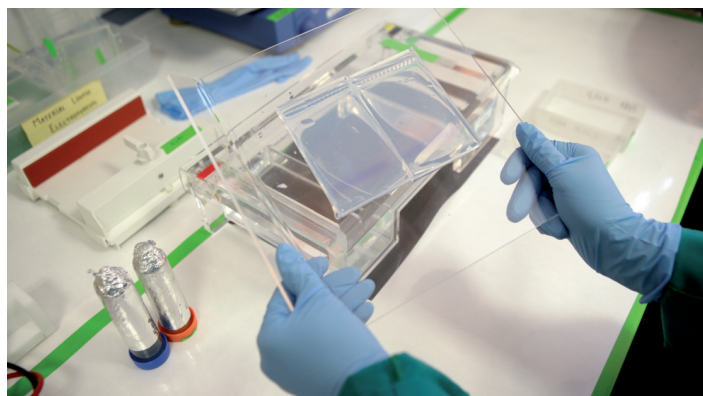


NUEVAS HERRAMIENTAS DE DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES MÁS IMPORTANTES QUE AFECTAN A AVES DE CORRAL



Laboratorio de biología molecular del Centro de Investigación en Sanidad Animal. Foto: Sònia Balcells



Gel de electroforesis con los resultados de una PCR. Foto: Sònia Balcells

01 Introducción

Durante el transcurso de un engorde de pollos en una granja, un avicultor detecta que entre los 35 y 40 días de edad la mortalidad se incrementa hasta un 7%. Los pollos se quedan echados, se arrinconan y acaban muriendo al cabo de pocas horas. El veterinario hace una visita a la granja, abre unos cuantos animales y le comenta al avicultor que se puede tratar de la enfermedad de Gumboro. El avicultor le comenta, extrañado, que él ha vacunado a los animales contra la enfermedad de Gumboro, a la edad y con la vacuna que le había recomendado el mismo veterinario, y que no entiende cómo se pueden haber infectado. El veterinario decide coger algunas muestras de los pollos y enviarlas a un laboratorio de diagnóstico para poder llegar a aclarar qué ha pasado en aquella granja y poder tomar las medidas pertinentes en el engorde siguiente. Al cabo de una semana, el veterinario recibe los resultados de las técnicas diagnósticas. Con una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) se confirma que los animales están infectados por el virus de Gumboro. Por otro lado, el estudio filogenético determina que se trata de un tipo de virus de alta virulencia, frente al cual las vacunas que habitualmente se utilizan no tienen casi efecto. Finalmente, el veterinario decide cambiar la vacuna de Gumboro en el ciclo de engorde siguiente en la granja.

Con la exposición de este caso real, queríamos evidenciar cómo con las nuevas herramientas

de diagnóstico podemos, no solo averiguar el origen del problema (en este caso el virus de Gumboro), sino también obtener información que nos ayude a tomar las decisiones adecuadas para solucionarlo (en este caso nos permite saber el tipo de virus que estaba causando la enfermedad y escoger la vacuna adecuada).

En este artículo, nos centraremos en algunas de estas nuevas técnicas de diagnóstico, básicamente de biología molecular, que se pueden utilizar ya actualmente para el diagnóstico de enfermedades infecciosas de las aves de corral. Intentaremos describir los fundamentos, ventajas y desventajas de algunas de estas técnicas y también discutiremos su uso en el diagnóstico de algunas de las enfermedades más importantes para el sector avícola en Cataluña.

02 Las técnicas de biología molecular aplicadas al diagnóstico

En general, las técnicas de biología molecular aplicadas al diagnóstico se basan en la detección y el estudio del material genético, DNA o RNA, de los diferentes agentes biológicos que causan enfermedades. Pero, ¿por qué el material genético? en primer lugar, porque todos los seres vivos, por pequeños que sean contienen material genético, en forma de moléculas de DNA o RNA. El material genético o genoma es el que contiene la información genética y que se transmite de una generación a otra.

Por tanto, el RNA o el DNA son la base de la identidad y de la diversidad. Es decir, hablando de aves de corral, el material genético de una salmonela, de un virus de Gumboro o de un micoplasma es completamente diferente y las técnicas basadas en el estudio de su genoma nos permitirán diferenciarlos y clasificarlos. Por último, estas moléculas, sobretodo las de DNA, son muy estables y su manipulación y almacenaje son relativamente fáciles.

02.01 La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una de las técnicas de biología molecular que más se utiliza para el diagnóstico y que ya está disponible actualmente en muchos laboratorios es la PCR. Esta técnica se desarrolló a principios de los años ochenta, por un investigador nortea-



Las técnicas de biología molecular aplicadas al diagnóstico se basan en la detección y el estudio del material genético, DNA o RNA, de los diferentes agentes biológicos que causan enfermedades.



Una de las técnicas de biología molecular que más se utiliza para el diagnóstico y que ya está disponible actualmente en muchos laboratorios es la PCR.

Las principales ventajas de la técnica PCR son la rapidez, la alta sensibilidad y también la especificidad.

americano llamado Kary Mullis, que en 1993 recibía un Premio Nobel por este descubrimiento.

La base de la técnica PCR es muy sencilla: se trata de amplificar u obtener un número muy elevado de copias de un fragmento de DNA o RNA concreto. La mayoría de veces, detectar un número muy bajo de virus o bacterias en una muestra es muy difícil. Con esta técnica, en dos horas, podemos llegar a obtener más de 34.000.000.000 de copias de DNA o RNA, a partir del material genético de una sola partícula del agente patógeno.

En el caso que hemos presentado anteriormente, de los pollos enfermos se tomarían muestras de bolsa de Fabricio que se guardarían en refrigeración o congeladas. En estas muestras, que puede ser podrían contener una baja cantidad de virus de Gumboro, con la técnica de PCR se obtendrían de manera rápida y precisa un gran número de copias del material genético de este virus que se podrían utilizar fácilmente.

Como ya hemos comentado anteriormente, esta técnica ya está disponible en muchos laboratorios de diagnóstico y, en el campo de las aves de corral, se aplica ya para la detección de



La secuenciación y posterior análisis filogenético permiten la clasificación de los agentes patógenos.

diferentes patógenos, sobre todo de virus, que son difíciles de detectar por otros métodos: virus de Gumboro, virus de laringotraqueitis, virus de Marek, virus de influenza, virus de bronquitis infecciosa, etc. y también de micoplasmas. En el caso de bacterias, hongos y parásitos, la técnica de PCR no se suele utilizar casi, básicamente porque las técnicas de cultivo y detección son mucho más sencillas y rápidas.

Las principales ventajas de la técnica PCR son la rapidez, la alta sensibilidad - ya que como hemos dicho permite detectar una cantidad muy baja del agente patógeno en una muestra - y también la especificidad. También es una ventaja el hecho de que es una técnica de fácil interpretación.

02.02 Secuenciación y análisis filogenético

El hecho de poder detectar un agente patógeno por medio de la PCR no es, en algunas ocasiones, suficiente. Pongamos por caso, el virus de la gripe o influenza. Sabemos que existe una gran diversidad de virus de gripe que pueden afectar a las aves de corral y también a las aves salvajes. Todos estos virus los dividimos en dos grandes grupos: los que llamamos de alta patogenicidad o virulencia, que si infectan a un pollo pueden provocarle la muerte en 48-72 horas, y los que llamamos de

baja patogenicidad o virulencia que al infectar a un pollo prácticamente no le provocan ningún daño. Entonces bien, un virus de gripe de baja patogenicidad y un virus de gripe de alta patogenicidad se diferencian básicamente en una parte muy puntual de su genoma. Una de las formas más rápidas y directas, entonces, de diferenciarlos es estudiando y comparando su secuencia genética, es decir, la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de este punto de su genoma vírico. De esta manera, la secuenciación y posterior análisis filogenético permite la clasificación de los agentes patógenos.

Igualmente pasa con el caso que hemos comentado al principio del virus de Gumboro. En este caso, el avicultor quería saber por qué los animales se habían infectado a pesar de estar vacunados. Con el estudio preciso de una parte de la secuencia genética del virus de Gumboro detectado en la granja y su comparación o análisis filogenético con otros virus de Gumboro conocidos, se pudo llegar a determinar el tipo de virus que circulaba por la granja y por qué la vacunación no había sido efectiva.

La secuenciación y posterior análisis filogenético de parte del genoma de un agente patógeno es útil, no sólo por la resolución de casos clínicos o brotes de enfermedades concretos, sino también para poder conocer la evolución de

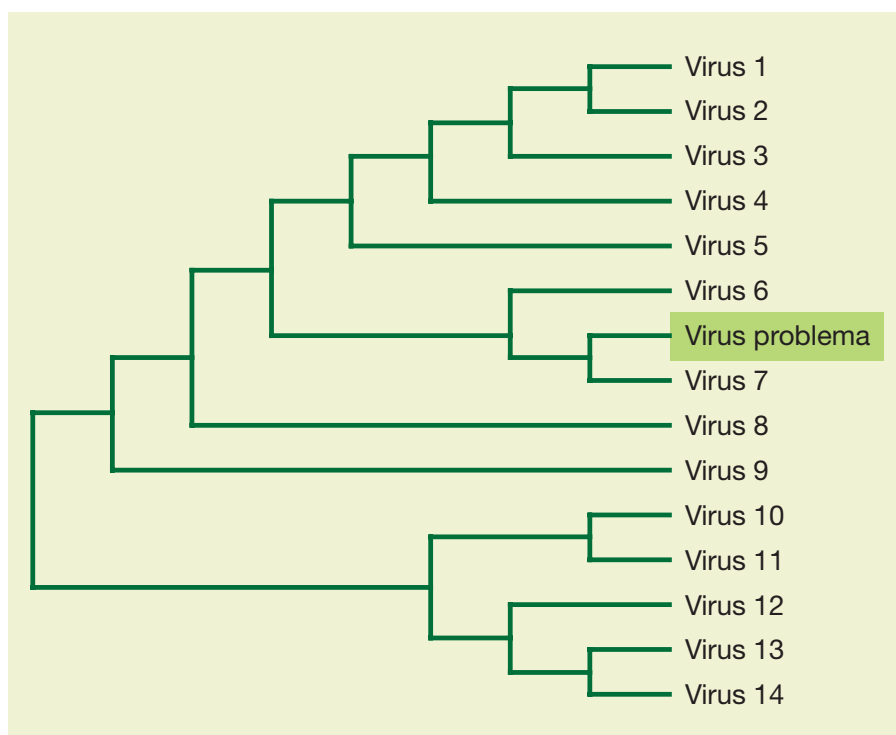


Figura 2: Árbol filogenético resultante del análisis filogenético de una parte del genoma vírico. Con este análisis podemos clasificar un virus problema y ver la relación que tiene con otros virus.

agentes patógenos conocidos. Sabemos que hay muchos virus que cambian o mutan con mucha facilidad. Un ejemplo muy claro de esta situación es el virus de la bronquitis infecciosa de las aves, del cual cada cinco o seis años aparece un tipo nuevo. El análisis filogenético de los virus de la bronquitis que se detectaron en una región o país nos permiten saber cuándo aparece un nuevo subtipo de virus y cuán diferente es del virus que circulaba anteriormente. Ni que decir tiene que esto es algo extremadamente importante para saber si hay que desarrollar vacunas nuevas, adecuar las técnicas de diagnóstico rutinarias, etc.

A pesar de que estas técnicas de secuenciación y análisis filogenético nos aportan mucha información, se trata de técnicas que requieren de una infraestructura costosa, que no siempre está al alcance de todos, y eso repercute en el coste de la técnica. Por otro lado, y a diferencia de la PCR, que

decíamos que era una técnica diagnóstica de fácil interpretación, la técnica de secuenciación y análisis filogenético requiere que la persona que valore los resultados tenga unos conocimientos científicos avanzados. Aún así, el resultado final que se obtiene es, según nuestra experiencia, fácil de entender por parte de los veterinarios clínicos que remiten muestras.

07 Para saber más:

BUENO D. y TRICAS M. (2001) Gens i genoma. El programa de la vida. Ed. Pòrtic. Enciclopèdia Catalana. Barcelona.

SMITH C.A. y WOOD E.J. (1998). Biología Molecular y Biotecnología. Ed. Addison-Wesley Iberoamericana.

BERG P. y SINGER M (1993). Tratar con genes. Ed. Omega. Barcelona.



La secuenciación y posterior análisis filogenético de parte del genoma de un agente patógeno es también útil para poder conocer la evolución de agentes patógenos conocidos.

08 Autora



Natàlia Majó i Masferrer
Centro de Investigación en Sanidad Animal (CReSA)
y Facultad de Veterinaria
Universitat Autònoma de Barcelona
natalia.majo@cresa.uab.cat

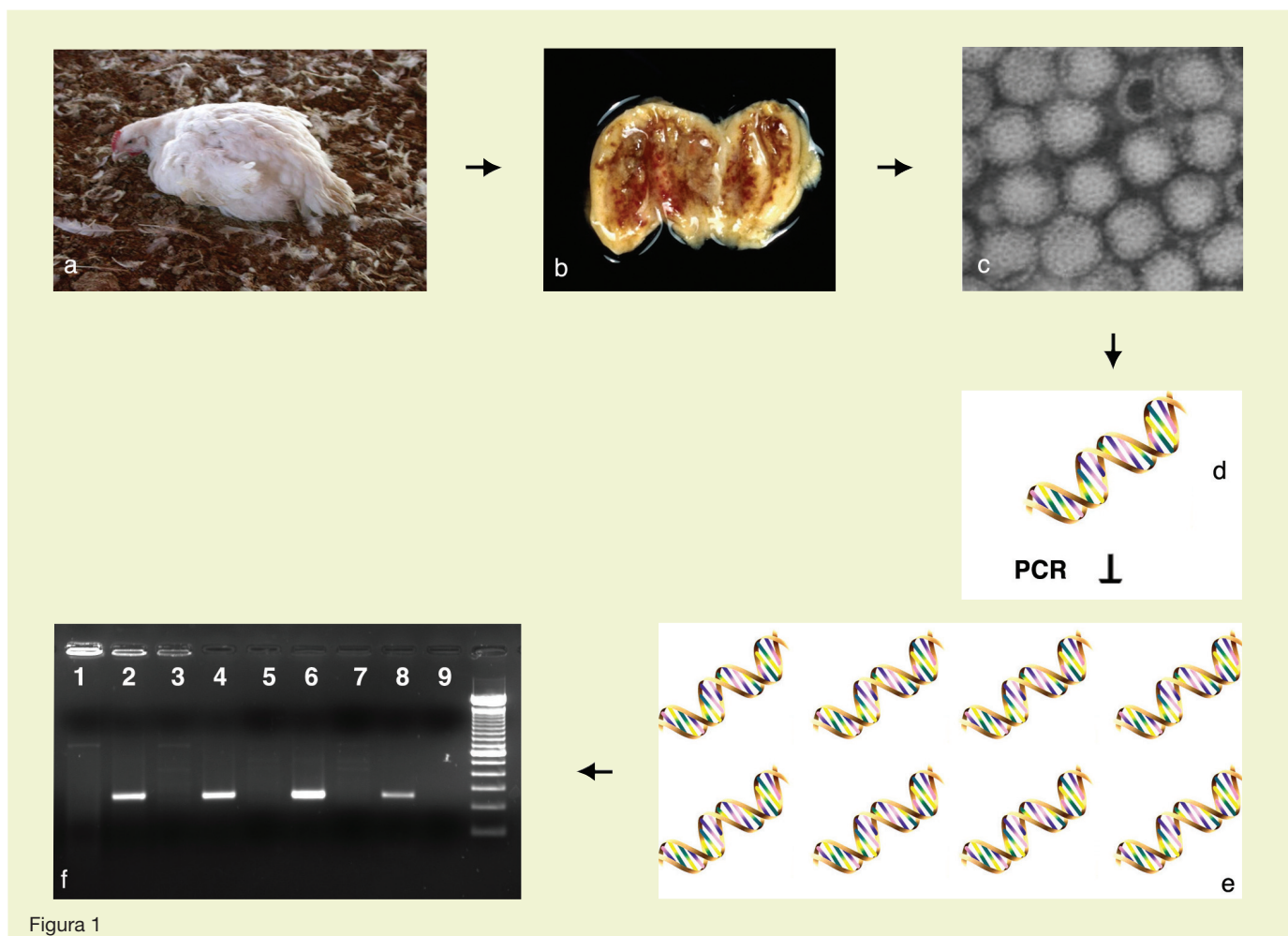


Figura 1: Proceso de diagnóstico de la enfermedad de Gumboro por medio de la técnica PCR. a: pollo enfermo, b: muestra de bolsa de Fabricio del pollo con lesiones sugestivas de enfermedad de Gumboro a partir de la cual se hará la técnica de PCR, c: virus de la enfermedad de Gumboro, d: genoma del virus de Gumboro que se extrae de la muestra, e: resultado de la PCR (amplificación de parte del genoma del virus de Gumboro), f: visualización de los resultados de la PCR (las muestras 2, 4, 6 y 8 son positivas).