

Editorial

Diagnóstico Molecular como Herramienta en la Identificación de Plagas y Enfermedades

Necesidad de aumentar la sensibilidad y rapidez de la identificación de plagas y enfermedades agropecuarias

El estado ecuatoriano se encuentra comprometido en obtener la soberanía alimentaria dentro de los lineamientos trazados en el "Plan Nacional del Buen Vivir". Por esta razón presta una especial atención a la protección de las especies animales y los cultivos de interés económico de la amenaza de enfermedades graves, que pueden comprometer la salud y la seguridad alimentaria de la población.

Las enfermedades de los animales y los cultivos, sobre todo las causadas por virus, son un constante y principal problema para la producción agrícola y ganadera en todo el mundo, pueden presentarse desde las formas agudas altamente contagiosas con alta mortalidad, a las crónicas y sin síntomas con un insidioso efecto sobre la producción. [1, 2].

En el caso de los animales son el factor más importante que reduce la productividad del ganado sobre todo en los países en desarrollo [3]. La Organización Internacional de Sanidad Animal (OIE) ha elaborado desde mayo 2004 una lista de enfermedades de declaración obligatoria, que se actualiza anualmente, que consta actualmente de 82 enfermedades [4], causadas por diferentes especies de virus, bacterias, protozoos, rickettsias y clamidias y que producen infecciones con elevadas pérdidas económicas en los animales terrestres en producción.

Dentro de la lista de la OIE se encuentran una serie de enfermedades que han sido llamadas transfronterizas por la facilidad de diseminarse entre los países y a veces continentes y que pueden ser además emergentes o reemergentes. Se ha observado un incremento alarmante en todo el mundo y esto constituye un serio problema para la comunidad internacional por el costo y el impacto ambiental de las medidas de control y/o erradicación y las pérdidas por la mortalidad y la baja producción de carne, leche, huevos y otros derivados. Estos costos en muchos casos no pueden ser asumidos por los países en vías de desarrollo [2, 5].

Dentro de las epizootias que han ocurrido en las últimas décadas y que han alertado sobre la importancia de tomar medidas globales para mitigar las pérdidas económicas, podemos citar: Encefalopatía Espongiforme Bovina en Inglaterra (1986 – 1997); Fiebre Aftosa en Inglaterra (2001) y Argentina (2001); Peste Porcina Clásica en Holanda (1997), Alemania e Inglaterra

(2000); Influenza aviar de alta Patogenicidad H5N1 en Asia (2003), Europa (2005), Oriente Medio y África (2006) y del subtipo H7N3 en Chile (2002) [5].

La fiebre aftosa, fue declarada endémica para el continente americano en 1961 [7]. En Ecuador resurgió en el 2002, produciéndose brotes en varias provincias del país hasta el año 2011.[8,9].

Se han producido enfermedades emergentes en humanos por adaptación de un virus a un nuevo hospedero como el hombre. Ejemplo de ello han sido el virus SARS, de los murciélagos pasó a las civetas y al hombre provocando un brote de altas mortalidades en humanos en China (2002-2003); Hantavirus de roedores en USA (1993) y Chile y Argentina (1995); Influenza aviar H5N1 de aves en Tailandia (2004); Influenza porcina H1N1 en México (2009) y más recientemente el virus Ébola desde un reservorio todavía desconocido a primates y el hombre. [10, 11, 12]

Dentro de los factores que han contribuido al desarrollo de estas epizootias, el más importante ha sido el desarrollo global de la infraestructura de transporte que influido en el aumento del movimiento internacional de pasajeros, animales, productos y subproductos de origen animal y las relaciones económicas entre diferentes regiones del mundo; como consecuencia de la globalización, ha aumentado el riesgo de difusión de las enfermedades de un país a otro, incluso entre continentes [5, 6]. Otro factor ha sido el concepto moderno de la cría de ganado con la aplicación de métodos de cría intensiva, que favorece la transmisión de las enfermedades infecciosas, e incrementa la probabilidad de emergencia o reemergencia de una enfermedad [3,6].

A esto podemos agregar los cambios climáticos producidos por el calentamiento global, que pueden propiciar que enfermedades endémicas para un área geográfica tiendan a extenderse a nuevas latitudes, como la introducción en Europa de la peste porcina africana (Portugal, 1957 y España, 1960) y de los virus de rumiantes, lengua azul (serotipos 8 y 6) en Holanda y Bélgica (2006) [5].

Más recientemente (2011), la aparición del virus Schmallenger, el cual se determinó era un nuevo virus filogenéticamente relacionado con los del género Orthobunyavirus, Sathuperi, Douglas y Shamonda, principalmente detectados en otros continentes como Asia, Africa o Australia [13].

La Sanidad Vegetal también demanda el uso de tecnologías de diagnóstico más eficientes, pues el primer paso para el correcto manejo de una enfermedad dada en un cultivo es conocer su verdadera etiología, esto es particularmente difícil en la agricultura, pues existen más de 950 virus, 30 especies de viroides, alrededor de 100 especies de bacterias fitopatógenas, 1300 especies de hongos junto con 4105 especies de nematodos fitoparásitos, los cuales

son agentes causales de enfermedades de cultivos utilizados para la alimentación humana y animal y que son responsables del incremento en las pérdidas económicas en todo el mundo [14].

Estos patógenos pueden causar una gran variedad de síntomas en la mayoría de las plantas cultivadas afectando las diferentes partes de la planta (hojas, raíz tallo o frutos) con un gran impacto agronómico. Estas enfermedades pueden ser difíciles de controlar debido a la falta de productos eficientes para el tratamiento químico dentro de las condiciones de campo, además de la afectación ecológica y ambiental que implica el uso de pesticidas.

Consecuentemente, entre las medidas para el control y prevención de estas enfermedades se encuentra la confirmación de que el material a sembrar está libre de estos fitopatógenos, los cuales pueden permanecer latentes en el material de siembra, y en una muy baja concentración.

En el caso de nematodos y hongos fitopatogénicos la identificación de especies es un prerrequisito para el desarrollo de variedades resistentes y para la determinación de la biología básica y el comportamiento [15]. Por todo esto, también en la Sanidad Vegetal se requieren métodos de diagnóstico con una alta sensibilidad, especificidad y confiabilidad.

De todo lo expuesto anteriormente, surge la necesidad de que los laboratorios oficiales dispongan de tecnologías de avanzada rápidas, seguras y confiables, a fin de garantizar el diagnóstico con la exactitud y celeridad requeridas para enfrentar una emergencia sanitaria [2, 17].

A nivel internacional el uso de los métodos de detección de ácidos nucleicos para el diagnóstico de patógenos de importancia agropecuaria ha aumentado significativamente en los últimos años [5, 16,17].

Dentro de éstos, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) con sus principales variantes PCR en gel, PCR en tiempo real, PCR-RFLP y PCR-secuenciación son las herramientas de diagnóstico y caracterización que han pasado a ser parte de la rutina de los laboratorios de diagnóstico veterinarios y de sanidad vegetal.

El concepto de amplificación de ADN por PCR es simple y su impacto ha sido extraordinario. Kary Mullis obtuvo el Premio Nobel de Química en 1993 por esta invención, la cual fue concebida en 1983 y la primera publicación salió en el 1986 [18], en enero de 1987 le fue concedida la patente de invención [19] y, posteriormente, cada año el número de artículos científicos con una aplicación de esta tecnología ha aumentado exponencialmente.

En 1993, Higuchi y colaboradores [20] publicaron el primer trabajo de detección de la amplificación por PCR mediante la medición de la fluorescencia emitida por una sonda marcada con un fluoróforo, así nació la PCR en tiempo real.

El advenimiento de la PCR implica que contar con cantidades insuficientes de ADN, no será más una limitación para el diagnóstico de patógenos y la investigación en Biología Molecular.

Principio y ventajas de la reacción en cadena de la polimerasa.

El principio de la PCR es el mismo que la síntesis de ADN que se produce en el núcleo de una célula. La enzima ADN-polimerasa realiza la copia de un fragmento de ADN que le sirve de molde, la diferencia es que en la PCR, la reacción ocurre en un tubo y la enzima realiza entre 30-45 ciclos de amplificación obteniendo billones de copias del fragmento de ADN, lo que le da una alta sensibilidad a la técnica. Este ADN amplificado está flanqueado por la secuencia de los cebadores de la reacción, en cuyo diseño radica la especificidad del ensayo.

Antes de ejecutar la PCR se realiza la extracción y purificación de los ácidos nucleicos del microorganismo y del hospedero, que se encuentran en la muestra biológica y que servirán de molde a la enzima en la etapa de PCR; en el caso de los virus cuyo genoma está constituido por ARN, es necesario incluir una reacción de reverso transcripción del ARN a ADN complementario para que la polimerasa pueda realizar la copia del fragmento en la PCR.

En la tercera etapa se lleva a cabo la detección de los fragmentos amplificados (amplicones) mediante una electroforesis en gel de agarosa y tinción con un colorante intercalador de ADN como el bromuro de etidio. Los fragmentos amplificados pueden ser purificados para la obtención de un perfil electroforético de bandas mediante el corte con una enzima de restricción (RFLP) o la secuencia nucleotídica. Esto se hace con varios objetivos: la caracterización genética del agente infeccioso, la genotipificación, la identificación de mutaciones, determinantes de resistencias a fármacos o de virulencia y para análisis epidemiológico molecular.

Diferentes tipos de formatos y químicas se han desarrollado para la PCR en tiempo real. A diferencia de la PCR en gel, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado o en el pocillo de una microplaca, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante la detección de la fluorescencia emitida en tiempo real por la sonda, se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación y la cuantificación del ácido nucleico diana. El programa informático va registrando el incremento de fluorescencia en cada ciclo, esta información se refleja gráficamente en curvas de cinética de la reacción para cada una de las muestras y controles y determina el valor del ciclo umbral (Ct), que es inversamente proporcional a la cantidad de ADN en la muestra. La cuantificación se realiza, mediante el análisis simultáneo de controles de concentraciones conocidas y crecientes de ADN diana, obteniendo una curva patrón donde se interpola el valor del ciclo umbral de la muestra [21].

El desarrollo de procedimientos de diagnóstico basados en la PCR -tanto en la forma clásica de revelado en gel o en tiempo real (Real Time PCR)- son cada vez más útiles como herramientas a emplear en los laboratorios de diagnóstico de patógenos tanto de animales

como de plantas, pues permite obtener resultados más rápidos y a la vez sensibles y específicos [5, 17]. Esto último posibilita en primer lugar, tomar medidas de control más efectivas para limitar la diseminación de la infección a otras granjas o plantaciones y reduce el riesgo inherente a una enfermedad no diagnosticada que puede ser exótica.

Las experiencias de la última década indican que los ensayos de PCR han tomado el lugar de muchos de los métodos clásicos de detección directa del agente infeccioso como el aislamiento, pues este requiere: la viabilidad del microorganismo y facilidades de cultivo.

Aunque los ensayos de PCR fueron inicialmente caros y engorrosos, hoy en día son relativamente baratos, seguros y sencillos en su manipulación.

La sensibilidad y especificidad de la PCR es en algunos casos mayor que el aislamiento o los procedimientos de ELISA de captura. Otra ventaja de esta técnica es que puede utilizarse a la vez para detectar y tipificar o subtipificar, ya que el empleo de cebadores específicos de tipo o subtipo, hace que se reduzca el tiempo para obtener este tipo de información, tan importante para la aplicación del control a través de la vacunación y en las plantas buscar variedades resistentes [6, 1].

En el caso de los animales, el conocimiento temprano de la etiología de la enfermedad, reduce el costo del uso indiscriminado de antibióticos cuando la etiología es viral. En el caso de las enfermedades virales de animales, la aplicación de ensayos moleculares reduce el uso de biológicos derivados de animales que se sacrifican como donantes para cultivos celulares con el objetivo de aislar el virus.

El empleo de la PCR permite crear un sistema de procesamiento de la muestra y de ensayo, útil para detectar a la vez la presencia de microorganismos exóticos y para el diagnóstico diferencial con otros presentes en el país, con gran eficiencia, en menor tiempo y sin necesidad de contar con la cepa aislada o el anticuerpo específico, lo que es muy ventajoso por razones de bioseguridad tratándose de microorganismos exóticos.

Después de obtener protocolos optimizados de diagnóstico de patógenos basadas en la PCR, las investigaciones se han dirigido a incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección, que puede en ocasiones ser limitadas por el alto contenido de inhibidores de la enzima en las muestras de animales y vegetales. Los formatos de PCR anidada y PCR multiplex, ofrecen una alta sensibilidad y la posibilidad de detectar varias dianas en un ensayo, respectivamente.

El diagnóstico molecular en los laboratorios de AGROCALIDAD

Desde hace tres años la Dirección de Laboratorios de AGROCALIDAD se encuentra perfeccionando el diagnóstico de plagas agrícolas y enfermedades de los

animales productivos para ganar en rapidez y eficiencia, para lo cual se construyó un laboratorio de Biología Molecular, y se encuentra realizando un trabajo sistemático de introducción a la práctica de metodologías de diagnóstico por PCR de las enfermedades notificables y sus diferenciales y de las plagas agrícolas de mayor impacto económico en Ecuador.

La lista de enfermedades estandarizadas es creciente entre las que podemos citar: fiebre aftosa, estomatitis vesicular, pestivirus de ruminantes, laringotraqueitis infecciosa aviar, enfermedad de Newcastle, influenza aviar y porcina, peste porcina clásica y diarrea epidémica porcina.

Dentro de los fitopatógenos, los virus de las bracteas y del rayado del banano, los virus X y Y de la papa, *Ralstonia solanacearum*, *Fusarium oxysporum* y *F. oxysporum* f. sp. *Cubense* raza 4 tropical, *Phytophthora infestans* y nemátodos fitopatógenos del género *Meloidogyne*.

También se realiza la caracterización molecular de los patógenos de mayor importancia que se encuentran en el país, con el objetivo de realizar investigaciones de Epidemiología Molecular, sobre las que se sustenten los programas de erradicación y control de las enfermedades de importancia veterinaria y fitosanitaria.

Agradecimientos

Agradezco al proyecto Prometeo de SENESCYT y a AGROCALIDAD por haberme dado la oportunidad de trabajar en el desarrollo de metodologías moleculares para la identificación de patógenos de importancia agropecuaria y de expresar mi opinión a través de este artículo.

Referencias Bibliográficas

- [1] M.M. López , E. Bertolini , A Olmos , P. Caruso, M.T. Gorris , P. Llop , R.Penyalver , M. Cambra . Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. Int Microbiol.Vol 6, no. 4, pp. 233-43, Dic. 2003.
- [2] J. Belak. "Molecular diagnosis of viral diseases, present trends and future aspects. A view from the OIE Collaborating Centre for the Application of Polymerase Chain Reaction Methods for Diagnosis of Viral Diseases in Veterinary Medicine". Vaccine. Vol. 26, No. 30, pp.5444-52, Jul, 2007.
- [3] A.E. Lew-Tabor . "Applications in livestock systems" en "Biotecnología". Vol II. Ed. Encyclopedia of Life Support Systems. Acceso en línea <http://www.eo-iss.net/Sample-Chapters/C17/E6-58-02-07.pdf>. Enero 2015.
- [4] OIE. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2015. Acceso en línea: <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2015>. Enero 2015.

[5] E. Pestana, S. Belak, A. Diallo, J.R. Crowther, G.J. Viljo. "Early, rapid and sensitive veterinary molecular diagnostics - real time PCR applications". Ed. Springer Science+Business Media B.V., Dordrecht. pp, 4, 2010.

[6] OIE. "Biotechnology in the diagnosis of infectious diseases". Guía 3.2 en : "Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals". Acceso en línea, http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/A_index.htm. Enero 2015.

[7] V. Malirat, I. E. Bergmann, R. de Mendoca-Campos, G. Salgado, C. Sánchez, F. Conde, F. Quiroga, J.L. Quiroga, S. Ortiz. "Phylogenetic analysis of Foot-and Mouth disease virus type O circulating in the Andean region of South America during 2002-2008". *Vet. Microbiol.* Vol.152, no. Aug 29, pp.74-87, 2011.

[8] OIE WAHID. http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail

[9] Maradei, E., Perez, C., Malirat, V., Salgado G, Seki C, Pedemonte A, Bonastre P, D'Aloia R, José L. La Torre JL, Mattion N, Rodríguez Toledo J, Bergmann IE. Characterization of foot-and-mouth disease virus from outbreaks in Ecuador during 2009-2010 and cross-protection studies with the vaccine strain in use in the region. *Vaccine.* Vol.29, pp. 8230-8240, 2011.

[10] C.R. Parrish, E. C. Holmes, D. M. Morens, E. C. Park, S. Burke, C.H. Calisher, C.A. Laughlin, L.J. Saif, P. Daszak. "Cross-Species Virus Transmission and the Emergence of New Epidemic Diseases". *Microbiology and molecular biology reviews.* Vol. 72, No. 3, p. 457-470, Sept. 2008.

[11] C. Brockwell-Staatsa, R.G. Webster, R. J. Webby. Diversity of Influenza Viruses in Swine and the Emergence of a Novel Human Pandemic Influenza A (H1N1). *Influenza Other Respi Viruses.* Vol.3, no.5, pp. 207-213. Sep. 2009.

[12] J. A. Vallejos-Espíndola, M.A. Troncoso-González. "Impacto medioambiental en la incidencia del Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus en Chile" *Rev. Med. Chile.* Vol.142, pp.538-539, 2014.

[13] V. Doceul, E. Lara, C. Sailleau, G. Belbis, J. Richardson, E. Bréard, C. Viarouge, M. Dominguez, P. Hendrikx, D. Calavas, A. Desprat, L. Languille, L. Comtet, P. Pourquier, J.F. Eléouët, B. Delmas, P. Marianneau, D. Vitour, S. Zientara. "Epidemiology, molecular virology and diagnostics of Schmallenberg virus, an emerging orthobunyavirus in Europe". *Vet. Res.* Vol.44, pp.31, 2013.

[14] O. A. Guzman-Piedrahita, J. Castaño-Zapata, B. Villegas Estrada. "Diagnóstico de enfermedades de las plantas de origen biótico". *Agron.* Vol.17, no. 2, pp.7-24, 2009.

[15] X. Ma, P. Agudelo, J.D. Mueller, H.T. Knap. "Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of *Hoplolaimus stephanus*". *J Nematol.* Vol. 43, no.1, pp.25-34, Mar 2011.

[16] Solke H. De Boer1 and María M. Lopez. New Grower-Friendly Methods for Plant Pathogen Monitoring. *Annu. Rev. Phytopathol.* Vol. 50, pp.197-218, 2012.

[17] V.C. Bloka. "Achievements in and future prospects for molecular diagnostics of plant-parasitic nematode"s. *Can. J.of Plant Path.* Vol.27, pp 2, 2005.

[18] R.K. Saiki, T.L. Bugawan, G.T. Horn, K.B. Mullis, H.A. Erlich. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature.* Vol. 324, no.6093, pp.163-6, Nov 13-19, 1986.

[19] Mullis KB. One of the first Polymerase Chain Reaction (PCR). Patente US 4683195 A, Octubre 1987.

[20] R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger, R. Watson. "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions". *Biotechnol.* Vol.11, no 9, pp.1026-30, 1993.

[21] J.Costa. "La PCR convencional en el contexto de la microbiología clínica". *Enferm Infecc Microbiol Clin.* Vol. 22, no.5, pp.299-305, 2004.



Maritza Barrera Valle, es graduada de Licenciada en Ciencias Biológicas en 1973, en la Universidad de La Habana. Obtuvo el grado de PhD en Ciencias Veterinarias en el Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias de La Habana, Cuba. Trabajó durante 33 años en el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, La Habana, Cuba, donde su actividad profesional se desarrolló en el diagnóstico especializado de enfermedades exóticas e investigaciones

acerca de caracterización de cepas virales, vacunas y diagnóstico de enfermedades virales de los animales domésticos. Dentro de la docencia su actividad ha estado relacionada con la maestría de Microbiología Veterinaria y en la tutoría de 5 tesis de PhD y 3 de maestría, entre otras. Dentro de la actividad de investigaciones participó en los proyectos de desarrollo de medios de diagnóstico y vacunas de enfermedades respiratorias y Hemoparasitosis del ternero y Diagnóstico y Caracterización molecular del virus de la peste porcina clásica (PPC). Trabajó como Experto de diagnóstico y Epidemiología Molecular del Proyecto de cooperación de la FAO de Peste porcina clásica. Ha dirigido cuatro proyectos de investigación: "Apoyo al programa de erradicación de PPC en Cuba", "Caracterización de los agentes etiológicos de la gastroenteritis transmisible porcina y la disentería invernal del bovino aislados en Cuba", "Desarrollo de tecnologías de avanzada para el diagnóstico rápido de enfermedades en especies animales de interés económico en Cuba y Venezuela" y "Obtención de una vacuna recombinante de peste porcina clásica". Cuenta con una producción científica de 90 publicaciones en revista de alto factor de impacto o referenciadas y una patente aprobada en diferentes países. Ha merecido 19 reconocimientos científicos en su país entre ellos la orden Carlos J. Finlay y tres premios Academia de Ciencias de Cuba. Actualmente trabaja como Investigadora del proyecto Prometeo y es asesora de los laboratorios de Sanidad Animal y Biología Molecular de AGROCALIDAD.