Uso de biotecnología como herramienta en la porcicultura

Fuente: Dra. Sonia Calle Espinoza - Perú 17/02/2014 Extraído de Actualidad Porcina-(http://www.actualidadporcina.com/)

Un aporte en avances en ciencia, tecnología e innovación.

Este artículo recoge una serie de información actualizada como parte del diagnóstico de enfermedades en porcinos y comenta sobre la interpretación de los resultados, utilizando las nuevas herramientas tecnológicas que el mercado ofrece.

Introducción

Los avances en ciencia y tecnología se vienen desarrollando en las últimas décadas de manera muy acelerada, mediante una serie de descubrimientos a beneficio de la salud humana y animal. Se inician con la aplicación del microscopio debido a la necesidad y urgencia de resolver las necesidades primarias,

creándose, equipos que finalmente se convirtieron en herramientas y mecanismos que permitieron transformar la realidad e iniciar un proceso de desarrollo en Ciencia, Tecnología e Innovación, permitiendo desarrollar múltiples disciplinas o campos del saber, como la biotecnología, nanotecnología e infotecnología (Yankovic 2010).

Estos descubrimientos, están estrechamente relacionados con el avance y el progreso. Para el físico inglés, Roberto Hooke, el microscopio inventado en 1590 por Zacarías Janssen (holandés), y posteriormente perfeccionado por Galileo Galilei y Anton Van Leeuwenhoek, constituyó una herramienta fundamental para el descubrimiento de la célula en 1665. Y que hoy en día es la base esencial para poder observar las bacterias y virus como parte del diagnóstico en Medicina Veterinaria, relacionado a enfermedades infecciosas de origen porcino, Por otra parte, las aplicaciones del rayo láser, inventado por Theo Maiman en 1960, no serían posible, sin el descubrimiento del efecto fotoeléctrico por Albert Einstein 1917. Así como los aportes de John Dalton (1808), Joseph Thomson (1897), Ernest Rutherford (1911) y Niels Bohr (1913). O bien, una explicación satisfactoria a los factores de la herencia de Mendel, que es la puerta que nos abrió para el estudio de la era genómica, con el descubrimiento de la estructura de la molécula de ADN, por los bioquímicos Watson y Cricks, en 1953. Y recientemente, el impacto de las técnicas de neuroimagen funcional en el desarrollo de las neurociencias (Logatt y Castro 2011).

En la invención y el descubrimiento, el asombro, que experimentamos todos los seres humanos en muchos momentos de nuestra vida y que “constituye la semilla del conocimiento, o más dramáticamente expresado, el fulminante de todo el saber” (Rivera 1988), se transforma en algo que sucede permanentemente. En su afán de entender y comprender, el ser humano se resiste a quedar sin ninguna explicación de las cosas, y adelanta ideas que sirven para encontrar un sentido a lo que ocurre (Sabino 1996). Así quien disponga de algo de criterio para guiarse por la vida, lo tendrá también para marchar por el camino de la investigación. ”En este contexto, Louis Pasteur, químico francés cuyos descubrimientos tuvieron una enorme importancia en el campo de las ciencias naturales, sobre todo en la

química y microbiología, solía decir que **“la casualidad favorece solo a las mentes preparadas”.**

A continuación desarrollaremos algunos de estos avances biotecnológicos en referencia al diagnóstico en porcicultura.

Inmunologia y genética aplicada

Actualmente se viene desarrollando las tecnologías y trabajando con un equipo humano necesario para hacer frente a estos retos, mediante equipos multidisciplinarios en Inmunología, Genética y Biología Molecular. A fin de poder conseguir una mejor integración y resolución de los problemas, aplicando métodos para la preparación de anticuerpos monoclonales, clonación y secuenciación de ácidos nucleídos, expresión de proteínas en microorganismos recombinantes, PCR, Phage display y el uso de Microarrays.

Actualmente, el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM gracias al desarrollo en proyectos de inversión para equipamiento, viene trabajando con las diferentes herramientas diagnósticas del mercado para uso veterinario. A fin de obtener una mejor interpretación de los resultados que por lo general no es simple y requiere conocimientos sobre todo en el momento de la toma de muestra, es importante conocer cuándo y cuántos animales se deben muestrear al igual que las características de cada prueba.

Recopilar y analizar datos es una tarea habitual para los veterinarios especialistas en porcinos. Estos datos se deben obtener de diferentes maneras, y es importante entender lo que la información dice, así como lo que no dice. El método de interpretación de los resultados es esencial para el éxito del diagnóstico veterinario, que repercute en la productividad y el bienestar de los cerdos. Este artículo recoge una serie de información actualizada como parte del diagnóstico de enfermedades en porcinos y comenta sobre la interpretación de los resultados, utilizando las nuevas herramientas tecnológicas que el mercado ofrece.

Como en todo trabajo primero debemos realizar un estudio epidemiológico, recoger información necesaria con el propósito de poder desarrollar una prueba específica que debería ayudarnos a proporcionar evidencias que puedan guiar al especialista veterinario y al criador a tomar las decisiones correctas. De ahí la importancia de los protocolos de las pruebas debería diseñarse basándose en objetivos específicos. Por esta razón, un veterinario no puede utilizar un único protocolo de pruebas o un único programa de vacunaciones para todos los productores de porcino.

Así mismo, es importante que para poder realizar pruebas diagnósticas, además de obtener la información, es saber interpretar los resultados de acuerdo a la historia, signos clínicos, que le proporciona el médico veterinario especialista.

No olvidar tener en cuenta las respuestas inmunes del individuo y de la población que generalmente son muy dinámicas y complejas.

La información que ofrecemos como un concepto general es con la finalidad de motivar el pensamiento crítico a la hora de seleccionar la prueba diagnóstica e interpretar los resultados.

Como es lógico, existen diferencias entre los distintos agentes infecciosos, así como entre las diversas cepas de un mismo agente. También existe variación individual significativa en las respuestas inmunes (el momento en que se mide y el grado de respuesta), así como entre poblaciones, especialmente si se tienen en cuenta las coinfecciones.

Entonces nos preguntamos: ¿Qué es la medicina basada en pruebas?

La medicina basada en pruebas es la incorporación de expertos y pruebas en el proceso de tomas de decisiones con el objetivo de conseguir mejores resultados. En nuestro laboratorio se viene implementado, la medicina basada en pruebas, incorporando en el proceso de toma de decisiones clínicas diarias. Cuando todos nosotros tratamos de interpretar los estudios, primero evaluamos críticamente su valor probatorio, la evaluación del diseño del estudio, los sesgos y las limitaciones de cada estudio. El objetivo es entender mejor la validez externa de cada prueba en particular, de forma que se pueda decidir a fin de obtener un óptimo resultado. En la práctica de la medicina porcina también necesitamos aplicar la medicina basada en pruebas a todo lo que hacemos, incluyendo la interpretación de resultados diagnósticos.

La aplicación de la medicina basada en pruebas en el diagnóstico porcino debería ser un aspecto crítico de la práctica diaria. La mejor forma de anticipar mejores resultados es asegurarnos de que hacemos el diagnóstico correcto, de forma que se puedan implementar los pasos de intervención adecuados. Simplemente leyendo un informe como positivo o negativo no proporciona una visión completa. Hace falta incorporar la experiencia personal, incluidas la presentación clínica y la historia del caso. Exactamente como los estudios que leemos, uno no puede mirar sólo los resultados y aceptar que eso es la verdad completa. Cuando se trata de pruebas diagnósticas, muchas veces como laboratorio de diagnóstico veterinario pasamos por alto las limitaciones de las pruebas y terminamos por sobreinterpretar los resultados. Pero hoy en día con el uso de máquinas de alta tecnología los resultados son más exactos teniendo en cuenta la interpretación de los resultados.

La importancia del momento

Uno de los retos en el diagnóstico desarrollado para la Industria porcina, es determinar la influencia del momento en que se realiza dicho diagnóstico sobre los datos obtenidos. La planificación de las actuaciones diagnósticas afecta directamente a lo que puede encontrarse en cualquier momento (antígenos frente a inmunoglobulinas G frente a inmunoglobulinas M), así como al número de

animales positivos que hay en un grupo prevalencia de la enfermedad). Ambos factores deben tenerse en consideración cuando se diseñan protocolos de pruebas, así como cuando se interpretan los resultados.

¿Cuáles son las posibilidades de mejorar la detección precoz de una enfermedad?

Las posibilidades de mejorar la detección de una enfermedad precozmente cuando hay brote no es recoger una muestra al azar, sino un tamaño de muestra dentro de unos animales que presentan la misma sintomatología. Muchas veces, tenemos la oportunidad de identificar los ejemplares que están enfermos o han estado enfermos, así como grupos de poblaciones que tienen un riesgo mayor.

Esta forma de muestreo dirigido, puede también mejorarse recogiendo muestras más de una vez. Hacerlo entre 5 y 7 días después del primer muestreo, puede ayudar a incrementar la probabilidad de detectar, al menos, un animal positivo en el grupo.

Este remuestreo es especialmente crítico al principio de un brote, cuando la historia clínica sugiere una enfermedad particular, pero los resultados diagnósticos son negativos.

Una tercera manera de mejorar la probabilidad de encontrar un animal positivo es incrementar el tamaño de muestra, especialmente en los primeros momentos de un brote. Éste es un concepto clave que tiende a olvidarse, una vez que los especialistas en porcicultura vuelven a utilizar sus protocolos habituales de muestreo. Hay que recordar que los cálculos de tamaño de muestra son totalmente dependientes de la prevalencia esperada del grupo muestreado.

Algo que debemos tomar en cuenta, ¿Antígenos o anticuerpos?

Es importante recordar que el tiempo influye no sólo sobre cuántas muestras serán positivas (prevalencia) sino también en lo que seremos capaces de encontrar (antígeno frente a anticuerpo). Esto es especialmente cierto cuando se estudia la serología y las bacterias/virus. Cada patógeno se comportan de manera diferente en función de la viremia.

Ejemplo:

En el caso del virus del PRRS, cuanto más joven es el cerdo cuando se infecta, habitualmente más larga es la viremia. Los animales que han tenido una exposición previa (inmunes) al virus (exposición natural o en algunos casos exposición por vacunación) tendrán, generalmente, una duración de la viremia más corta.

Detección de antígenos

En estos momentos, disponemos de diversas pruebas diagnósticas orientadas a la detección de agentes o antígenos que pueden aplicarse en porcino.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Actualmente, la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) ha avanzado considerablemente y puede detectar cantidades muy pequeñas de antígeno. Uno de los problemas de esta técnica es que no sabemos si el agente encontrado estaba vivo o no. Pero nos ayuda a diferenciar si el agente es patógeno o no.

Ejemplo:

Patógenos para cuya detección se recomienda utilizar PCR.

- *Leptospira spp.*
- *Lawsonia intracellularis*

- *Mycoplasma hyopneumoniae*
- *Mycoplasma hyorhinis*
- *Mycoplasma hyosynoviae*
- *Haemophilus parasuis*
- *Virus de la fiebre aftosa*
- *Virus de la peste porcina clásica*
- *Virus del PRRS*
- *Virus de la influenza porcina*
- *Circovirus porcino tipo 2 (PCV2)*
- *Virus de la Gastroenteritis Transmisible (GET)*

Bioensayo

El bioensayo (inyección a animales vivos con la muestra) es el método más sensible para detectar agente/antígeno vivo. Esta técnica se utiliza en situaciones en las que se necesita reproducir una enfermedad o ampliar la cantidad de agente presente para hacer pruebas o inoculación de animales.

El inconveniente es que se requiere de un lugar especial para realizar las pruebas y donde se puedan infectar animales para no poner otros individuos en riesgo de infección. Otra complicación es que los porcinos que se emplean en el bioensayo también pueden tener otras infecciones de las cuales desconocemos, lo que complicaría la investigación.

Ejemplo:

Actualmente, lo usan en el campo para investigar el PRRS.

Elisa

También se viene desarrollando algunas pruebas de ELISA indirecta y directa, para detectar antígenos, pero generalmente se necesitan cantidades ligeramente mayores de antígeno en la muestra para producir un resultado positivo suficientemente fuerte.

Ejemplo:

Patógenos para cuya detección se recomienda utilizar ELISA.

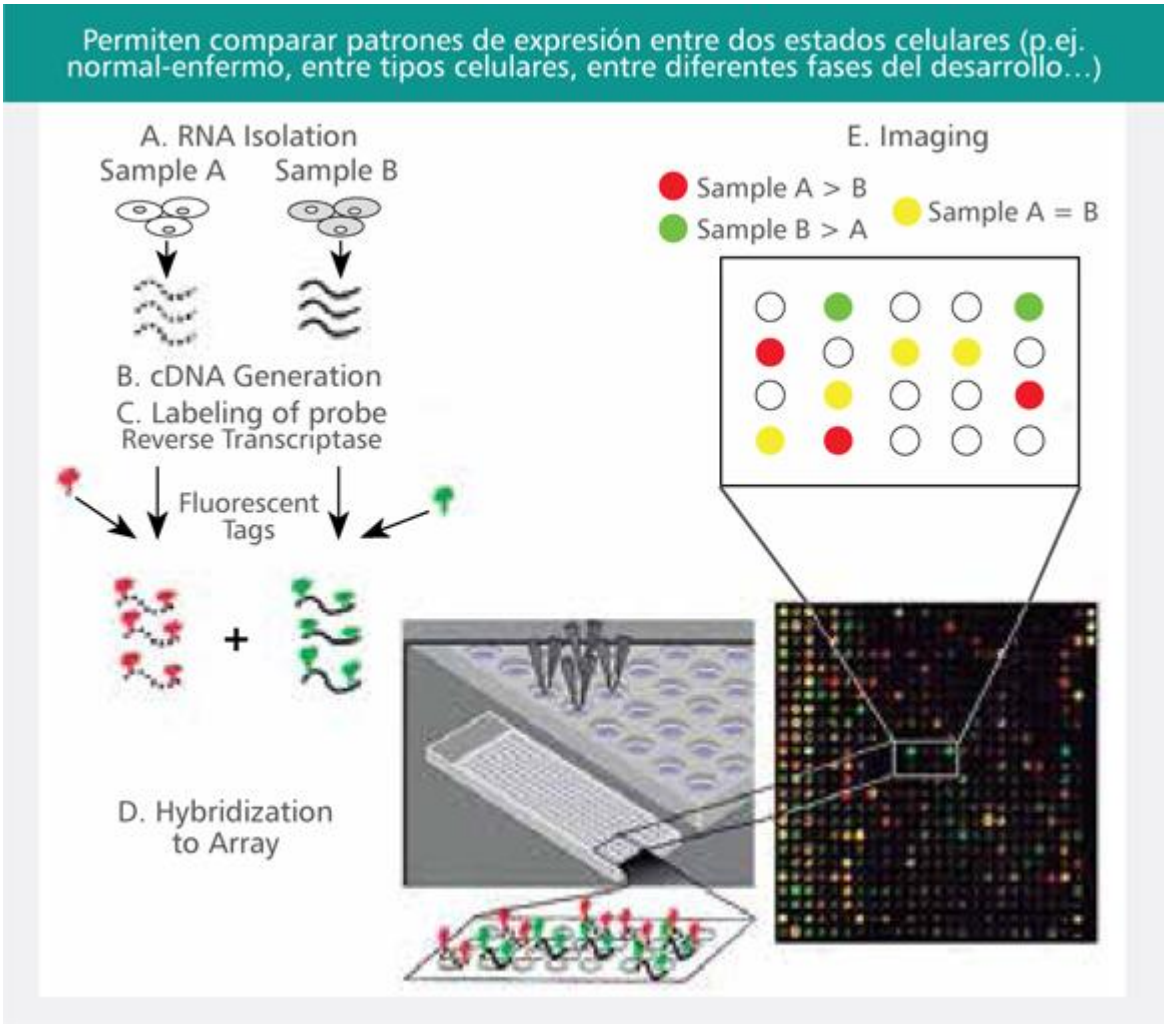
- *Mycoplasma hyopneumoniae*
- *Actinobacillus pleuropneumoniae*
- *Lawsonia intracellularis*
- *Brucella suis*
- *Virus del PRRS*
- *PCV2*
- *Virus de la influenza porcina*
- *Virus de la enfermedad de Aujeszky*
- *Virus de la GET/ Coronavirus porcino*

Diferencias en los niveles de detección

Existen varios factores que influyen en los niveles de detección. La PCR en tiempo real y la PCR normal, son bastante más fácil de llevar a cabo gracias a los nuevos equipos y a los protocolos estandarizados que contamos. Además de seleccionar los cebadores apropiados para detectar un agente o cepa particular (sensibilidad diagnóstica), mediante las pruebas de PCR son bastante exactas a la hora de detectar pequeñas cantidades de antígeno (sensibilidad analítica). La base fundamental es la extracción del ADN y la estandarización de la prueba.

Detección de anticuerpos

Cuando se trata de anticuerpos, no solo tenemos diferencias generales en la sensibilidad analítica entre técnicas, sino también diferencias en su capacidad para detectar distintas clases de anticuerpos, especialmente IgG en comparación con IgM.



Si nos centramos en primer lugar en la sensibilidad analítica, encontraremos que la seroneutralización (NS) es una de las pruebas disponibles más sensibles, mientras que la precipitación en gel requiere la presencia de cantidades muy grandes de proteína (en este caso, anticuerpos).

Ejemplo:

Patógenos para cuya detección se recomienda utilizar seroneutralización.

•*Virus de la enfermedad de Aujeszky*

•*Virus de la GTE*

Las pruebas ELISA (que están entre los test estandarizados disponibles más utilizados en la actualidad) requieren generalmente aproximadamente 10 veces más cantidad de anticuerpos que la seroneutralización.

Por su parte, la inhibición de la hemoaglutinación (IH) puede detectar alrededor de 10 veces menos anticuerpos que la fijación de complemento (FC), que es igual que el test de aglutinación bacteriana, pero requerirá 10 veces más anticuerpos que los test de ELISA.

Ejemplo:

Patógenos para cuya detección se recomienda utilizar la técnica de inhibición de la hemoaglutinación.

•*Parvovirus*
•*Virus de la influenza porcina*

En general, cuando se da un brote, los anticuerpos se producen en cantidades muy grandes, por lo que los niveles de detección no son generalmente un punto crítico, excepto para la precipitación en gel, que requiere aproximadamente 60.000 veces más anticuerpos que los que detecta un test de ELISA.

La capacidad de las diferentes pruebas para detectar la IgG en comparación con la IgM es también bastante diferente entre ellos. Esta distinción entre IgM e IgG es importante porque sabemos que para la mayoría de enfermedades, los anticuerpos IgM aparecen primero (2-5 días) tras la primera exposición al antígeno y, generalmente, ya no se detectan después de 3-4 semanas. Por otro lado, la IgG aparece un poco más tarde (5-7 días) y permanece detectable más tiempo.

Citogenética molecular mediante el uso de microarray

Este equipo es una de las herramientas que tenemos programadas para un futuro inmediato, el cual mediante el Affymetrix ofrece varias soluciones para aplicaciones citogenéticas. Los nuevos microarrays para citogenética CytoScan® HD y CytoScan® 750K, son líderes en cobertura genómica, rendimiento y flujo de trabajo. El rendimiento supera las normas de la industria en cuanta a la especificidad, sensibilidad y resolución. Seguridad en la identificación de aberraciones cromosómicas.

Microarray o microchip

Permite leer superficie con diferentes secuencias conocidas de DNA inmovilizadas (donde cada punto corresponde con un determinado gen).