

Capítulo XX

La genética molecular como herramienta para el diagnóstico de patologías en la Ganadería Doble Propósito

Jesús Maldonado, MSc

INTRODUCCIÓN

Biología molecular es la ciencia que estudia la vida y los mecanismos que operan, a nivel molecular, en todos los organismos vivientes. La genética molecular como rama de la biología molecular se encarga del estudio profundo del material genético. La genética molecular tiene entre sus antecedentes el modelo estructural del ácido desoxirribonucleico (ADN) propuesto por Francis Crick y James Watson en 1953, estudio que marcó el verdadero inicio del análisis biológico molecular.

En Venezuela, el diagnóstico molecular, sobre todo a nivel veterinario, ha sido utilizado fundamentalmente en programas de investigación científica. Sin embargo, en la actualidad la necesidad de emitir diagnósticos más certeros y oportunos ha transformado prácticamente en exigencia el hecho de aplicar las técnicas moleculares de forma rutinaria en el ámbito veterinario y por ende en la ganadería doble propósito.

En este capítulo fundamentalmente nos referiremos a la aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés) aplicada al diagnóstico veterinario. La PCR es una técnica de laboratorio que permite copiar *in vitro* secuencias específicas de ADN y duplicarlas, proceso que repitiéndose un número determinado de veces (ciclos), permite obtener como resultado un aumento exponencial (amplificación) del número de copias con las que inicialmente comienza la reacción, y así determinar la presencia del patógeno a investigar en caso de que esté presente en la muestra analizada. Existen diversas variantes de la PCR y cada una presenta una serie de características que le puede conferir ventajas técnicas o económicas en el diagnóstico veterinario.

No obstante, en términos generales la principal ventaja de la PCR es su extrema sensibilidad y especificidad. Caso sin excepción, no existen otros análisis de laboratorio que puedan competir con los estudios moleculares al momento de evaluar el grado de sensibilidad y especificidad; además, la técnica destaca por generar y hasta cuantificar resultados en breves períodos de tiempo y lo que es muy im-

portante a partir de una mínima cantidad del patógeno lo que nos asegura poder hacer diagnósticos más certeros.

Sin embargo, la extrema sensibilidad que tiene la técnica, constituye al mismo tiempo su principal inconveniente porque pequeños errores en la implementación de la técnica pueden conllevar a contaminaciones con el propio material amplificado que pueden conducir a diagnósticos errados por falsos positivos; además en algunas ocasiones se presentan amplificaciones inespecíficas difíciles de resolver. Esta particularidad de la técnica, obliga a contar con infraestructura, consumibles y reactivos apropiados, personal capacitado y que en cada análisis sean incluidos una batería de controles que nos permita llegar a un diagnóstico preciso.

A pesar de algunas limitantes, la introducción de la biología y más específicamente de la genética molecular aplicada a exámenes especiales, constituye un progreso significativo que rompe esquemas en el diagnóstico tradicional. No cabe duda que este nuevo paso abrirá todo un universo biomolecular capaz de cubrir muchas necesidades, sobre todo complementando y/o optimizando los esquemas diagnósticos convencionales.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Según la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE, 2000), la aplicación de métodos de genética molecular para el diagnóstico de enfermedades infecciosas y el desarrollo de vacunas ha venido creciendo en los últimos años de manera sustancial, no obstante, para que estos métodos moleculares sean ampliamente utilizados, necesitan ser:

- Fáciles de aplicar, razón por la cual deben superarse una serie de complicaciones técnicas que en algunos esquemas imposibilitan su uso rutinario.
- Seguros, tanto para el usuario, como para la muestra y el medio-ambiente. Por esta razón las medidas de bioseguridad deben ser muy estrictas a la hora de implementar este tipo de metodologías diagnósticas.
- Sensibles, porque generalmente este punto es la principal ventaja de las técnicas diagnósticas moleculares, permitiéndoles detectar patógenos que no se pueden diagnosticar con otras metodologías.
- Reproducibles, porque es imprescindible que los resultados obtenidos en un laboratorio sean equivalentes a los obtenidos en otros laboratorios, siempre que se trate de la misma muestra y que sea procesada con la misma técnica.
- Susceptibles a automatización, lo que permita manejar grandes números de muestras.

Usos del Diagnóstico Biotecnológico

Las herramientas de biología molecular aplicadas al diagnóstico veterinario, presentan una serie de características, sobre todo sustentadas en la enorme sensibilidad y especificidad que estos ensayos pueden alcanzar, lo que les confieren ventajas en los siguientes aspectos:

- Implementación de Pruebas de Oro o “*Gold Standard*” para el diagnóstico definitivo de ciertas enfermedades o para establecer ensayos comparativos con otras metodologías diagnósticas de rutina.
- Detección de Patógenos que cursan con sintomatología crónica, que son muy difíciles de detectar por otros métodos directos (por ejemplo, mediante observación microscópica), o indirectos (por ejemplo ensayos serológicos).
- Donde el diagnóstico serológico no pueda ser usado, bien sea por la débil o ausente respuesta humoral o por la confusión entre los títulos de anticuerpos producto de una infección de campo o una vacuna.
- En estudios muy precisos de índole científico, donde es muy importante la determinación certera de la presencia o ausencia de determinado patógeno.

Tipos de Diagnóstico Biotecnológico

Como se indicó anteriormente, en este capítulo nos referiremos fundamentalmente al diagnóstico molecular utilizando la técnica de PCR, no obstante el uso de herramientas biotecnológicas aplicadas al diagnóstico puede orientarse básicamente hacia:

- La detección de ácidos nucleicos de un determinado patógeno.
- El reconocimiento de ciertas proteínas específicas de un microorganismo.
- La determinación cualitativa y/o cuantitativa de anticuerpos generados específicamente contra un determinado organismo o componentes del mismo.

Detección de Ácidos Nucleicos de un determinado patógeno con fines diagnósticos

Con la finalidad de estudiar los ácidos nucleicos, los biólogos han desarrollado un gran número de técnicas que usadas racionalmente pueden ser perfectamente adaptables al diagnóstico veterinario, dentro de estas técnicas destacan:

- El Polimorfismo de longitud de fragmentos por restricción (RFPL).
- La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés).
- Las Sondas y Micro-arreglos de ADN.

Debido a la versatilidad, facilidad y costos de la técnica, sólo discutiremos algunos aspectos básicos de la PCR.

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La PCR es una metodología que resulta de la aplicación práctica de los principios de duplicación celular del material genético. Comienza con la desnaturalización del ADN para obtener ADN monocatenario o hebras sencillas de ADN, seguida de una hibridación específica de esta hebra sencilla con un oligonucleótido cebador y culmina con la duplicación de la hebra sencilla mediante la acción de una ADN polimerasa a partir del cebador. Al aplicar de forma cíclica estos tres procesos se obtienen múltiples copias del fragmento blanco en muy poco tiempo.

El proceso se realiza fundamentalmente con los siguientes reactivos. Cuatro desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTP's) como sustrato para la síntesis del nuevo ADN. Para que estos puedan ser reconocidos por la ADN polimerasa deben estar acompañados de Mg^{2+} . También se requiere la presencia de los oligonucleótidos cebadores de cadena sencilla, generalmente sintéticos y cuyo tamaño casi nunca excede los 30 nucleótidos; las secuencias de estos cebadores deben ser complementarias a los extremos 3' de la región blanco, por esta razón, la región donde hibridan los cebadores define la longitud del fragmento amplificado. Por último, se necesita una ADN polimerasa termoestable, es decir, que sea enzimáticamente activa a temperaturas relativamente altas (entre 75 y 95°C); la naturaleza termoestable de la enzima permite la utilización de la misma en ciclos sucesivos sin perder actividad, además, la replicación a estas temperaturas impide la formación de híbridos mal apareados y contribuye a la especificidad y rendimiento del proceso.

Una vez que se han colocado en el tubo de reacción las cantidades adecuadas de todos los reactivos y la muestra, la mezcla se coloca en un termociclador (Figura 1), aparato que controla el número de ciclos, además del tiempo y temperatura de cada uno de los ciclos requeridos para amplificar el ADN blanco. Cada ciclo consta de tres etapas:

- Desnaturalización: en esta etapa se produce la separación de las dos hebras de ADN de la muestra, mediante incubación durante 30 a 120 segundos, a una temperatura mayor que la temperatura de fusión del segmento de ADN blanco, generalmente entre 68 y 97°C.
- Templado: el enfriamiento rápido por debajo de la temperatura de fusión del segmento de ADN blanco, permite la hibridación de las hebras sencillas de ADN que contiene la secuencia de interés, con los oligonucleótidos cebadores. Normalmente se usan temperaturas que van desde los 37°C hasta los 65°C; esta temperatura se mantiene durante 10 a 120 segundos.
- Elongación: es la etapa de amplificación propiamente dicha en la que la ADN polimerasa termoestable amplifica los cebadores, empleando como molde las hebras originales con la secuencia blanco (Bruce *et al.*, 1994; González, 1999; Luque y Herráez, 2001; Rawn, 1989; Sambrook *et al.*, 1989).



Figura 1. Termociclador, equipos de electroforesis horizontal y transiluminador de luz U.V.

En resumen, la reacción en Cadena de la Polimerasa es fundamentalmente una técnica de clonación acelular, que tiene como objetivo obtener un conjunto de moléculas de ADN genéticamente idénticas entre sí y a su precursora. Es importante acotar que como cada componente individual de un clon contiene la misma información genética, la PCR produce una amplificación genética y es esta amplificación masiva de una determinada secuencia de ADN la que le brinda a la PCR su papel en el diagnóstico.

Como se comentó anteriormente, la PCR tiene una serie de requerimientos técnicos que pueden limitar su aplicación en el campo diagnóstico, entre estas limitaciones destacan:

- Para implementar la técnica de PCR, en la mayoría de los casos se requiere conocer parte de la secuencia del fragmento de ADN a amplificar.
- Se necesita personal calificado para diseñar e implementar la técnica de PCR.
- Es necesario contar con equipos, materiales y reactivos especiales para amplificar las moléculas de ADN hasta hacerlas detectables por algún método.
- Se requiere la infraestructura adecuada para minimizar los riesgos de contaminación de las muestras y/o reactivos o equipos.

LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA UCLA

En la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (UCLA) se cuenta con un Laboratorio de Diagnóstico Molecular donde se han venido desarrollando, optimizando y modificando metodologías serológicas y moleculares que servirán de herramientas que contribuyan en el conocimiento del estatus sanitario animal.

Actualmente se está trabajando en el diagnóstico de las siguientes patologías de interés veterinario: Anaplasmosis, Brucelosis, Leptospirosis, Neosporosis, Fiebre Q, Rinotraquitis Infecciosa Bovina (IBR) y Diarrea Viral Bovina (DVB). Como un ejemplo del trabajo que realiza el Laboratorio de Diagnóstico Molecular de la UCLA, se hará referencia especial al desarrollo alcanzado en el Diagnóstico de *Anaplasma* spp.

ANAPLASMOSIS

La enfermedad es producida por *Anaplasma marginale*, una protobacteria que se multiplica en los eritrocitos (Kocan y col., 2003). Se asume que el patógeno es transmitido biológicamente por garrapatas, mecánicamente por dípteros hematófagos (Brown y col., 1998), iatrogénicamente (Wanduragala y Ristic, 1993) o por vía transplacentaria (Zaugg, 1984).

Diagnóstico

El diagnóstico de la patología puede llegar a ser complejo, a pesar de la alta prevalencia de la enfermedad en la mayor parte de las zonas tropicales y sub-tropicales, en este sentido tenemos que:

- Cuando nos basamos en el diagnóstico clínico, la anaplasmosis comparte muchos síntomas con otras enfermedades causadas por otros agentes hemotrópicos.

- Aunque el diagnóstico patológico es orientador, no existe ningún síntoma o hallazgo “patognomónico” que permita llegar a un diagnóstico definitivo.
- El diagnóstico epidemiológico orienta al veterinario hacia la o las enfermedades presentes en una determinada zona y por lo tanto es de principal importancia a la hora de llegar a una conclusión diagnóstica.
- Como en todos los casos, el Diagnóstico de Laboratorio, sólo es una herramienta con la que cuenta el clínico para confirmar o descartar las sospechas diagnósticas que el análisis clínico le ha sugerido. No obstante, el laboratorio le permite al veterinario clínico llegar a un diagnóstico definitivo de una determinada patología, cuando se aplica la técnica adecuada.

En este sentido, el diagnóstico es complejo porque los signos clínicos son comunes a varias hemoparasitosis (OIE, 2000). La identificación del patógeno en frotis constituye una evidencia diagnóstica importante (Figura. 2), pero esto sólo es posible cuando hay alta rickettsemia o alta carga del patógeno en la muestra. Es por esto, que mediante un buen frotis sanguíneo, se puede detectar la presencia del patógeno sólo cuando hay más de 1.000.000 de eritrocitos parasitados de los 10^9 (1000.000.000) eritrocitos que hay en cada mL de sangre de un bovino. Por lo tanto, la sensibilidad de un buen frotis, en el mejor de los casos le permite detectar al patógeno cuando el 0,1% de los eritrocitos totales esta parasitado.

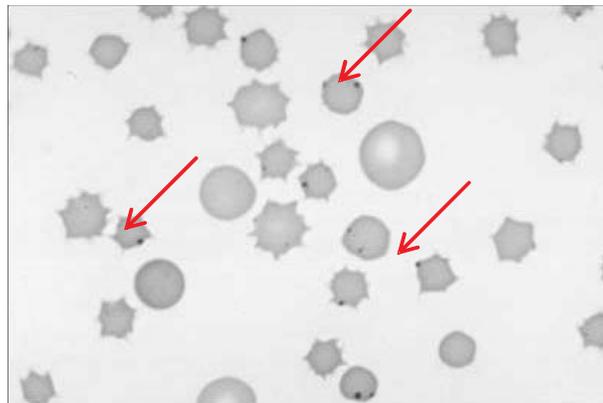


Figura 2. Foto de un frotis sanguíneo con eritrocitos infectados con *Anaplasma marginale* (flechas).

Para aumentar la sensibilidad diagnóstica y manejar en corto tiempo importantes volúmenes de muestras, se han implementado varias pruebas inmunodiagnósticas, pero éstas generalmente carecen de la sensibilidad y especificidad requerida para realizar el diagnóstico apropiado; no obstante, actualmente se cuentan con varios formatos de ELISA que han superado los problemas de sensibilidad (Torioni y col., 1998) pero que no son capaces de determinar cuál es la especie de *Anaplasma* que esta provocando la respuesta inmune, razón por la cual un resultado positivo en este formato de inmunoensayo puede indicar infección por *A. marginale*, pero también puede ser por *A. centrale* o *A. phagocitophilum*.

Diagnóstico molecular de *A. marginale*

La implementación de técnicas moleculares generalmente se ha asociado a trabajos de investigación; no obstante, su uso en estudios epidemiológicos en anaplasmosis y en el diagnóstico es factible al implementar la técnica de PCR anidado o doble PCR (nPCR), pudiéndose considerar como prueba definitiva para identificar animales verdaderamente infectados (OIE, 2000). En el nPCR se realizan dos rondas de amplificación, donde el producto de la primera ronda sirve de molde para la segunda ronda de amplificación, obteniéndose generalmente mayor sensibilidad y en algunos casos mayor especificidad, aunque aumentando la posibilidad de contaminaciones por la manipulación de los tubos con grandes cantidades del ADN previamente amplificado.

¿Por qué utilizar la PCR para el diagnóstico de *A. marginale*?

- Porque es un método diagnóstico extremadamente sensible.
- Porque es un método diagnóstico extremadamente específico.
- Porque según la OIE, constituye la “Prueba de Oro” para esta enfermedad en particular (OIE, 2000).
- Porque se pueden validar otras metodologías diagnósticas partiendo de los resultados del nPCR.

Ventajas del diagnóstico de *A. marginale* con PCR

- Diagnóstico preciso y certero de la presencia de *A. marginale* y/o *A. centrale* y/o *A. phagocitophilum*. en las muestras analizadas.
- Uso en estudios clínicos y epidemiológicos bajo nuestras propias condiciones.
- Un adecuado uso serviría al momento de exportar animales a otros países.
- La experiencia obtenida sirve de base para el diagnóstico de otros patógenos.

Desventajas del diagnóstico de *A. marginale* con PCR

- Costos relativamente elevados.
- Se requiere de personal técnico altamente capacitado.
- Si no se aplica racionalmente la técnica se tiene un alto riesgo de contaminación que puede conducir a diagnósticos errados.
- Sólo nos indica la presencia o ausencia de ADN del patógeno.
- No constituye una solución, es sólo una herramienta.

Algunos usos resaltantes de la PCR en la Anaplasmosis

- Campo clínico.
- Campo epidemiológico.
- Dirigir estrategias de control.
- Determinación del rol de los vectores imputados en la transmisión.

- Impacto de la transmisión transplacentaria.
- Importancia de la transmisión iatrogénica.

Aplicación de la PCR en la detección específica de *A. marginale* y su diferenciación, a nivel molecular del *A. centrale*.

A manera de ejemplo sólo ilustraremos algunos de los resultados obtenidos. En nuestro laboratorio se conduce un estudio de seroprevalencia y prevalencia molecular de *Anaplasma* spp. donde se trabaja en la genotipificación de las diferentes cepas de *Anaplasma marginale* presentes en las zonas de Venezuela incluidas en el estudio. Al mismo tiempo se evalúa la prevalencia de *A. centrale* y el impacto de la vacunación con este microorganismo en nuestros rebaños.

Es importante recordar que para escoger una metodología de diagnóstico molecular aplicada al diagnóstico de un patógeno en particular, ésta debe ser: fácil de implementar, segura, sensible, específica, reproducible y susceptible a automatización. En este sentido la implementación de la técnica de PCR y una de sus variantes la nPCR o PCR anidado cumple con gran parte de los requerimientos señalados, alcanzando una sensibilidad de 30.000 eritrocitos parasitados por mL de sangre para la PCR (Figura 3) y 30 eritrocitos parasitados por mL de sangre para la nPCR (Fig 4), lo que constituye un incremento en la sensibilidad diagnóstica de 3 y 5 órdenes de magnitud respectivamente, con respecto al diagnóstico de rutina mediante observación microscópica de frotis sanguíneos.

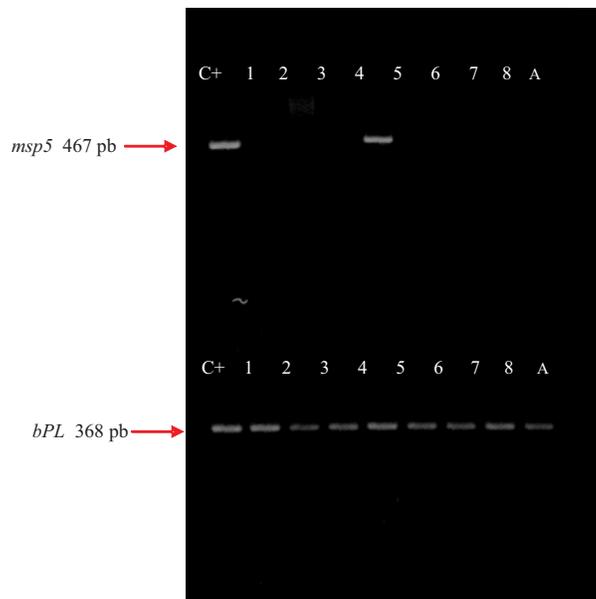


Figura 3. Foto de un Gel (PCR primera ronda) con el Amplificado de 467 p.b. correspondiente al gen *msp5* (C+ y 4, línea superior) y con el Amplificado del gen control bovino *bLP* de 368 p.b (línea inferior)

Fuente: Elaboración propia.

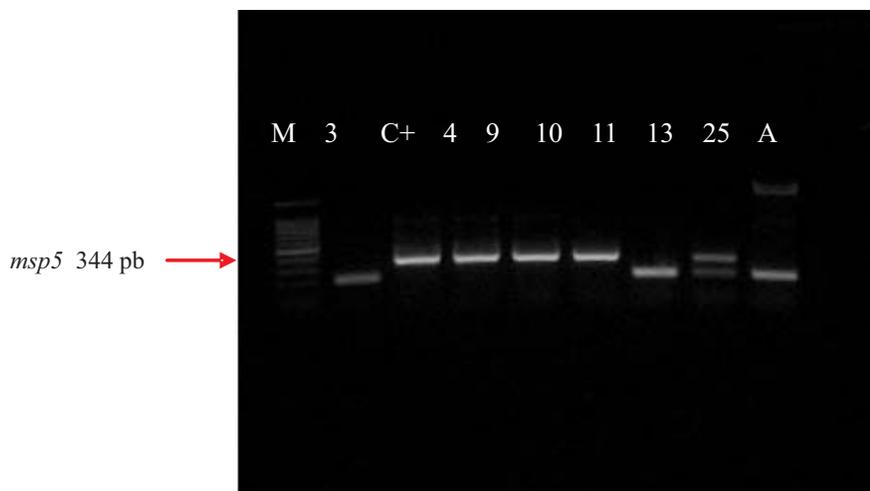


Figura 4. Foto de un Gel (nPCR segunda ronda) con el Amplificado de 344 p.b. correspondiente al gen *msp5* y amplificados inespecíficos (Muestras 3, 11, 13 y 25).
Fuente: Elaboración propia.

A pesar de la factibilidad de usar la técnica de PCR anidado (nPCR), considerada como la prueba definitiva para identificar animales verdaderamente infectados (OIE, 2000), su aplicación a nivel de laboratorios ha presentado importantes inconvenientes debido al alto número de falsos positivos por problemas de contaminación (OIE, 2004). Al igual que muchos otros laboratorios del mundo, al aplicar la metodología nPCR observamos amplificaciones inespecíficas que dificultaban el diagnóstico (Fig. 4), razón por la cual, en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular desarrollamos e implementamos otra variante de la PCR conocida como *one-stage nested PCR* o PCR anidada en una sola etapa (osnPCR), donde las dos rondas de amplificación están limitadas por la concentración de los oligonucleótidos externos.

Al implementar la osnPCR disminuyeron los riesgos de contaminación, reduciendo los costos de manera significativa; mantienen la alta sensibilidad diagnóstica del nPCR, a la vez que disminuyen el tiempo para obtener los resultados, lo que en conjunto permitió superar los problemas de inespecificidad y por ende, facilitó el diagnóstico de *A. marginale* en nuestro laboratorio (Figura 6).

Por otro lado se ha implementado la detección específica de *A. centrale* para estudiar el comportamiento del microorganismos en rebaños donde se ha inmunizado con este patógeno, evaluando su capacidad infectiva y su persistencia en dichos rebaños (Figura 7).

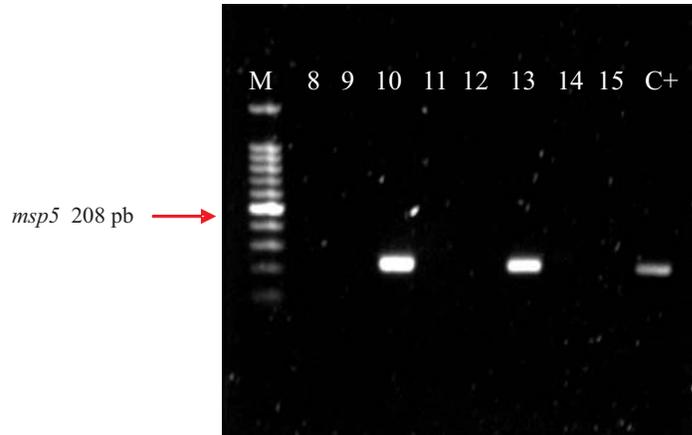


Figura 6. Gel con el amplificado de 208 p.b. correspondiente al gen *msp5* (muestras 10, 13 y el control positivo C+), al aplicar la osnPCR (Versión 1).
Fuente: Elaboración propia.

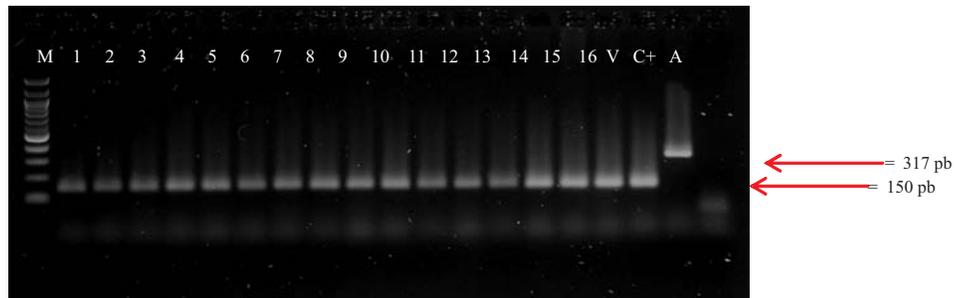


Figura 7. Gel con el amplificado de 150 p.b. correspondiente al gen *mpb58* de *A. centrale* (muestras 1 a la 15 y el control V) y el amplificado de 317 p.b. correspondiente el gen de *A. marginale* *msp5* (Muestra C+), al aplicar la osnPCR (Versión 2)
Fuente: Elaboración propia.

CONCLUSIONES

La implementación de técnicas de genética molecular en el ámbito del diagnóstico veterinario se está convirtiendo progresivamente en una de las principales herramientas con las cuales cuentan los laboratorios para llegar a diagnósticos cada vez más rápidos y precisos. Es por esto que su uso se ha comenzado a diseminar masivamente y para algunas enfermedades muy importantes, como es el caso de la Influenza Aviar altamente patógena, constituye la vía de monitoreo epidemiológico y de diagnóstico más aceptada a nivel internacional. Es probable que en muy pocos años estas técnicas complementen o sustituyan algunos de los esquemas de diagnóstico utilizados rutinariamente en la actualidad; pero más importante aun, es acotar que estas metodologías tienen sus desventajas y en algunos casos no pueden sustituir al diagnóstico convencional.

LITERATURA CITADA

- Brown W, Shkp V, Zhu D, McGuire T, Tuo W, McElwain T, Palmer G. 1998. CD4+ T-Lymphocyte and Immunoglobulin G2 Response in Calves Immunized with *Anaplasma marginale* Outer Membranes and Protected against Homologous Challenge. *Infection and Immunity* 66 (11): 5406-5413.
- Bruce A, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. Third Edition. Garland Publishing, Inc. New York.
- González R. 1999. *Ingeniería Genética y Transferencia Génica*. Ediciones Pirámide, S.A. Madrid.
- Kocan K, De la Fuente J, Gugliemone A, Meléndez R. 2003. Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. *Clin Microb Rev* 16 (4): 698-712.
- Luque J, Herráez Á. 2001. *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. 1ª Edición. Ediciones Harcourt S.A. Madrid.
- O.I.E. *Manual of Standards Diagnostic Test and Vaccines*. 4th edition, 2000.
- O.I.E. *Manual of Standards Diagnostic Test and Vaccines*. 4th edition, 2004.
- Raawn J. 1989. *Bioquímica*. Primera edición. McGraw Hill-Interamericana de España. Madrid.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Torioni S, Knowles D, McGuire T, Palmer G, Suárez C, McElwain T. 1998. Detection of Cattle Naturally Infected with *Anaplasma marginale* in Region of Endemicity by Nested PCR and a Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5. *J Clin Microb* 36 (3): 777-782.
- Wanduragala L, Ristic M. 1993. Anaplasmosis. En: *Rickettsial and chlamydial disease of domestic animals*. Woldehiwet Z, Ristic M (Eds). Pergamon Press, Great Britain 65-87pp.
- Zaugg J, Kutler K. 1984. Bovine anaplasmosis: in utero transmission and the immunologic significance of ingested colostrum antibodies. *Amer J Vet Res* 45 (3): 570-572.