas enfermedades, sin embargo, se requiere validar otras metodologías como la hibridación in situ, o caracterizar otros agentes como son Anemia Infecciosa Aviar e Influenza aviar, de tal modo de continuar avanzando en la vigilancia epidemiológica de enfermedades como estas, que afectan a las aves. Entre los avances alcanzados en el diagnóstico molecular de las enfermedades de las aves, con las nuevas tecnologías transferidas entre Cuba y Venezuela, se mencionan:

- Caracterización por RFLP 4 cepas de bronquitis infecciosa aviar.
- Amplificación genómica de 20 cepas del virus de NewCastle.
- Amplificación genómica de 5 cepas del virus de Gumboro.

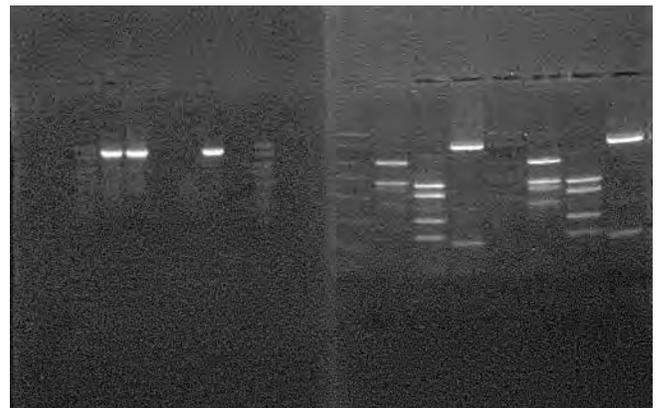


Figura 3. Detección del ARN del virus de bronquitis infecciosa aviar.

Diagnóstico del virus de Lengua Azul

Para esta enfermedad que afecta a los bovinos, se desarrolló la técnica de RT-PCR para el virus Lengua Azul usando la técnica nested (dos rondas, cuatro primers) con oligonucleótidos específicos para Lengua Azul.

Por otra parte se aislaron ocho cepas del virus de Lengua Azul a partir de sangre heparinizada de bovinos. Además, se logro intercambio con el CENSA (Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria) de Cuba, de cepas de Herpesvirus bovino tipo 1 y 2 (Figura 4) y cepas de diarrea viral ovina no citopática.

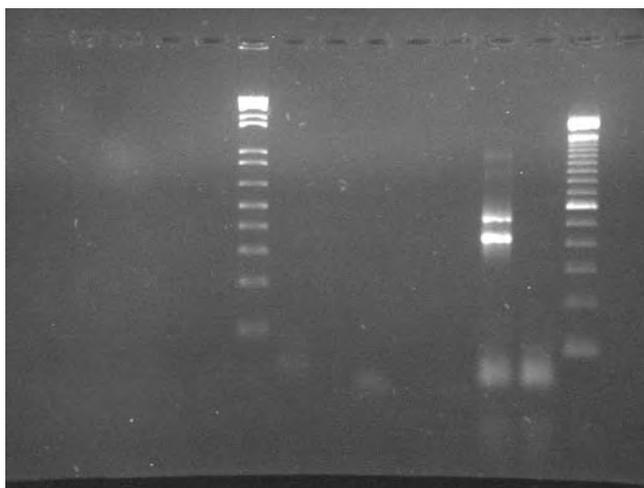


Figura 4. Detección del herpes virus bovino tipo II

Gracias al intercambio y transferencia de tecnologías entre Cuba y Venezuela se obtuvieron resultados y avances significativos, en el diagnóstico de enfermedades virales que afectan a los animales de interés productivo.

Es imperativo continuar, a la par de los progresos tecnológicos, estandarizando y desarrollando nuevas técnicas moleculares para el diagnóstico de las enfermedades que afectan a las diferentes especies animales de interés productivo para nuestro país, de tal forma de poder ofrecer un servicio eficiente, veras y oportuno, sustituyendo o apoyando las técnicas convencionales; para así contribuir en el control y erradicación de patologías que afectan a los animales que repercuten en el desarrollo económico, social y político de nuestros pueblos.

Bibliografía Consultada

- Corvalan, A. 2002. Biología molecular en infectología. Parte I: Desarrollo y metodologías. Revista chilena de infectología; 19 (1): 14-24.
- Livak, J., S. Flood, J. Marmano, W. Guisti and K. Deetz. 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. PCR Methods App. 4:357-62.
- Inoshima, Y., A. Morocka and H. Sentsui. 2000. Detection and diagnosis of parapoxvirus by the polimerase chain reaction. J. Virol. Methods (84): 201-208.
- D'Offay, J., J. Floyd, R. Eberle, J. Saliki, J. Brock, G. D'Andrea and K. MCMillan. 2003. Plenum press, use of a polymerase chain reaction assay to detect bovine herpesvirus type 2 DNA in skin disease. JAVMA, 222, 1404-1407.

