

CReSAPIENS

Revista de divulgación científica del CReSA

Número 4. Julio 2013



PANORAMA

APROXIMACIÓN A UN DIAGNÓSTICO

NOTICIAS

CReSA & the city:
un blog de todos, para todos

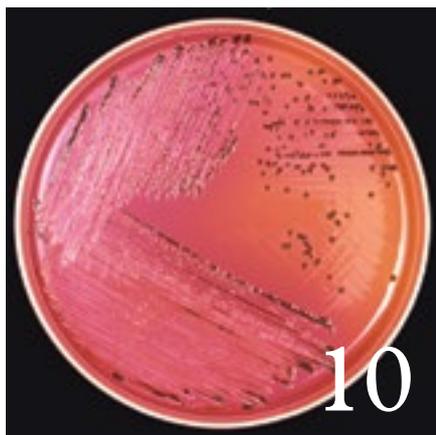
UN CAFÉ CON...

Alberto Allepuz: peleándose
entre ordenadores en
Barcelona

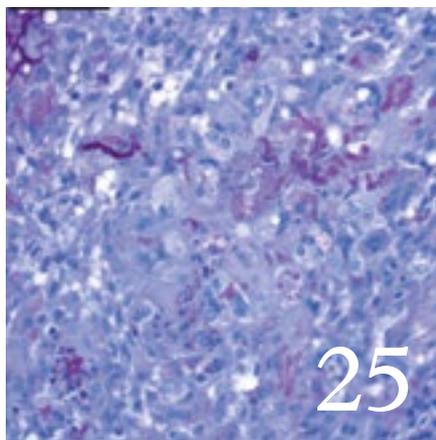
LA OPINIÓN DEL EXPERTO

Nuevas técnicas
moleculares, del Jurásico
a la televisión de papel

SUMARIO



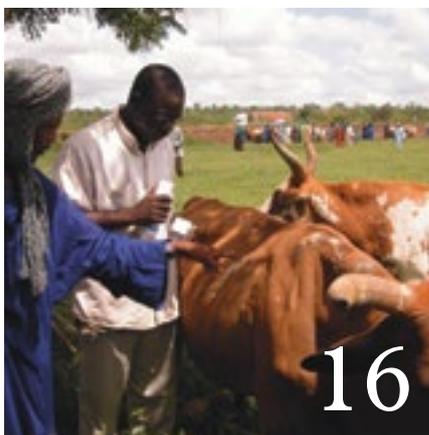
10



25



4



16

EDITORIAL 1

NOTICIAS 2

PANORAMA

Aproximación a un diagnóstico 4
Marina Sibila

QUÉ SABEMOS DE...

Millones de copias del ADN en pocas horas 8
Tuija Kekarainen

Aislamiento e identificación de bacterias 10
Ana María Pérez

Aislamiento e identificación de virus 12
Rosa Rosell

Pruebas diagnósticas basadas en la respuesta inmunitaria 14
Sonia Pina

Evolución tecnológica de los diagnósticos en sanidad animal 16
Albert Bensaid

UN CAFÉ CON... 18
Alberto Allepuz

HEMOS DESCUBIERTO 20
Elisabet Rodríguez

FUTUROS INVESTIGADORES

Comunicación científica: otra opción de futuro tras el postgrado 22
Paula López

HABLAN LAS ESCUELAS

Importancia del diagnóstico para controlar enfermedades 23

CIENCIA A LA VISTA

Ciencia es invertir en el futuro... ¿pero quién la paga? 24
Joaquim Segalés

LO QUE NO VEMOS...

Los hongos colonizadores 25

LA OPINIÓN DEL EXPERTO

Nuevas técnicas moleculares, del Jurásico a la televisión de papel 26
José Ignacio Núñez

DICCIOCReSA 28

SI QUIERES SABER MÁS

CReSA Training Programs: compromiso con la formación 29

CReSAPIENS

Revista de divulgación científica del CReSA

EDITOR

Elisabet Rodríguez González

COMITÉ EDITORIAL

Albert Moisès Bensaid
 Elisabet Rodríguez González
 F. Xavier Abad Morejón de Girón
 Fernando Rodríguez González
 Ignacio Badiola Sáiz
 Joaquim Segalés Coma
 Jordi Casal Fàbrega
 Lillianne Ganges Espinosa
 María Montoya González
 Mariano Domingo Álvarez
 Natàlia Majó Masferrer
 Paula López Monteagudo
 Virginia Aragón Fernández

FOTO PORTADA

CReSA

DISEÑO Y MAQUETACIÓN

Ondevuev.net

IMPRESIÓN

Rubens Grup Gràfic
 Depósito Legal: B-13.146-2011

*Fundació Centre de Recerca en Sanitat
 Animal (CReSA), UAB-IRTA.
 Edifici CReSA. Campus de la UAB
 08193 Bellaterra (Barcelona)
 Tèl. 935813284. Fax 935814490
 www.cresa.cat*

*Para cualquier cuestión o sugerencia
 sobre CReSAPIENS, contactar con:
 cresaapiens@cresa.uab.cat*

EDITORIAL



Dr. Joaquim Segalés Coma
 Director del CReSA
 joaquim.segales@cresa.uab.cat

¿Qué me pasa, doctor?

Con toda probabilidad habéis oído esta pregunta o la habéis formulado a un médico muchas veces. La simpleza de la cuestión oculta unas capacidades técnicas y de conocimiento que trascienden substancialmente al individuo/a que la formula. De hecho, lo que estamos esperando con la respuesta a esta pregunta es que nos formulen el diagnóstico de una problemática determinada. Diagnosticar significa averiguar la causa o causas de algo, siendo este conocimiento el que va a permitir establecer una potencial solución al problema. Para este diagnóstico se necesitan dos fases bien definidas.

La primera es una fase inductiva, de investigación. Se intenta responder a qué, cómo, cuándo, cuánto, donde, quién/es y cuál es la naturaleza del problema a solucionar. Poneos en situación... ¡tenéis un problema respiratorio con tos, malestar general, dolor de garganta y mucosidad! El médico correspondiente os empieza a formular preguntas: ¿Desde cuándo tiene este problema?, ¿Alguien más de su familia lo padece?, ¿Cómo se inició?, ¿Dónde le duele exactamente?, etc. Es un proceso básicamente descriptivo donde está recopilando una serie de síntomas clínicos que permitirán orientar a la posible causa de este problema de salud. Lógicamente, en esta fase de investigación no solamente hay preguntas y respuestas, sino que también suele darse el llamado examen clínico, es decir, investigar al paciente y sus síntomas y posibles lesiones asociadas. Es más, en algunos casos se puede

llegar a recomendar la toma de muestras para poder realizar la analítica laboratorio pertinente.

La segunda es una fase deductiva, de aplicación de conocimientos previos que permiten establecer la causa de la problemática. Esta fase solamente es posible si se interpretan correctamente los datos obtenidos en la fase inductiva, con lo que se necesita una formación específica y extensiva en la materia, medicina en el ejemplo indicado.

Este contexto permite explicar de forma muy evidente que cuando un médico (o veterinario) solicita un análisis laboratorio para poder confirmar u orientar un diagnóstico, se presupone que alguien tiene que haber desarrollado, validado y aplicado las mencionadas técnicas diagnósticas. Ésta es precisamente una más de las actividades que el CReSA desarrolla en el ámbito de la sanidad animal, poniendo a punto nuevas técnicas y aplicando aquellas necesarias para el diagnóstico de múltiples enfermedades que afectan a los animales. En este cuarto número de CReSAPIENS podréis ver como los autores de los trabajos os quieren acercar al apasionante mundo de las técnicas diagnósticas y lo que podemos esperar de ellas. ¡Ya veréis que la analítica laboratorio no es solamente un papel con unos resultados, sino el resultado del esfuerzo de unos profesionales cuyo objetivo es ayudar en el establecimiento de un diagnóstico certero!

Finalmente, como en ediciones anteriores, agradecer públicamente el apoyo económico de empresas del sector veterinario para que os podamos hacer llegar una nueva edición de CReSAPIENS. Igual es una frase retórica, pero ¡espero que aprendáis mucho mientras la disfrutáis leyendo! ■

CReSA & the city: un blog de todos, para todos

Recientemente se ha puesto en marcha el blog del CReSA, un blog corporativo dirigido al público en general. En CReSA & the city os informaremos sobre nuestras, exposiciones, revistas, cursos, ideas, opiniones, proyectos de investigación, y sobre otras muchas actividades que organizamos y que os pueden interesar. Sin tecnicismos, sin complicaciones. Un blog de todos nosotros para todos vosotros. Esperamos que nos sigáis y que nos recomendéis. Nuestro éxito depende de vosotros. www.cresa.cat/blogs/sociedad/



EL CReSA OFRECE UN NUEVO SERVICIO DE CITOMETRÍA

Se trata del único servicio de Catalunya que dispone de un citómetro FACSAria I (BD) en condiciones de Bioseguridad de nivel 3 (NBS3), además de un servicio de citometría en los Laboratorios de Bioseguridad de nivel 2 (NBS2). La citometría de flujo es el análisis de las características de células mediante la medida automatizada de las propiedades particulares de las células. Esta tecnología tiene aplicaciones en numerosos campos de las ciencias de la vida. Con este nuevo servicio, el CReSA refuerza su cometido de continuar ofreciendo herramientas y actividades de soporte a la comunidad científica y a la industria. www.cresa.es/serveicitometria



CURSO DE EPIDEMIOLOGÍA ORGANIZADO POR LA FAO Y EL CReSA

El “Curso avanzado de análisis, representación espacial e inferencia de datos de vigilancia veterinaria” tuvo lugar en Barcelona durante la semana del 3 al 7 de diciembre de 2012. Organizado por el CReSA y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), el curso contó con la participación de un total de veinte profesionales de servicios veterinarios de países pertenecientes a la Red Medi-

terránea de Sanidad Animal (REME-SA): Mauritania, Marruecos, Argelia, Túnez, Libia, Italia, España y Egipto.



COLABORACIONES CON LA RED DE SALUD ANIMAL DEL CARIBE (CARIBVET)

Las últimas contribuciones del CReSA con el grupo de trabajo de enfermedades infecciosas de CaribVET han sido el aislamiento y caracterización genómica completa de los virus de influenza pandémica H1N1/2009 de granjas de cerdos de Cuba y la detección molecular de torque teno sus virus. CaribVET es una red de colaboración entre los servicios veterinarios, laboratorios, institutos de investigación y organizaciones regionales e internacionales para mejorar la colaboración entre la salud animal y la salud pública veterinaria en todos los países y/o territorios del Caribe. www.caribvet.net

VISITA AL CReSA POR PARTE DE CENTROS TECNOLÓGICOS

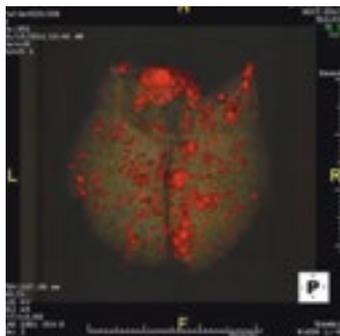


El pasado 10 de diciembre, un grupo de miembros de los centros asociados ACTec (Associació Catalana de Tecnologia) realizaron una visita al CReSA, en Bellaterra. Estas visitas se enmarcan en la iniciativa conjunta entre la Associació Catalana d'Entitats de Recerca (ACER) y la ACTec, por la que se visitan los centros de investigación para detectar posibles colaboraciones entre entidades. www.acer-catalunya.org

UNA NUEVA VACUNA CONTRA LA TUBERCULOSIS EN HUMANOS SE PRUEBA POR PRIMERA VEZ EN CABRAS

Investigadores del CReSA han realizado el primer estudio de vacunación frente a la tuberculosis utilizando como modelo experimental la cabra doméstica. La vacuna, denominada AdAg85A, ha sido diseñada por investigadores de McMaster University (Canadá) para prevenir la tuberculosis en humanos, y actualmente se halla en fase I de ensayos clínicos. El estudio, realizado por investigadores del CReSA, abre una nueva vía para el estudio de nuevos tratamientos. *Pérez de Val et al. Goats Primed with Mycobacterium bovis BCG and Boosted with a*

Recombinant Adenovirus Expressing Ag85A Show Enhanced Protection against Tuberculosis. Clin Vaccine Immunol. 2012;19(9):1339-47.



UN PASO MÁS HACIA UNA VACUNA FRENTE A LA PESTE PORCINA AFRICANA

Investigadores del CReSA han demostrado que es posible proteger a los cerdos frente al virus de la peste porcina africana (VPPA). Son las conclusiones de un estudio publicado en la revista PLoS One. Desde su entrada en Georgia en el año 2007, el virus se expande sin demasiado control por países colindantes. La ausencia de una vacuna eficaz frente al VPPA dificulta aún más el control de la enfermedad. Así pues, resulta totalmente necesario obtener una vacuna eficaz y segura frente a la PPA. *Argilaquet et al. DNA Vaccination partially protects against African swine fever virus lethal challenge in the absence of antibodies. PLoS One. 2012;7(9):e40942.*



EL CONSEJERO DE AGRICULTURA, GANADERÍA, PESCA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO NATURAL VISITA EL CReSA

El pasado mes de octubre, el Honorable Sr. Josep Maria Pelegrí, consejero de Agricultura, Ganadería, Pesca, Alimentación y Medio Natural (DAAM) realizó una visita institucional a las instalaciones del CReSA acompañado de representantes del DAAM, del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) y de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Los asistentes resaltaron la importancia de disponer de un centro de excelencia de estas características en Catalunya, desde el punto de vista sanitario (salud y bienestar del ganado), social (seguridad y calidad alimentaria, prevención de zoonosis) y económico (dado que la ganadería es una actividad de gran importancia en Cataluña).

APROXIMACIÓN A UN DIAGNÓSTICO



Dra. Marina Sibila Vidal
Investigadora
marina.sibila@cresa.uab.cat

Investigadora del CReSA. Sus líneas de investigación abarcan estudios sobre epidemiología molecular, desarrollo de modelos experimentales, desarrollo de herramientas diagnósticas y estudios de eficacia vacunal en diversos patógenos porcinos.

Toma de muestras en una granja de cerdos.

Se entiende como diagnóstico, el resultado/s o conclusión/es de las pruebas realizadas para identificar la causa de una enfermedad/patología. Esta causa puede tener un origen infeccioso o no infeccioso. Los factores no-infecciosos son muy variables tales como condiciones ambientales, aspectos nutritivos, condiciones de manejo, enfermedades genéticas, enfermedades congénitas, intoxicaciones... Por otro lado, los factores infecciosos son microorganismos que causan la infección, ya sean virus, bacterias, hongos o protozoos. Cuando el agente no es microscópico sino macroscópico (parásitos) hablaremos de infestación. En el presente artículo nos centraremos en las técnicas de laboratorio que se utilizan para diagnosticar las enfermedades infecciosas en los animales de producción. El abordaje habitual de este proceso diagnóstico se realiza en la mayoría de casos, de forma poblacional (por lote, corral o granja). Esto implica que las muestras para el diagnóstico se deben tomar de individuos representativos de la población afectada.

El proceso diagnóstico consta de varias etapas y termina con la implantación de medidas de control de la enfermedad. La primera fase de este complejo proceso es la observación y descripción de los síntomas o signos clínicos que sufre el paciente (diagnóstico presuntivo). Los síntomas (subjetivo) son las percepciones o cambios en el estado de salud que el paciente puede describir. Como en veterinaria nuestros “pacientes” no pueden describir como se encuentran, hablaremos siempre de signos clínicos (objetivo), es decir, observaremos y destacaremos aquellos hallazgos anormales en el estado de salud de los animales.

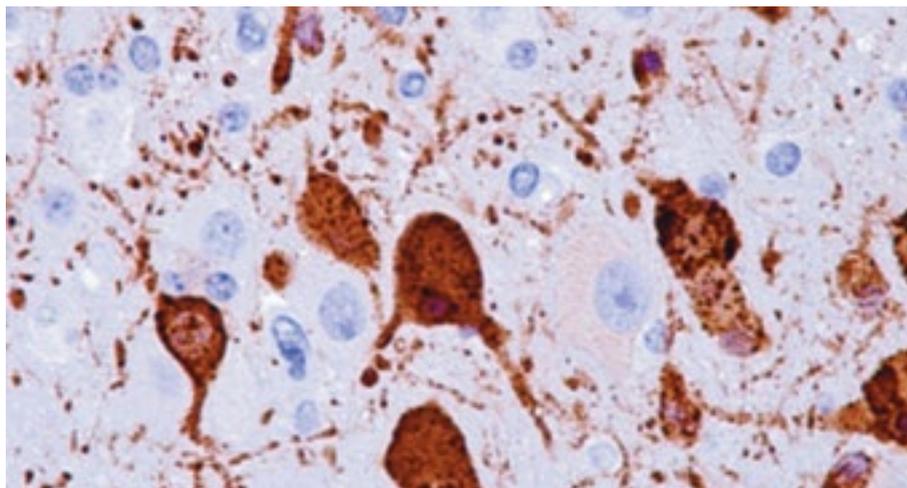
Si con la observación, categorización (gravedad) y clasificación (descripción) de los signos clínicos, no tenemos información suficiente para llegar a una conclusión, deberemos continuar con la segunda etapa del proceso diagnóstico, la determina-

El proceso diagnóstico consta de varias etapas y termina con la implantación de medidas de control de la enfermedad

ción del agente causal de los signos clínicos observados mediante técnicas de laboratorio. La selección de estas técnicas se realizará en función de la naturaleza de los signos clínicos, el diagnóstico presuntivo, de las muestras remitidas, y del objetivo del diagnóstico (intervencionista o epidemiológico). Así pues, es muy importante adjuntar en la remisión de las muestras una historia clínica del caso en cuestión. Esta historia clínica debe describir cuáles son los signos clínicos observados, número de animales afectados y tratamiento administrado hasta la fecha. Las muestras se pueden tomar de animales vivos (sangre, orina, heces, hisopos) o de animales muertos (necropsias o bajas) pero siempre teniendo en cuenta el objetivo del diagnóstico.

Las técnicas de laboratorio se pueden clasificar en función de lo que nos permiten detectar. Es decir, si nos permiten observar las lesiones provocadas por dicha infección, detectar el agente causal de la enfermedad o de la infección, o detectar la respuesta inmune derivada de esta infección.

La **histopatología** es la herramienta diagnóstica que nos permite identificar y describir las lesiones presentes en un animal. Para realizar el análisis histopatológico se requieren muestras de la zona lesionada de animales vivos (biopsia) o muertos (necropsia). Para cumplir con el carácter representativo



Muestra de tejido teñida mediante técnicas histológicas para su observación al microscopio.

de las muestras, es aconsejable realizar la necropsia de 3-4 animales no tratados en la fase aguda de la enfermedad. Las muestras recogidas durante este proceso, se sumergen en formol, permitiendo de esta forma la fijación y conservación de los tejidos. Tras un cierto tiempo en fijación, estas porciones de tejido se cortan muy finamente (micras) y se tiñen con sustancias que permiten, mediante un microscopio, la observación y diferenciación de las células y/o tejidos. En algunas enfermedades, la mera observación de las lesiones nos permitirá diagnosticar el agente etiológico causante de dichas lesiones. En ciertas ocasiones, aparte de la tinción estándar utilizada en las técnicas histológicas (hematoxilina/eosina), se requiere la utilización de tinciones histológicas especiales que nos ayudaran a identificar ciertos agentes causales muy específicos. Por otro lado, también podemos recurrir a la detección de antígenos o genoma del agente causal en porciones de tejidos fijados en formol mediante técnicas como la inmunohistoquímica (IHQ), inmunofluorescencia o la hibridación in situ (HIS). Esta combinación (histología más detección de antígenos o genoma) es muy útil ya que nos da

información de la presencia del patógeno en las lesiones observadas. Sin embargo, en la mayoría de las ocasiones la histopatología no es suficiente para llegar a un diagnóstico definitivo y es un primer paso de un diagnóstico diferencial que se debe completar con otras herramientas diagnósticas.

Hay tres tipos de técnicas que nos permiten detectar u observar el agente causal de la enfermedad: **técnicas bacteriológicas, técnicas virológicas y técnicas de biología molecular.** Las técnicas bacteriológicas

recipientes estériles. Las principales técnicas bacteriológicas que se utilizan para realizar un diagnóstico son el cultivo microbiológico, la tinción de Gram y las pruebas bioquímicas, que nos permitirán aislar, observar la morfología y clasificar las bacterias en función de sus características morfológicas y bioquímicas.

Las **técnicas virológicas** son aquellas herramientas diagnósticas que nos permiten aislar e identificar virus. Estos microorganismos son parásitos intracelulares que para multiplicarse utilizan la maquinaria de replicación de una célula hospedadora. Es por ello que para el aislamiento de estos microorganismos se necesitan células vivas que permitan al virus replicarse. Para este cultivo “in vitro” se pueden utilizar varios soportes biológicos, siendo los cultivos celulares los más comúnmente utilizados. Una vez se ha realizado el aislamiento vírico, se debe comprobar y cuantificar este crecimiento vírico. Para ello, se utilizan distintas técnicas laboratoriales tales como, valoración del efecto citopático (ECP), inhibición de la hemoaglutinación (IHA), inmunofluorescencia (IF), inmuperoxidasa (IP), reacción en cadena de la polimerasa (PCR)...

Para realizar el análisis histopatológico se requieren muestras de la zona lesionada de animales vivos (biopsia) o muertos (necropsia)

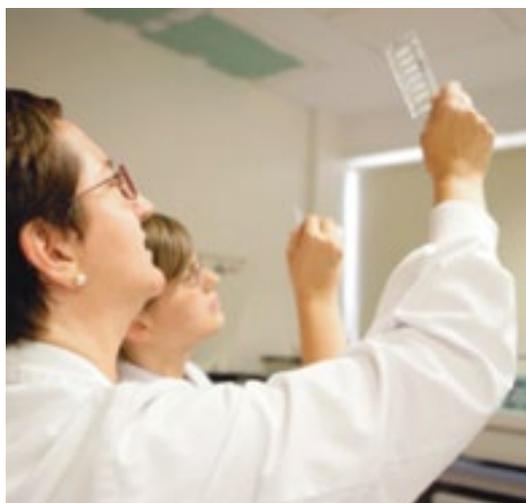
son aquellas que nos permiten aislar e identificar las bacterias implicadas en una enfermedad. Para realizar este tipo de técnicas, se requieren muestras frescas procedentes de animales sin tratamiento antibiótico. Estas muestras se deben recoger en

nación (IHA), inmunofluorescencia (IF), inmuperoxidasa (IP), reacción en cadena de la polimerasa (PCR)... Estas técnicas virológicas aunque son suficientes para llegar a un diagnóstico definitivo, son costosas, laboriosos, caras y lentas. Es por este motivo, que

estas técnicas se utilizan en aquellos casos en que es necesaria la identificación y caracterización del virus causante de una infección/enfermedad.

Las **técnicas de biología molecular** son aquellas técnicas de laboratorio que nos permiten detectar de forma directa y específica el ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) del patógeno. Así pues, estas herramientas diagnósticas se pueden utilizar para la detección de cualquier tipo de agente infeccioso (bacterias, virus, hongos o protozoos) a partir de una gran variedad de muestras (sangre, suero, hisopos, tejidos, orina, heces, ...). Sin embargo, hay que tener en cuenta que estas técnicas detectan la presencia de un patógeno pero no proporcionan información sobre la capacidad de multiplicación/replicación de dicho patógeno. Estas técnicas son específicas, sensibles, rápidas y en su mayoría automatizables. Sin embargo, son económicamente más costosas que las técnicas tradicionales de laboratorio. La técnica molecular más utilizada en diagnóstico es la PCR. Esta técnica se basa en la amplificación del ADN del patógeno y posterior detección. A partir de esta técnica se han desarrollado otras técnicas moleculares tales como la PCR multiplex (detección de varios patógenos en un solo ensayo), PCR cuantitativa (detección y cuantificación del ADN patógeno presente en una muestra), secuenciación (identificación y caracterización del material genético)... Además existen también técnicas moleculares que se basan en la detección del material genético mediante hibridación. Así por ejemplo tenemos la HIS (detección del ADN en tejido) o los chips de ADN "microarrays" (hibridación del ADN en una superficie sólida).

Finalmente, las **técnicas serológicas** son aquellas que nos permiten detectar la respuesta inmune (anticuerpos) desarrollada por el animal debido a un contacto previo con un antígeno determinado. Además de conocer si el animal ha estado en contacto con un antígeno en concreto, ciertas técnicas serológicas proporcionan información sobre la temporalidad de la



Pruebas
bioquímicas en
laboratorio de
bacteriología.

La técnica
serológica más
utilizada hoy
en día en los
laboratorios de
diagnóstico es
el ELISA

infección (mediante la detección de diferentes inmunoglobulinas [IgM o IgG]) o de la cantidad de anticuerpos generados frente a este antígeno (títulos serológicos). En la mayoría de ocasiones las técnicas serológicas no nos permitirán diferenciar los anticuerpos

de origen materno (inmunidad materna) de aquellos producidos de forma activa por el animal. De igual manera, tampoco podremos diferenciar (en la mayoría de los casos) los anticuerpos generados en respuesta a una infección de los generados tras una vacunación. La muestra utilizada por excelencia en estas técnicas es suero sanguíneo pero también se pueden detectar anticuerpos en otras muestras tales como calostro, leche, saliva o lavado traqueo-bronquial. La técnica serológica más utilizada hoy en día en los laboratorios de diagnóstico es el ELISA (detección de anticuerpos específicos mediante una reacción enzimática colorimétrica). Entre todos los tipos de ELISA existentes, el ELISA indirecta es la variedad más frecuentemente utilizada. Además de el ELISA, hay otras herramientas diagnósticas como la IHA, IF, fijación del complemento y neutralización viral que proporciona información a distintos niveles pero siempre como eje central la detección de la respuesta inmune.

Para sacar el máximo partido a la información derivada de estas herramientas diagnósticas, es muy importante la interpretación de los resultados. Para ello, debemos contextualizar los resultados con otros parámetros tales como características de las técnicas diagnósticas utilizadas (sensibilidad y especificidad), calidad y representatividad de las muestras remitidas, condiciones de manejo de la granja, interacción entre patógenos, tratamiento aplicados en la granja... En conclusión, el diagnóstico a nivel poblacional de las enfermedades infecciosas es un proceso complejo que en la mayoría de casos requerirá la utilización de varias técnicas de laboratorio. ■

Millones de copias del ADN en pocas horas



Dra. Tuija Kekarainen
Investigadora del CReSA
tuija.kekarainen@cresa.uab.cat

Investigadora del CReSA, responsable de la investigación de los virus del cerdo como circovirus porcino y torqueto virus.

En 1993, Kary Mullis y Michael Smith fueron premiados con el Nobel por su contribución en el desarrollo de la técnica de PCR, que hoy en día es uno de las técnicas más aplicadas en el análisis de ácidos nucleídos. La PCR está basada en la capacidad de la polimerasa de ADN de sintetizar una cadena nucleotídica nueva, complementaria a la cadena molde. Con la PCR es posible replicar segmentos de ADN varios millones de veces.

La PCR está basada en la capacidad de la polimerasa de ADN de sintetizar una cadena nucleotídica nueva

Para la amplificación se sintetizan dos oligonucleótidos cortos de modo que tienen secuencia idéntica a los extremos del segmento de ADN que el investigador quiere amplificar, de este modo se unen correctamente a la cadena del ADN (Figura 1). Estos oligonucleótidos se denominan cebadores o “primers”. En los puntos de contacto, la polimerasa puede empezar a leer el código genético a través del cual dos nuevas cadenas dobles de ADN se forman. A continuación la muestra se calienta, lo que hace que las hebras se separen de modo que puedan ser leídas de nuevo. El procedimiento se repite una y otra vez, doblando en cada paso el número de

copias del segmento de ADN deseado. A través de ciclos repetitivos es posible obtener millones de copias del ADN en unas pocas horas. Para la reacción se necesita una máquina que automáticamente calienta y enfría las muestras según los ciclos. El producto del PCR puede ser identificado por su tamaño mediante gel en electroforesis, que es lo más utilizado en analítica (Figura 2).

La PCR tiene amplia aplicación. En medicina veterinaria es más utilizada para detectar agentes infecciosos o para cribar enfermedades genéticas específicas. Tiene aplicaciones en epidemiología molecular y evolución,

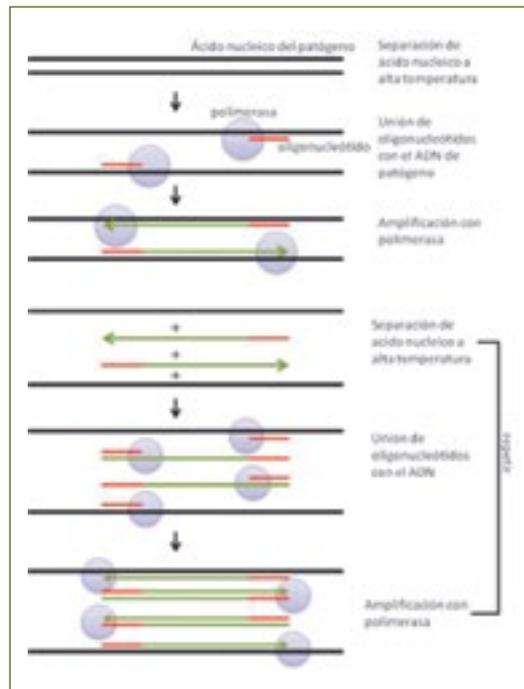


Figura 1. Principio de amplificación de ácido nucleico por PCR.

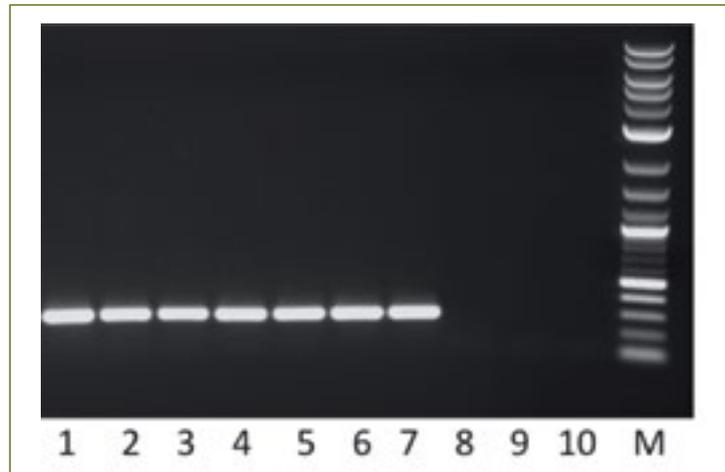
y también es una potente herramienta en investigación.

Hoy en día la PCR es la técnica estándar para la detección específica, rápida y sensible de los patógenos víricos y bacterianos en muestras clínicas. Su potencial está basado en la sensibilidad y posibilidad de diagnosticar patógenos que no se pueden cultivar. Sin embargo, la PCR no es útil para detectar patógenos de los que carecemos de información genética para el diseño previo de cebadores específicos.

La PCR tampoco distingue la capacidad de replicación de microbios (que en ocasiones puede tener importancia), ya que se limita a detectar la presencia del ácido nucleico. Por ejemplo, la resistencia bacteriana a los antibióticos es preferible mostrarla mediante el cultivo de bacterias en presencia del antibiótico, aunque también existe la posibilidad de examinar los genes responsables del desarrollo de dichas resistencias. Sin embargo la PCR tiene varias ventajas sobre las técnicas tradicionales basadas en anticuerpos, que miden la respuesta inmune del animal a un patógeno. En particular, las pruebas de PCR son capaces de detectar la presencia de agentes patógenos antes que los métodos basados en anticuerpos porque la aparición de éstos tarda semanas.

La detección del patógeno en los estados iniciales de la infección puede significar un tratamiento más temprano. Por otro lado la alta sensibilidad de la PCR hace que se pueda detectar un microbio cuando se encuentra en cantidad inferior a la que causa la enfermedad, es decir, durante una infección subclínica. Diagnósticos más sofisticados pueden descubrir

Figura 2. Analítica de producto de PCR en gel electroforesis. M=marcador de tamaño. En las muestras 1 a 7 se ha amplificado el patógeno, es decir, estas muestras pertenecen animales infectados. En las muestras 8 a 10 no se ha amplificado el patógeno, es decir, estas muestras pertenecen animales no infectados con este patógeno.



Las pruebas de PCR son capaces de detectar la presencia de agentes patógenos antes que los métodos basados en anticuerpos

rápidamente el origen de un virus o diferenciar entre un virus proveniente de una vacuna y el de la infección vírica natural.

Las técnicas de PCR se pueden utilizar para estudios de la propagación de la infección, y así seguir la expansión de enfermedades infecciosas a través de continentes o países. Los investigadores pueden elucidar los modos,

rutas y velocidad de transmisión del patógeno. Además, la PCR se puede utilizar para investigar los genes involucrados en patogenicidad y virulencia de organismos infecciosos. Este tipo de investigación podría conducir a una mejor comprensión de las infecciones, permitir la diferenciación de las cepas patógenas y no patógenas o ayudar en el desarrollo de nuevas vacunas. ■

Investigadora observando un gel de electroforesis en el ordenador.



Aislamiento e identificación de bacterias



Ana María Pérez de Rozas
Investigadora del CReSA
ana.perezderozas@cresa.uab.cat

Investigadora de CReSA-IRTA. Trabaja con bacterias con métodos tradicionales y también con técnicas moleculares. Realiza estudios de resistencias a antibióticos y de salud intestinal.

Las bacterias son organismos unicelulares de pocas micras de tamaño y de su estudio se encarga la bacteriología. Las bacterias se pueden encontrar en todas partes, incluso en condiciones ambientales muy extremas, y son muy abundantes: en un gramo de tierra puede haber hasta 40 millones, y en un mililitro de agua dulce, un millón.

Las bacterias intervienen en muchos procesos biológicos pero la gran mayoría son todavía desconocidas al no

Los medios de cultivo generales (sólidos o líquidos) son muy ricos en nutrientes y permiten la multiplicación de las bacterias

poder ser aisladas ni identificadas (cerca del 90% de las bacterias son no cultivables). Algunas bacterias son beneficiosas para los seres vivos, intervienen en los procesos digestivos, por ejemplo, y otras son patógenas y producen enfermedades. Cuando en un organismo se produce una disbiosis, es decir, un cambio en las cantidades de los microorganismos beneficiosos por alguna causa externa, se produce también enfermedad.

Como centro de sanidad animal, al laboratorio del CReSA nos llegan muestras de animales de varios orígenes procedentes de granjas, de un proyecto de investigación o de un contrato. Generalmente, son de origen porcino, aviar, bovino y cunícola.

AISLAMIENTO

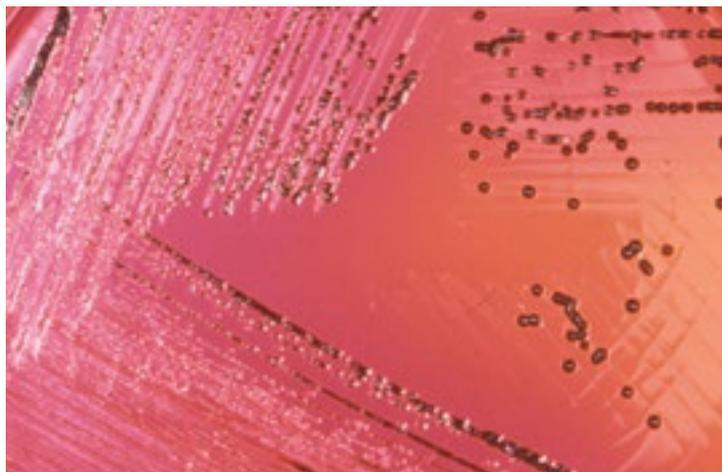
Dependiendo de la procedencia de la muestra, podemos actuar de dos maneras utilizando los medios de cultivo que tenemos a nuestro alcance.

Cuando llegan muestras de campo sin un historial clínico concreto y no sabemos qué puede tener la muestra hay que sembrar medios de cultivo muy ricos para que puedan crecer todo tipo de bacterias. Los medios de cultivo generales (sólidos o líquidos) son muy ricos en nutrientes y permiten la multiplicación de las bacterias. Estos medios son, por ejemplo, Agar Sangre (AS), Trypticase Soy Agar (TSA) o

Agar chocolate polivitex (PVX). Los medios sólidos te permiten ver todas las colonias diferentes que podemos encontrar en una muestra, mientras que cultivos en caldo se utilizan cuando tenemos un cultivo purificado de una bacteria: Trypticase Soy Broth (TSB), Brain Heart Infusion (BHI).

En el caso de un estudio de investigación o de un contrato en el que estamos trabajando con determinadas bacterias, e incluso cuando el veterinario de campo envía con la muestra un historial clínico y sus sospechas de la posible enfermedad del animal, usaremos medios específicos de enriquecimiento y/o selectivos. Estos medios nos ayudan mediante diversas sustancias que hacen que se favorezca el crecimiento de la bacteria que buscamos y se inhiban otras. Para el aislamiento de *Escherichia coli* utilizaremos el Agar MacConkey (Mac-A), para *Enterococcus spp.* el KF *Streptococcus* Agar (KFSA), para *Salmonella spp.* el medio Xilosa-Lisina-Tergitol 4 (XLT4), etc. En estos medios, observamos si tenemos o no la bacteria que buscamos, generalmente con una reacción de color.

Para trabajar con bacterias hay cumplir con tres aspectos fundamentales: tener un cultivo puro, para lo cual, mediante estrías por agotamiento obtenemos colonias aisladas; otro es saber si las bacterias son Gram positivas o Gram negativas (según tengan o no un de-



Placa de cultivo de bacterias en agar sangre (fuente: CDC library).

terminado tipo de pared bacteriana, lo que constituye la separación básica de las bacterias en dos grandes bloques de características diferentes); y por último, también es muy importante saber qué tipo de atmósfera necesitan para vivir, así las bacterias pueden ser aerobias (crecen en una atmósfera normal), anaerobias (su atmósfera necesita mayor concentración de CO₂ y casi nada de O₂) y microaerófilas (crecen con unas determinadas concentraciones de CO₂ y de O₂, 10% y 5%, respectivamente).

A partir de los primeros cultivos (primoiniciación) separamos las diferentes colonias (frecuentemente, en un medio rico, se obtienen cultivos mixtos). La diferenciación se hace por morfología, tamaño, color, clonando una vez, es decir que nuestro cultivo puro partirá de una sola colonia (esto sólo puede realizarse una vez) sembrando cada una por separado.

IDENTIFICACIÓN

Una vez tenemos el cultivo puro debemos hacer una tinción de Gram para saber a qué grupo pertenece. A partir de aquí hay que ver de cada colonia

sus características morfológicas, tamaño y color, y ver sus características bioquímicas.

Hay pruebas de tipo enzimático directo: las más frecuentes son la oxidasa y la catalasa. Otras se basan en el análisis de diferentes vías metabólicas: fermentación de azúcares: glucosa, sacarosa, etc. Otras se centran en la liberación de diferentes sustancias: hemolisinas, toxinas, etc.

Antiguamente, la identificación bioquímica se hacía utilizando bancos de tubos con las diferentes pruebas bioquímicas. Era un trabajo muy lento porque las pruebas se iban realizando según los resultados obtenidos con anterioridad y los cultivos son siempre al menos de 24h.

Actualmente hay sistemas más o menos sistematizados para hacer todo esto. Uno de los más extendidos es el sistema API, que consiste en unas galerías de pruebas que, con lectura de los cambios de color de las pruebas, se obtiene una secuencia de números que corresponden a una determinada especie bacteriana. El problema del API es que son pocas pruebas bioquí-

micas y la lectura es bastante subjetiva. Además, no siempre la secuencia numérica obtenida corresponde a una identificación.

En el CReSA disponemos de un sistema totalmente automatizado cuyos resultados se obtienen de forma totalmente objetiva. Es el sistema VITEK (Biomérieux, Francia) que trabaja con un soporte semejante a una tarjeta de crédito con 64 pocillos (pruebas bioquímicas y controles) que en unas horas te da la identificación, también mediante un código numérico, de una lectura que realiza el aparato cada 15 minutos de la densidad óptica de cada pocillo. El único requerimiento es tener un cultivo puro y saber si la bacteria es Gram positiva o negativa porque el tipo de tarjeta que se usa es diferente (diferentes pruebas en cada caso).

Finalmente, el conocimiento del genoma de diferentes bacterias ha permitido en los últimos años el desarrollo de herramientas moleculares que permiten identificar y cuantificar múltiples especies bacterianas, incluso en condiciones de no viabilidad. ■

Las pruebas bioquímicas permiten identificar las bacterias con las que se trabaja.



Aislamiento e identificación de virus



Rosa Rosell Bellsola
Investigadora del CReSA
rosa.rosell@cresa.uab.cat

Investigadora CReSA/
Departament d'Agricultura Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya (DAAM).
Responsable del diagnòstic de enfermedades víricas de declaración obligatoria por encargo del DAAM e investigadora de la línea de investigación en Pestivirus.

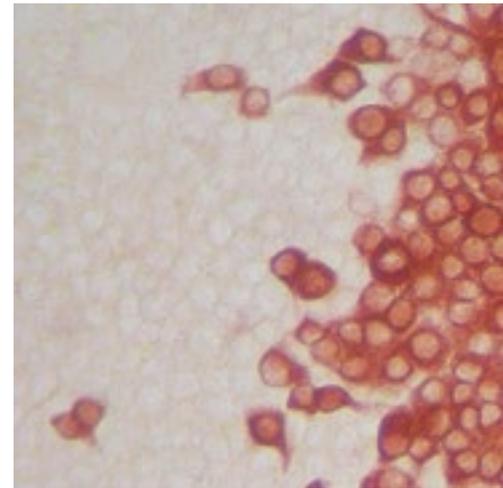
Los virus son unos parásitos intracelulares estrictos ya que carecen de estructura celular, tampoco tienen un metabolismo propio y necesitan una célula hospedadora para poder multiplicarse utilizando para este fin la maquinaria celular.

Para aislar un virus de origen animal es preciso disponer de células vivas para su replicación. El origen de las células puede ser a partir de animales de experimentación (el hospedador inicial puede ser un animal susceptible al virus, pero a efectos de investigación es deseable disponer de hospedadores más manejables) o de huevos embrionados de gallina, utilizados mayoritariamente para el aislamiento y producción de virus aviares como influenza, Newcastle, etc.

Pero los cultivos celulares son el método más ampliamente utilizado para el aislamiento y propagación de virus, y constituyen una herramienta básica de aplicación fundamental en el diagnóstico viral ya sea médico o veterinario.

Los cultivos celulares han sido fundamentales para el desarrollo de la virología al permitir la replicación y estudio posterior de los virus. Algunos datos históricos de los cultivos celulares: Wilhem Roux en 1885 mantuvo células de embrión de pollo en solución salina durante unos días; Roux y Jones en 1916 emplearon por vez primera extractos enriquecidos en tripsina para disociar células de embriones de pollo, estableciendo el primer cultivo celular; en 1952. Grey y col. establecen la primera línea celular continua, las renombradas células HeLa y en 1955 Eagle realiza la primera investigación sistemática de los requerimientos nutritivos de las células en cultivo.

Las células pueden crecer en suspensión o de manera adherente. Algunas células viven de forma natural sin adherirse, como las que existen en el torrente sanguíneo. Otras necesitan una superficie, como la mayoría de células derivadas de tejidos sólidos. Para la propagación de los virus, los cultivos celulares más usados son los cultivos en monocapa que consisten en una capa de células que crecen adheridas a la superficie del recipiente. Estos cultivos se preparan tratando el tejido original u otra monocapa por acción de una enzima (tripsina) y/o un agente quelante, que rompen el cemento intercelular que separa las células, para luego transferir la suspensión celular obtenida a un recipiente en donde las células se adhieren y multiplican for-

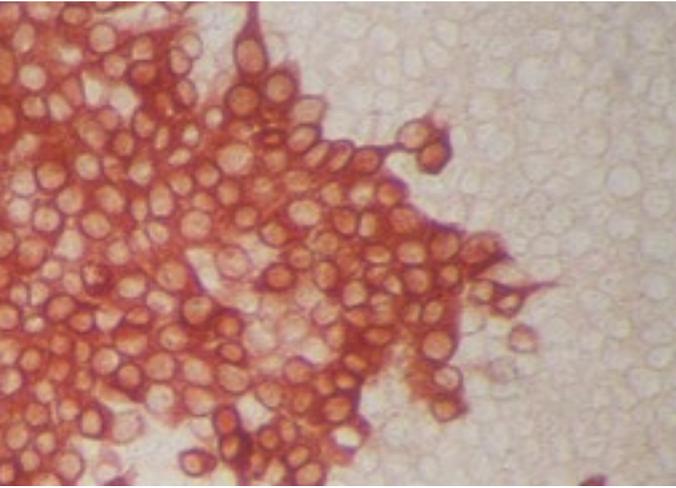


mando una capa fina de células que se llama monocapa celular. Esta crece en un medio de cultivo rico en nutrientes (albúmina, vitaminas, sales, glucosa, etc.) y en condiciones de temperatura, pH, CO₂ y humedad controlada.

Entre los sistemas de cultivos celulares más utilizados tenemos:

Cultivos primarios: se obtienen a partir de células disgregadas de un tejido original tomado de un órgano de un animal recién sacrificado. Conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas, células diploides, su crecimiento in vitro es limitado (1-5 subcultivos). El estar más cercanas a las células que las originaron, se ve reflejado en una mejor actividad y funcionalidad que las hacen más idóneas para los aislamientos primarios de cepas virales que las líneas celulares continuas.

Líneas celulares continuas: están formadas por células que se diferencian genética y morfológicamente de las células de las cuales se originaron, son células heteroploides. Pueden proceder de células tumorales o de un proceso de transformación por métodos físicos-químicos de un cultivo primario; crecen de manera indefini-



da. Las líneas celulares continuas permiten disponer de un stock ilimitado de células idénticas ya sean congeladas o en crecimiento en botella de cultivo para el diagnóstico, investigación, producción de vacunas, etc. Los distintos cultivos celulares varían en cuanto a su susceptibilidad a los diferentes virus, ya que existe una relación específica entre el huésped y el virus, por lo que es imprescindible en los laboratorios virológicos disponer de una amplia variedad de líneas celulares con el fin de poder asumir el aislamiento y la identificación de los virus.

TÉCNICAS DE VALORACIÓN DEL CRECIMIENTO VÍRICO EN LOS CULTIVOS CELULARES

Efecto citopático (ECP)

El efecto citopático son cambios degenerativos específicos (pérdida de morfología, contracción celular, inclusiones citoplasmáticas, formación de sincitios, lisis celular, etc.) observados por microscopía en una línea celular como consecuencia de la replicación de un virus.

Identificación del virus de la peste porcina clásica mediante la técnica de inmunoperoxidasa.

Hemoadsorción

La técnica de hemoadsorción se basa en la capacidad de los glóbulos rojos de determinada especie animal de unirse a proteínas virales que tienen capacidad hemoaglutinante. Si se dispensa glóbulos rojos a una monocapa de cultivo celular infectada con virus es posible observar microscópicamente la adherencia de los mismos a células que contienen virus. Por medio de esta técnica, es posible demostrar la infección por aquellos virus que presentan proteínas hemoaglutinantes.

Hemoaglutinación

La hemoaglutinación es uno de los métodos indirectos más comunes para cuantificar partículas virales en suspensión. Un virus hemoaglutinante es capaz de aglutinar glóbulos rojos (GR) de determinada especie animal. Por ejemplo para titular virus de Newcastle obtenido de huevos embrionados inoculados se utilizan GR de gallina; para titular virus hemorrágico del conejo se utilizan GR humanos.

Inmunofluorescencia (IF) e inmunoperoxidasa (IP)

Detección de células infectadas mediante anticuerpos específicos o antisueros generados contra un determinado virus. El anticuerpo o antisuero está marcado con una molécula fluorescente (isotiocianato de fluoresceína, IF) o con un enzima (peroxidasa, IP). La lectura, mediante un microscopio, permite observar que las células infectadas con el virus muestran fluorescencia (técnica de IF) o están teñidas de marrón (técnica IP).

Inhibición de la hemoaglutinación (IHA)

La IHA se fundamenta en el bloqueo de las proteínas virales hemoaglutinantes mediante anticuerpos específicos frente a un virus determinado.

Cuando se enfrenta un virus desconocido a un suero específico, éstos se unen impidiendo la hemoaglutinación (provocando la IHA). Esta técnica es utilizada para tipificar (identificar) virus con capacidad hemoaglutinante. Tanto la lectura del ECP como de las técnicas serológicas de IF y IP necesitan observadores entrenados que determinen correctamente lo que es positivo o negativo.

Técnicas moleculares

Aunque el aislamiento de virus se considera como técnica *gold standard*, hoy en día con el desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular, el cultivo ya no es la técnica más sensible. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en una reacción enzimática mediante la cual se amplifica selectivamente una secuencia específica de ADN o ARN del virus. Con esta técnica es posible en pocas horas obtener un resultado específico de detección de virus tanto de las muestras obtenidas a partir de aislamientos en cultivos celulares infectados, así como también de muestras clínicas directamente.

Aunque las nuevas técnicas desarrolladas para la detección de virus hayan desplazado por su rapidez y sensibilidad el aislamiento de virus mediante los cultivos celulares, estos siguen siendo imprescindibles para poder aislar (elaboración de ceparios) y multiplicar los virus para las técnicas de sueroneutralización, la producción de vacunas virales, determinación de actividad antiviral, desarrollo de técnicas diagnósticas utilizadas en la detección de un agente en particular, estudios estructurales y bioquímicos de los virus. ■

Pruebas diagnósticas basadas en la respuesta inmunitaria



Dra. Sonia Pina Pedrero
Investigadora del CReSA
sonia.pina@cresa.uab.cat

Investigadora de CReSA-IRTA en la línea de infecciones respiratorias bacterianas, y en la línea de patogenia y profilaxis de infecciones por Asfivirus.

Los animales y seres humanos están en contacto diariamente con una multitud de microorganismos, parásitos, bacterias, virus, hongos... Algunos de ellos son beneficiosos o al menos inocuos, y otros producen infecciones que pueden ser mortales. Pero el organismo posee un sofisticado sistema defensivo llamado sistema inmunitario capaz de reconocer y eliminar estos microorganismos.

El reconocimiento inmunitario produce una activación de células es-

pecializadas (respuesta celular) que llevan a la producción de anticuerpos (respuesta humoral) encargados de interactuar y eliminar el invasor. Los anticuerpos son detectados en el suero (componente líquido de la sangre) unos 5 a 7 días después de la infección y pueden persistir durante varios meses. Esta propiedad es utilizada en los ensayos serológicos que son determinantes para establecer el diagnóstico clínico de un gran número de enfermedades infecciosas. Los anticuerpos reconocen estructuras diferentes, llamadas antígenos, presentes en microorganismos.

Varios tipos de técnicas permiten detectar la respuesta humoral. Hay cinco tipos fundamentales de pruebas serológicas: la reacción de precipitación, de aglutinación, de fijación del complemento, de inmunofluorescencia y el enzimoimmunoanálisis (ELISA):

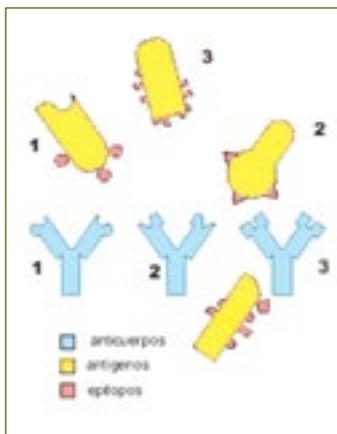
- La reacción de precipitación se basa en la formación, en medio líquido, de grandes agregados de microorganismos (preferentemente inactivados) y anticuerpos, específicos de estos microorganismos, presentes en el suero. Estas precipitaciones son más visibles en el ensayo de Ouchterlony, donde anticuerpos y antígenos difunden radialmente en placas de agar.

- En la prueba de aglutinación el antígeno o el anticuerpo se fijan a una partícula de gran tamaño que pue-

de ser una célula o una bola de látex y forman un coágulo que es fácilmente visible.

- La activación y fijación del complemento constituye un importantísimo mecanismo efector del sistema inmune, que facilita la eliminación en particular de bacterias y parásitos. El sistema complemento es un conjunto de proteínas del suero, que interaccionan entre sí y con los anticuerpos fijados a microorganismos que llevan a la destrucción de estos últimos. Para el diagnóstico, se utilizan glóbulos rojos y antisueros capaces de destruirlos (hemolíticos) mediante el complemento. Si a esta mezcla se añade en exceso un microorganismo y anticuerpos que lo reconocen, el complemento será utilizado por este nuevo complejo y no por el constituido con glóbulos rojos. La lectura del ensayo es la inhibición de la hemólisis.

Esquema de tres anticuerpos capaces de distinguir a tres tipos de antígenos. La forma de los epitopos del antígeno se ajustan como piezas de rompecabezas en los extremos de la Y del anticuerpo correspondiente.



Los anticuerpos reconocen estructuras diferentes, llamadas antígenos, presentes en microorganismos



Con la posibilidad de hacer anticuerpos monoclonales, dirigidos hacia una parte muy concreta (epítipo) de un antígeno, se han podido desarrollar ELISA de competición, mejorando grandemente la especificidad de estos ensayos. En general, el anticuerpo monoclonal está ligado a una enzima y compite con anticuerpos del paciente reconociendo el mismo epítipo. Los resultados con este ensayo se expresan en porcentajes de competición. En el ELISA tipo “sandwich”, destinado a detectar la presencia de antígenos en fluidos biológicos, se recubre el pocillo con un primer anticuerpo contra el antígeno. Posteriormente se aplica la muestra problema en la que se puede encontrar el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después se incubaba con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado y la lectura se efectúa como previamente se ha descrito.

Técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Las células sanguíneas, en especial los linfocitos reaccionan específicamente contra microorganismos o fragmentos de ellos. Esta estimulación resulta a menudo en la excreción de moléculas inmunomoduladoras como el interferón-gamma. Los ensayos derivados de respuestas celulares son utilizados para el diagnóstico de enfermedades cuyos agentes causales inducen pocos anticuerpos. Este es el caso de la tuberculosis. El ensayo se divide en dos fases, la primera es de estimulación de linfocitos de memoria sanguíneos (que ya han estado en contacto previamente con el agente patógeno), la segunda fase es la detección del interferón-gamma en el suero. El interferón gamma se pone en evidencia mediante un ELISA “sandwich” con dos anticuerpos específicos. ■

- En las pruebas de inmunofluorescencia los sueros de pacientes son detectados por conjugados, ellos mismos ligados a moléculas fluorescentes que permiten observar fácilmente la reacción con el antígeno en el interior de tejidos o sobre células. Esta técnica requiere el uso de microscopios acoplados a una fuente de luz capaz de excitar la molécula fluorescente.
- ELISA es el acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). Actualmente, es la técnica más utilizada para el serodiagnóstico de enfermedades infecciosas. Se han desarrollado múltiples variantes de ensayos ELISA que permiten o detectar anticuerpos dirigidos hacia un antígeno particular, o detectar antígenos presentes en fluidos biológicos. Se aprovecha la capacidad de ciertos plásticos trans-

parentes en adsorber proteínas para fabricar placas de ensayo en formatos fácilmente manejables y adaptados a aparatos llamados lectores de ELISA. En el ELISA indirecto se detecta la presencia en sueros de anticuerpos específicos. Las placas se recubren con un antígeno (previamente purificado o enriquecido), y se incuban con la muestra problema (suero) que puede contener anticuerpos contra el antígeno. Posteriormente se añade un anticuerpo secundario (llamado conjugado), previamente ligado a una enzima, y reactivo contra el primero. Finalmente, la lectura del ensayo se efectúa añadiendo un sustrato colorimétrico (cromógeno) que al ser degradado por la enzima produce un color determinado. La intensidad de la reacción, leída por el lector de ELISA es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos presentes en el suero del paciente.

Evolución tecnológica de los diagnósticos en sanidad animal



Dr. Albert Bensaid
Investigador del CReSA
albert.bensaid@cresa.uab.cat

Investigador del CReSA, responsable del subprograma de investigación del CReSA en enfermedades víricas transfronterizas.

Desde su creación en 1924, uno de los grandes retos de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) ha sido y es impedir que las enfermedades animales se extiendan de un país para otro sin limitar, por lo tanto, el movimiento de animales o productos cárnicos. Los flujos comerciales se aumentan certificando que los animales son libres de enfermedades transmisibles, evitando así costosas medidas de cuarentena. A través de sus centros colaboradores, la OIE ha sido uno de los mayores impulsores del desarrollo tecnológico de métodos de diagnóstico aplicados a la sanidad animal.

Desde 1970, y con la posibilidad de hacer anticuerpos monoclonales, casi todas las enfermedades con mayor impacto económico tienen un ensayo de diagnóstico basado sobre un ELISA de competición. Estos ensayos son permanentemente validados interna-

cionalmente entre los laboratorios de referencia, proveyendo reactivos estándar para los fabricantes encargados de comercializar kits. Desde 1990, la mejora de la especificidad y fiabilidad de estos kits han pasado por la utilización de técnicas de ingeniería genética dando lugar a producción industrial de antígenos recombinantes. Por otra parte, la utilización de substratos quimioluminescentes adaptados a detectores fotónicos de nueva generación ha permitido incrementar la sensibilidad y límites de detección de los ELISA.

A partir del siglo XXI, con el surgimiento de las nanotecnologías, se estudian nuevos formatos de ensayos de diagnóstico. El objetivo es detectar múltiples agentes patógenos o anticuerpos a partir de pequeños volú-

Los flujos comerciales se aumentan certificando que los animales son libres de enfermedades transmisibles



menes de líquidos biológicos. Tanto nanotubos de carbono como nanopartículas de oro sirven de soporte primario para el enlace de biomoléculas, por ejemplo. Las nanopartículas metálicas acopladas con antígenos o anticuerpos son la base para la realización de biosensores. Cuando estas nanopartículas interactúan específicamente con un producto presente en un fluido biológico se produce un impulso eléctrico, que se mide con captadores de electrones.

En los próximos años, deberían entrar en fases de validación una nueva generación de ensayos serológicos con mayor rapidez de ejecución. No obstante, el precio de estos diagnósticos no está aún al alcance de servicios o laboratorios veterinarios de todos los países.

Por otra parte, en los últimos 30 años, los métodos de detección de ácidos nucleicos de los microorganismos,



Veterinarios examinando el ganado de pequeños ganaderos en Mali.

al ganar fiabilidad, han sido progresivamente integrados en los laboratorios de diagnóstico. A mediados de los años 1980, el descubrimiento de la técnica de PCR, fue el punto de inflexión para el desarrollo de técnicas “moleculares” aplicables al diagnóstico. Como para las técnicas serológicas, la ingeniería genética de las enzimas de polimerización de ácidos nucleicos y la calidad creciente de los reactivos utilizados en estos ensayos han permitido el desarrollo de estándares internacionales. A la par, la evolución tecnológica de los termocicladores, aparatos que permiten la realización de las PCR, los han hecho un poco más asequibles y con mayor capacidad de procesamiento de muestras.

A principio del siglo XXI, con la aparición de nuevas moléculas fluorescentes capaces de marcar los ácidos nucleicos y la inclusión de detectores

de fluorescencias en los termocicladores, se ha podido medir en tiempo real las reacciones de amplificación de los ácidos nucleicos. Estas PCR en tiempo real permiten no simplemente una mejora en la rapidez de ejecución del ensayo sino aumentar la especificidad y cuantificar la carga del organismo patógeno en las muestras biológicas. Se puede decir que actualmente estas herramientas son universalmente utilizadas no solo para el diagnóstico de enfermedades infecciosas sino también para evaluar la eficacia de tratamientos profilácticos.

El futuro de las técnicas moleculares reside seguramente en la mejora tecnológica y en la democratización de las secuenciaciones en masa de ácidos nucleicos a partir de muestras biológicas o ambientales. Si bien actualmente se utilizan en investigación para la caracterización de nuevos agentes patógenos, para la detección de variantes genéticas de estos agentes o para evaluar la complejidad en microorganismos de muestras variadas, el proceso de validación de estas nuevas técnicas deberá franquear las pruebas

de robustez (reproducibilidad, sensibilidad, especificidad etc...) entre diferentes laboratorios de referencia. No hay antagonismo entre pruebas de diagnóstico serológicas o moleculares, sino complementariedad. La confirmación de positividad de estos dos tipos de ensayos permite confirmar muy a menudo un diagnóstico sin efectuar el aislamiento del agente patógeno u otras pruebas serológicas como las seroneutralizaciones, más largas y a veces costosas. La rapidez de un diagnóstico condiciona la actuación de los servicios veterinarios y por lo tanto la extensión de una enfermedad. En el pasado, se desarrollaron kits de diagnóstico de campo, es decir ensayos rápidos que no requerían el uso de aparatos sofisticados. Al ser de poca sensibilidad, animales infectados podrían no ser detectados, y estos kits tuvieron poca utilidad. Sin embargo, la miniaturización de los aparatos acoplados a medios de comunicación eficientes (envío de los resultados primarios a laboratorios especializados) dejan entrever nuevas posibilidades para el futuro de estos kits “portátiles”. ■

Cría de cerdos ibéricos en Córdoba, España.



© A.Thiermann / OIE

Alberto Allepuz: peleándose entre ordenadores en Barcelona

Entrevistamos a Alberto Allepuz, investigador de CReSA-UAB, que nos explica su trayectoria profesional y la tendencia de los últimos años de abordar cada vez más los problemas sanitarios de una manera integral, en un ambiente de trabajo multidisciplinar y colaborativo.



Dr. Alberto Allepuz Palau
Investigador
alberto.allepuz@cresa.uab.cat

Profesión:

Veterinario

Otra profesión soñada:

De pequeño siempre quise ser periodista

Una película:

“Gran Torino” o “el Padrino” muy recomendables

Una música:

Que no dé dolor de cabeza, cualquier cosa excepto la música máquina

Un libro:

Con “Sin noticias de Gurb” de Eduardo Mendoza pasé un buen rato

Un personaje:

En este país hay muchos personajes (¡no sabría decidirme!)

Un lugar:

Los Pirineos

Completa la frase: La investigación...:

... está cada vez peor

¿Cómo iniciaste tu carrera profesional?

Estudié veterinaria en la Universidad de Zaragoza y me licencié en 1999. En mis inicios trabajé en Aragón, en la campaña de saneamiento de brucelosis, y en la vacunación y desparasitación de ovejas.

¿Te quedaste en Aragón?

Todo lo contrario. Después de eso, pasé unos meses en Inglaterra trabajando en el brote de fiebre aftosa en Newcastle (al norte del país) y cuando terminó me quedé un tiempo más trabajando en la campaña de tuberculosis, esta vez en el sur del país (en Worcester). Más tarde, a través de una ONG marché unos meses a Perú para colaborar en un proyecto de sensibilización sobre leishmaniosis. En noviembre del 2002 aterricé en Barcelona.

¿Y cuál es tu experiencia desde tu llegada a Barcelona?

Desde entonces he combinado la investigación con la docencia, como asociado al principio y ayudante después, hasta que conseguí leer la tesis doctoral en julio del 2008. Actualmente tengo un incierto contrato de profesor con la UAB (como lector que finaliza este año) y la investigación la

desarrollo al 100% en el subprograma de epidemiología del CReSA.

Exactamente, ¿en qué trabajáis en el subprograma de epidemiología?

En este subprograma tenemos una única línea que se llama epidemiología veterinaria. Dentro de esta línea trabajo sobre todo en temas relacionados con la vigilancia de enfermedades, estudios de factores de riesgo, de distribución geográfica de enfermedades y de investigación de brotes.

¿En todo tipo de especies animales?

Anteriormente estuve trabajando en porcino, de hecho hice la tesis con una enfermedad que afecta a los cerdos (virus de Aujeszky) pero actualmente estoy trabajando en dos proyectos de ruminantes, en uno sobre la epidemiología de la tuberculosis bovina en España y en otro sobre lengua azul en Europa. Además de ello, también colaboro en el servicio de asesoramiento que se le da al Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural desde el CReSA, actualmente en lo relacionado con tuberculosis bovina y brucelosis ovina.

Explicanos qué herramientas sueles utilizar para tus estudios

En epidemiología trabajamos mucho con el ordenador (a veces demasiado)

y las herramientas que empleo son programas de análisis estadístico, de simulación y de visualización de datos (como son sistemas de información geográfica).

Y con bases de datos, se supone...

Por supuesto también toca pelearse con bases de datos, aunque personalmente todavía no me he peleado con los programas de manejo de grandes bases de datos y de momento con Excel y Access he tenido suficiente. En las ocasiones en las que tengo que ir a buscar los datos lo que utilizo son cuestionarios epidemiológicos, es decir, encuestas en las que se recogen datos que consideramos de interés para el estudio.

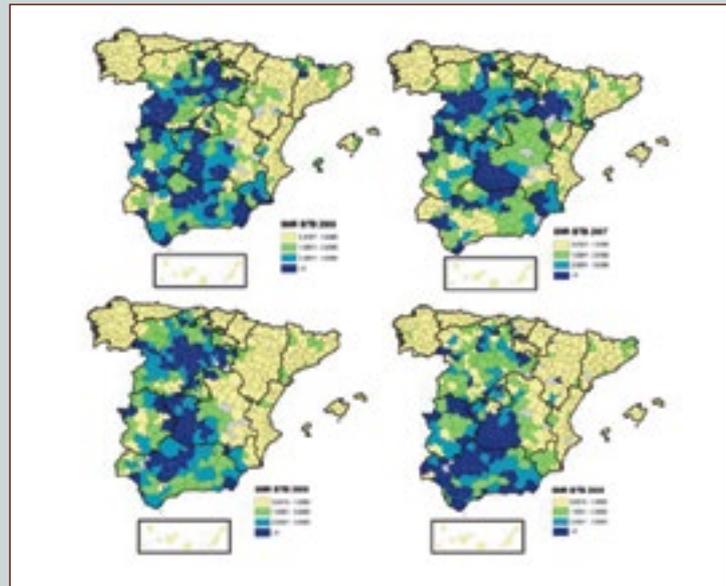
¿Cómo se relaciona tu trabajo de epidemiología con el diagnóstico de las enfermedades?

Si bien en epidemiología existen herramientas desarrolladas para evaluar la capacidad que tienen las pruebas diagnósticas de detectar animales enfermos o sanos, la epidemiología no se centra tanto en el diagnóstico de las enfermedades si no en tratar de comprender cómo se transmiten entre animales y cómo se podrían prevenir o controlar.

¿Cuáles son las nuevas tendencias de futuro en epidemiología?

Quizás la tendencia más clara de los últimos años sea la aplicación del concepto de "One Health" mediante el cual se

Tras el análisis de los datos recogidos se puede evaluar la distribución del riesgo de enfermar en un mapa.



intenta abordar los problemas sanitarios de una manera integral; combinando la salud humana y animal junto con los problemas ambientales y condicionantes económicos y sociológicos.

Y la colaboración debe ser importante...

En este sentido, una tendencia de futuro es el trabajar cada vez más de forma multidisciplinar y colaborar entre veterinarios, médicos, biólogos, estadísticos, matemáticos, informáticos, sociólogos, economistas, etc.

¿Se desarrollan herramientas nuevas?

El rápido desarrollo de la tecnología (potentes ordenadores, distintos tipos de aplicaciones, etc.) ha generado que cada vez haya herramientas de análisis más potentes. Por ello, las técnicas de minería de datos (trabajo con grandes volúmenes de datos) y de complejos modelos matemáticos y estadísticos que tratan de predecir y explicar el comportamiento de las enfermedades están en auge, y parece que en los próximos años la tendencia es que se sigan desarrollando.

Debe ser muy complejo trabajar con tantos datos...

Así es. En algunas ocasiones, da la sensación que los métodos que se están desarrollando superan la calidad de los datos que hay disponibles, y por ello también hay una tendencia a mejorar la calidad de los registros. Esto se ve reflejado en el desarrollo de aplicaciones que facilitan su recogida. Y a pesar de parecer contradictorio con el desarrollo de nuevos y más sofisticados métodos de análisis, también se ve una tendencia a poner los pies en el suelo y a intentar aplicar los diferentes métodos epidemiológicos a la práctica veterinaria diaria.

¿Y se está consiguiendo?

Pienso que este desarrollo se está viendo facilitado por la existencia cada vez más de mejores registros a nivel de granja a la vez que por el desarrollo de aplicaciones y programas libres (gratuitos) que facilitan su uso. Se están buscando metodologías que sean aplicables (y útiles) por los veterinarios clínicos e investigadores que están trabajando en este campo. ■

El Dr. Allepuz trabaja en un proyecto sobre lengua azul en Europa, una enfermedad vírica que afecta a los rumiantes domésticos y salvajes.





Dra. Elisabet Rodríguez González
Responsable de Comunicación
elisabet.rodriguez@cresa.uab.cat

Responsable de Comunicación del CReSA. Diseño y coordinación de las actividades de promoción del centro y de las acciones de divulgación científica y de la innovación, dirigidas tanto al sector agropecuario como al público general.

IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES CEPAS VIRULENTAS DE *HAEMOPHILUS PARASUIS* A PARTIR DE UNA PCR MULTIPLEX PARA DETECTAR AUTOTRANSPORTADORES ASOCIADOS A VIRULENCIA (*vtaA*)

Alexandre Olvera y cols. Vet J. 2012 Feb;191(2):213-8.

Haemophilus parasuis es, además de un microorganismo comensal del tracto respiratorio superior de los cerdos, el agente etiológico de la enfermedad de Glässer. Se han identificado genes de los autotransportadores triméricos (*vtaA*) en *H. parasuis* y se han dividido en tres grupos según la secuencia del dominio translocador. Se realizó una PCR multiplex para diagnosticar *H. parasuis* a nivel de especie y para diferenciar posibles cepas virulentas. Cuando se realizó en muestras de campo, la PCR confirmó la existencia de una alta prevalencia de *H. parasuis* en los cerdos de granja convencionales y demostró que al menos la mitad de los animales era portadora de posibles cepas virulentas. Esta PCR multiplex se podría utilizar para evitar la introducción de cerdos que portan cepas virulentas de *H. parasuis* en granjas que no están afectadas por la enfermedad de Glässer. Sin embargo, se precisa de más estudios interlaboratorios para validar la PCR multiplex, principalmente su valor predictivo para determinar los aislados virulentos.

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN NOVEDOSO ENSAYO DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA CLÁSICA

Pérez LJ y cols. J Virol Methods.

2011 Jun;174(1-2):53-9.



La peste porcina clásica (PPC) es una enfermedad viral extremadamente contagiosa que causa pérdidas económicas importantes en la producción porcina mundial. Debido a la rápida propagación del virus (VPPC) y a la variabilidad de los signos clínicos, se necesitan métodos rápidos y precisos para la detección y el control del virus. En el artículo se describe el desarrollo y evaluación de una novedosa técnica de PCR en tiempo real para la detección y la cuantificación del VPPC utilizando SYBR Green y un análisis acoplado a la curva de fusión. El análisis de 108 homogeneizados de tejido y de muestras de sueros provenientes de cerdos infectados con VPPC de forma natural o experimental, incluyendo muestras de cerdos no infectados, mostró que la PCR era altamente sensible y específica para el diagnóstico rápido de la PPC.

DETECCIÓN Y SEGUIMIENTO DE FLAVIVIRUS TRANSMITIDOS POR MOSQUITOS EN ESPAÑA ENTRE 2001 Y 2005

Carles Aranda y cols. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009 Apr;9(2):171-8.



Entre 2001 y 2005, se capturaron y analizaron 72.895 hembras de mosquito durante la estación de mayor abundancia. Se clasificaron en 4.723 grupos y se observó que pertenecían a 20 especies de *Culicidae*. El objetivo del estudio era, directamente a partir de los homogenatos de los vectores, detectar ARN de arbovirus en el caso de los géneros *Alphavirus*, *Flavivirus* y *Phlebovirus*. El estudio formaba parte de una investigación general que trata sobre la transmisión de arbovirus en cuatro de los humedales más importantes de España, que se encuentran en las provincias de Gerona, Barcelona, Tarragona y Huelva. No se encontró ARN de arbovirus patógenos conocidos. Sin embargo, 111 grupos de mosquitos dieron resultado positivo a *Flavivirus*, el único género detectado. Las secuencias de *flavivirus* identificadas eran diferentes de los *flavivirus* transmitidos por mosquitos conocidos, no obstante, eran muy cercanas al virus *Kamiti River* o al virus *cell fusing agent*, virus detectados solamente en mosquitos de los que se desconoce su importancia a nivel de sanidad animal y salud pública.

PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE LA HEPATITIS E EN ANIMALES DOMÉSTICOS Y EN ROEDORES

Bibiana Peralta y cols. *Vet Microbiol.* 2009 May 28;137(1-2):66-73.

La hepatitis E humana es una enfermedad endémica en muchos países en vías de desarrollo. Varios estudios han indicado que el virus de la hepatitis E (VHE) puede ser un agente zoonótico. Estudios recientes han mostrado que hasta el 97% de las explotaciones porcinas estudiadas en algunos países europeos, entre ellos España, tienen cerdos seropositivos al VHE. En el presente estudio hemos desarrollado y aplicado un ELISA basado en la proteína troncada de la cápside (ORF2) a partir de una cepa de genotipo 3 para cribar los indicios serológicos de infección por VHE en diversas especies de animales domésticos. La seropositividad en las poblaciones



de cerdos estudiadas fue del 71,4%. La seroprevalencia del VHE en ruminantes domésticos fue muy baja o nula, mientras que en los gatos fue alta. Además, este estudio muestra la importancia de adoptar criterios estrictos en el serodiagnóstico, ya que diferentes antígenos pueden presentar diferentes comportamientos.

UN NUEVO MÉTODO ES CAPAZ DE DIFERENCIAR CINCO AGENTES VIRALES EN CERDOS

Pérez LJ y cols. *J Virol Methods.* 2012 Jan;179(1):233-41.

Es frecuente que los cerdos presenten múltiples infecciones virales a causa de unas condiciones de producción intensivas. En este estudio se describe el desarrollo de un novedoso sistema múltiple de PCR en tiempo real con SYBR Green I que permite la detección simultánea y la diferenciación del circovirus porcino 2 (CVP2), el parvovirus porcino (PVP), el herpesvirus porcino 1 (HVP1) y los torque teno sus virus 1 y 2 (TTSuV1 y TTSuV2) en cerdos. El sistema fue capaz de diagnosticar a los cinco agentes víricos con una alta sensibilidad y especificidad. Además, los resultados de los ensayos fueron un 100% congruentes con los resultados previos basados en PCR específica para cada agente y realizados con muestras de campo. El sistema múltiple de PCR en tiempo real se calificó como sensible y los resultados de las pruebas fueron 100 % congruentes con los resultados previos basados en una PCR específica que se llevó a cabo con muestras de campo. Este método podría ser una herramienta útil en los estudios epidemiológicos y para el control de estas enfermedades.

Comunicación científica: otra opción de futuro tras el postgrado



Paula López Monteagudo
Estudiante de postgrado
paula.lopez@cresa.uab.cat

Estudiante de Postgrado del CReSA. Su trabajo se centra en el desarrollo de vacunas frente a la peste porcina africana.

En el momento en el que tenemos que tomar una decisión que afectará a nuestro futuro el miedo nos invade. Acertar con el camino elegido es nuestro deseo, pero nunca sabemos con certeza si nuestra decisión acabará siendo la acertada o no.

Este miedo fue el que yo sentí cuando acabé la carrera de Biología y decidí que los próximos 4 años de mi vida iba a pasármelos en un laboratorio como estudiante de Postgrado. A día de hoy estoy llegando al ecuador de mi doctorado y sé que la decisión que tomé fue la adecuada.

Aunque el hecho de realizar un postgrado implica una gran especialización en un tema muy concreto, la formación que recibes durante este periodo es muy amplia y variada. Adquieres gran cantidad de conocimientos teóricos acerca del tema en el que eliges especializarte, pero además es

una etapa de tu vida en la que te enriqueces como persona. Ves que eres una pequeña porción de un equipo, pero que tu trabajo es necesario para que el grupo de investigación al que perteneces funcione adecuadamente.

A medida que el tiempo va pasando vas aprendiendo a plantear y planear experimentos que tienen como fin resolver determinadas incógnitas. Adquieres la capacidad de interpretar los resultados obtenidos y aprendes a como comunicarlos dentro del ámbito de la ciencia mediante seminarios, exposiciones en congresos o a través de la escritura de artículos en revistas científicas.

Pero, ¿qué hay del interés que estos descubrimientos pueden despertar en el público en general? ¿no puede ser que alguien que no esté vinculado con el mundo de la investigación

esté interesado en saber que avances se están llevando a cabo en su propia universidad, en su ciudad, en su país o incluso a nivel mundial?

Aprender a comunicar a cualquier nivel es una asignatura que, en muchos casos, los científicos tienen pendiente. En la mayoría de ocasiones los científicos se limitan a comunicar sus avances únicamente dentro del ámbito de la ciencia y descuidan el hecho de que la sociedad también puede estar interesada en conocer sus descubrimientos.

Por suerte esta situación de “incomunicación” está cambiando y cada vez la ciencia y la sociedad se acercan un poquito más. Se está apostando por la expansión del conocimiento a todos los niveles y esto está haciendo que la figura de comunicador científico comience a entrar en juego, y ¿quién mejor que alguien que ha estado en el mundo de la ciencia como investigador para hacer asequible al público toda esta información?

Creo que durante nuestra formación doctoral deberíamos aprender a comunicar nuestros avances en diferentes ámbitos y a diferentes niveles, de modo que, una vez finalizado el doctorado, la comunicación científica represente una opción más en nuestra lista de posibilidades laborales de futuro. ■

Aprender a comunicar a cualquier nivel es una asignatura que, en muchos casos, los científicos tienen pendiente

Importancia del diagnóstico para controlar enfermedades

Autora: Dra. Lillianne Ganges Espinosa

Los textos que mostramos a continuación han sido extraídos de algunos de los artículos de opinión sobre la investigación en sanidad animal realizados por los estudiantes que visitan el CReSA a través de la iniciativa Escolab.



DESARROLLOS DE HERRAMIENTAS DIAGNÓSTICAS PARA PREVENIR ENFERMEDADES

“Se ha de destacar la contribución del desarrollo de medicamentos como antibióticos o vacunas, de las herramientas de diagnóstico que han permitido poder prevenir, controlar y solucionar (en lo posible), enfermedades siempre presentes y caras para los que trabajan para la cría de animales para el posterior comercio de comida, lo cual suponía un riesgo para la salud pública”

Xavier y Oriol (17 años)

INTERPRETANDO UN ARTÍCULO CIENTÍFICO. VISIÓN DE FUTUROS INVESTIGADORES

“Leí el año pasado un artículo en la web ElReferente.es que decía que un grupo de científicos de los Estados Unidos había desarrollado un tipo de gatos fosforescentes con células que resisten la infección de un virus que causa el sida felino. Por otro lado, el artículo decía que, se cree que, los resultados del estudio pueden ayudar a los gatos tanto como las personas. Esto sería genial, pero este artículo ya hace un año que lo leí y desde entonces no he vuelto a oír de ningún avance frente al virus del SIDA, ni en humanos ni en felinos ni en ninguna otra especie. Además, ¿este tratamiento tendría el mismo efecto secundario en humanos? Nos volveríamos verdes fosforescente? A mí, personalmente, me cuesta muchísimo de creer”

Diana y Marc (17 años)

SOMOS CONSCIENTES DE LA IMPORTANCIA DEL CONTROL DE LAS ENFERMEDADES

“El control de enfermedades infecciosas en animales es muy importante ya que gracias a ésta se pueden evitar multitud de contagios a humanos a través de la ingesta o tratamientos con animales o productos agrarios”

Susana y Christopher (16 y 17 años)

ME APASIONAN LA INGENIERÍA GENÉTICA Y LOS DESARROLLOS MOLECULARES. ¿SERÁN CONSCIENTES LOS GOBIERNOS?

“Si llego a poder dedicarme a la investigación en algún momento me gustaría que fuera en el campo celular y molecular. Me despiertan interés la biología y la genética molecular y la ingeniería porque, desde mi punto de vista, son la base para conseguir la erradicación de enfermedades, profilaxis contra los virus y el control de los vectores y de las infecciones, por ejemplo. Me sorprenden noticias como una que he leído últimamente, que hace que el interés en este campo y que la admiración por los proyectos y por los que se dedican crezcan. La noticia trataba sobre el desarrollo de nuevas tecnologías en áreas tales como el DNA recombinante y la biología molecular, que han permitido un gran avance en la producción de vacunas más seguras y libres de infectividad residual. Noticias así son buenas de escuchar y espero que con el paso de los años la inversión por parte de las administraciones y de los gobiernos correspondientes crezca y no todo lo contrario. Es futuro y conocimiento.

Anónimo (16 años)

Ciencia es invertir en el futuro... ¿pero quién la paga?

A estas alturas existen pocas dudas en relación a que la investigación científica supone una inversión para un país. No obstante, es una inversión a largo plazo que no da frutos palpables hasta después de unos años de realizarla. Existen ejemplos en muchos países desarrollados donde su propia economía se ha revalorizado gracias a los avances científico-tecnológicos, tales como Alemania, Suecia, Estados Unidos, Japón o Corea del Sur. En estos países ha habido una política científica decididamente orientada al desarrollo y al conocimiento, y definitivamente han apostado por inversiones públicas importantes en este ámbito. Otras fuentes de financiación como podría ser el mecenazgo o el micro-mecenazgo (cada vez más en boga) han ido tomando un mayor protagonismo para poder llevar a cabo iniciativas científico-técnicas que de otra manera no se darían. Ejemplos internacionales serían la Fundación de Bill y Melinda Gates, que ha financiado un número importante de proyectos para el desarrollo de métodos de control de enfermedades, o aquí en España la Fundación Cellex, que ha financiado múltiples proyectos, entre ellos en el campo de la fotónica recientemente. Finalmente, existiría financiación empresarial de una ciencia más aplicada con el objetivo de desarrollar productos que acaben siendo comercializados y que puedan generar beneficios económicos a las empresas que realizan estas investigaciones.

Si la pregunta del título se refiere a quién financia la investigación independiente (no sujeta a los intereses específicos de las empresas de desarrollo de productos), entonces las fuentes de financiación serían las convocatorias nacionales e internacionales (básicamente Europeas en nuestro caso), así como el mecenazgo. El impacto global de éste último es, no obstante, aún muy limitado.

Dicho de otra manera, el grueso de la financiación científica acaba procediendo de las administraciones públicas, o sea, de nuestros propios bolsillos como ciudadanos. Pero esta situación está lamentablemente asociada a la repartición del dinero existente entre las partidas presupuestarias de los gobiernos correspondientes. ¿Qué quiere decir esto? Ni más ni menos que la financiación de la ciencia está a expensas de los recortes presupuestarios que están aplicando nuestros gobernantes actualmente. Y ello se ha traducido en que los recursos económicos públicos destinados a la investigación en España han vuelto a niveles de hace 7 años atrás, después de llegar a un pico máximo en 2009. Si la ciencia es progreso y futuro, es evidente de que, con estas acciones, estamos comprometiendo nuestro futuro como país. Perder centros de investigación e investigadores/as no es perder algo que podamos recuperar mañana; la recuperación en estos ámbitos lleva años y



Dr. Joaquim Segalés Coma
 Director del CReSA
 joaquim.segales@cresa.uab.cat

la pérdida no repercute en el momento en que se produce, sino que es una pérdida con claras consecuencias para el futuro. Es más, luego también habría que preguntarse ¿por qué hemos invertido tanto dinero en la formación de estas personas? Al fin y al cabo, la formación de estas personas también se ha financiado con dinero público y se acaban beneficiando esos países con visión científico-tecnológica que acaban “fichando” a los investigadores/as de nuestro país. Se puede políticamente “recortar” lo que corresponda, ¡pero no se debería “recortar” el futuro de un país en su conjunto! ■

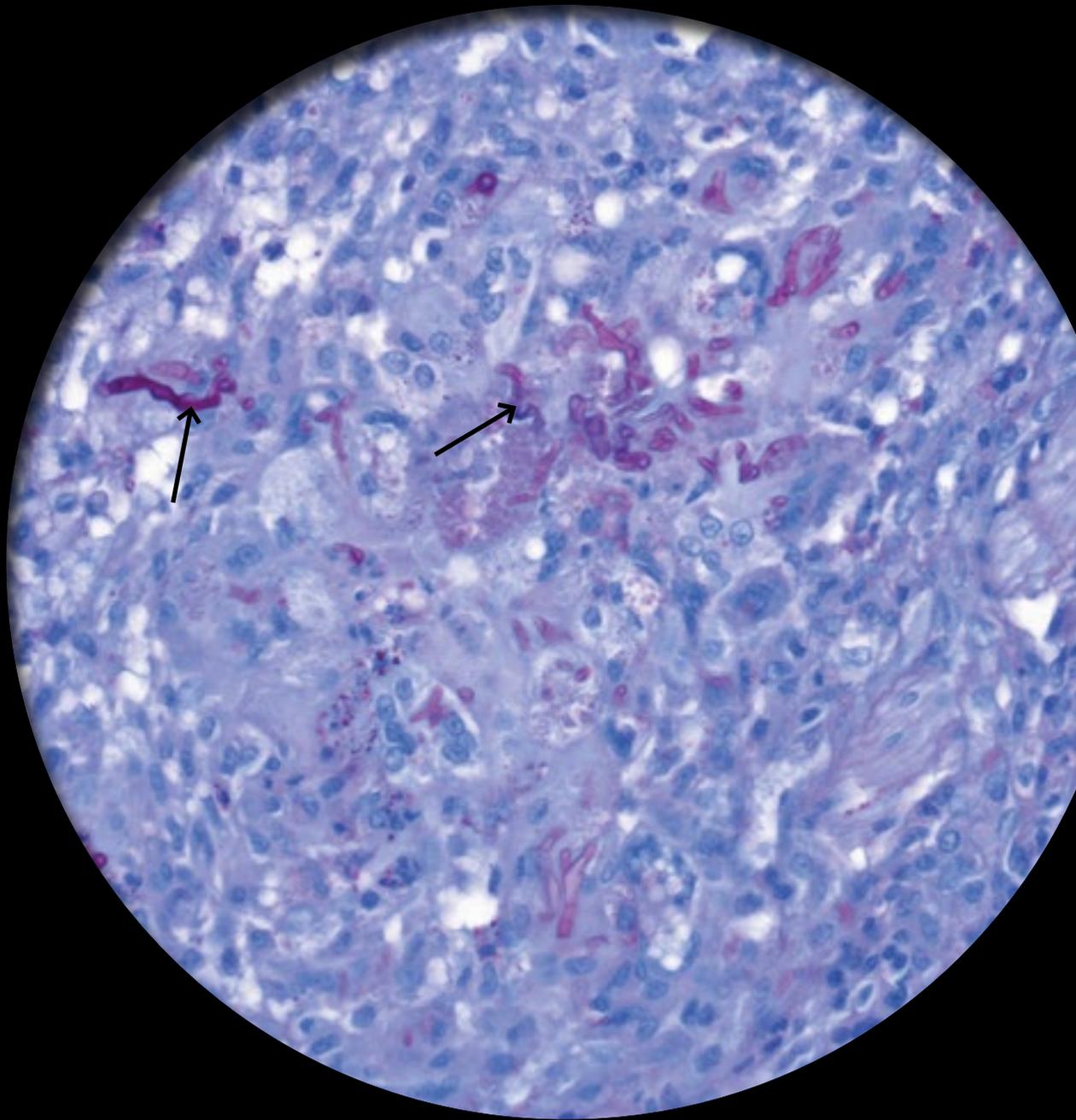
Director del CReSA y Profesor Titular del Departamento de Sanidad y Anatomía Animales de la UAB. Investigador en el área de las enfermedades víricas porcinas, especialmente en infecciones por circovirus porcino tipo 2 (PCV2).



El micromecenazgo es la cooperación colectiva, llevada a cabo por personas que forman una red para conseguir dinero u otros recursos.

Los hongos colonizadores

Granuloma micótico en un pulmón de pollo. Tinción de PAS (Periodic Acid-Schiff). Esta tinción colorea intensamente la pared polisacárida de los hongos y permite la detección rápida de los hongos en los tejidos (x 50 μm).



Nuevas técnicas moleculares, del Jurásico a la televisión de papel



Dr. José Ignacio Núñez Garrote
Investigador del CReSA
ignacio.nunez@cresa.uab.cat

Investigador del CReSA responsable de la línea de investigación sobre el papel de los microRNAs en las infecciones víricas del cerdo.

Aunque hoy día resulta impensable, hasta hace poco más de una década no era reconocido un diagnóstico mediante técnicas moleculares por la Organización Mundial de Sanidad Animal. Las técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico están basadas principalmente en la detección específica del material genético de los patógenos, ya sea ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). Inicialmente se basaron en la detección por hibridación con el ácido nucleico, que rápidamente fue desplazada por la amplificación del ácido nucleico mediante la técnica de ampli-

En la película Parque Jurásico el ADN de los dinosaurios se amplificaba por PCR.



ficación en cadena de la polimerasa, conocida como PCR (Polymerase chain reaction).

El descubrimiento de la PCR dio lugar a la concesión de un premio Nobel, además de constituir el fundamento científico para la realización de la película Parque Jurásico, donde se amplificaba por esta técnica el ADN de los dinosaurios. La amplificación se realiza con la ayuda de un equipo llamado termociclador y se visualiza mediante geles de agarosa. Así resulta muy rápido, fácil y preciso identificar virus, bacterias, u otros patógenos.

La PCR en tiempo real es una técnica de PCR que amplifica y simultáneamente cuantifica de forma absoluta el producto de la amplificación. Para ello emplea reacciones similares a la PCR convencional pero adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo. Esta reacción se realiza en un termociclador con sensores para medir fluorescencia, que excitan el fluoróforo a la longitud de onda apropiada y miden la tasa de generación de una o más copias del ácido nucleico específico sin necesidad de hacer geles de agarosa.

Se han desarrollado múltiples variantes a partir de la PCR convencional, como la amplificación isotérmica ó LAMP PCR, que no requiere de un aparato

termociclador. Las PCR multiplex que permiten incluir distintos patógenos en un solo ensayo, o las PCRs anidadas y semianidadas, entre otras. Paralelamente asociado al desarrollo de las técnicas de amplificación, se ha producido un avance en los dispositivos, basados en nuevos “sistemas de detección de señales” como los sistemas integrados miniaturizados que combinan la preparación del ácido nucleico

El descubrimiento de la PCR dio lugar a la concesión de un premio Nobel

de una muestra de partida y la amplificación múltiple de distintos ácidos nucleicos para distintos patógenos de una forma rápida, sensible y específica. Las técnicas moleculares que basan la amplificación del ácido nucleico en métodos isotérmicos (como el LAMP PCR) al no requerir el uso de aparatos termocicladores, si se emplea un método de detección de los productos amplificados por fluorescencia, se pueden trasladar por ejemplo a una granja, obteniendo el resultado de forma muy rápida al lado de individuo enfermo “*pen side*”, sin necesidad de transportar las muestras al laboratorio.



Dentro de las técnicas basadas en la hibridación de ácidos nucleicos, un avance importante consistió en el desarrollo de la tecnología de “microarrays” conocidos como “chips de DNA”. Se basan en la unión de fragmentos de DNA a una superficie sólida (vidrio, plástico o silicio) que hibridan con la muestra problema identificando el patógeno presente en la misma. Un ejemplo de enfermedad en la que este chip tiene una mayor aplicación es el diagnóstico del virus influenza, puesto que permite la detección, subtipado y caracterización del virus de forma rápida.

La secuenciación del ácido nucleico, esto es, el conocimiento de la disposición de las bases que componen el ADN, constituye la caracterización más detallada que se puede hacer de un organismo. Acoplada la técnica de secuenciación rápida a la amplificación específica por PCR permite realizar un diagnóstico preciso e inequívoco, igualmente permite realizar estudios de “epidemiología molecu-

lar” que pueden dar información del origen de un brote, de la eficacia de las vacunas utilizadas, de la evolución viral, etc. Esta herramienta ha sido de gran valor para el diagnóstico y control de muchas enfermedades en todo el mundo como la fiebre aftosa, la peste porcina clásica, la gripe, el SIDA, la hepatitis C, entre otras. También permite estudiar, por ejemplo, resistencia a fármacos o escapes a la vacunación, analizando las mutaciones que se producen como respuesta frente a estos.

Actualmente se han desarrollado nuevas técnicas de secuenciación masiva, como la basada en la pirosecuenciación o en el empleo de semiconduc-

La secuenciación del ácido nucleico constituye la caracterización más detallada que se puede hacer de un organismo

Los termocicladores realizan los ciclos de temperatura necesarios para amplificación del ADN.

tores, que permiten obtener gran cantidad de información y a un coste cada vez más reducido. La aplicación de esta tecnología al diagnóstico permite incluso identificar nuevos agentes patógenos y nuevos virus todavía no descritos. Dentro de la siguiente generación de tecnología de secuenciación, todavía en proceso de desarrollo, se incluye aquella que utiliza nanoporos, que no son otra cosa que orificios muy pequeños realizados en superficies biológicas (nanoporos proteicos), o en nuevos materiales como el grafeno, que se puso de moda en 2010 cuando se concedió el Nobel de química a dos investigadores por el descubrimiento de sus propiedades, 100 veces más fuerte que el acero y más delgado que cualquier sólido, que entre otras aplicaciones se estudia su utilización para obtener pantallas de TV flexibles como el papel. En ambos casos, si se hace atravesar una molécula de ácido nucleico por el nanoporo, acoplado a un sistema de detección electrónica capaz de cuantificar una diferencia en el voltaje debido a la partícula que atraviesa el poro, se puede conocer la composición de bases, esto es, la información genética. De esta forma se podrá detectar moléculas individuales a tiempo real sin la necesidad de amplificarlas.

En la actualidad, las técnicas moleculares se están imponiendo como la mejor opción; esto es especialmente significativo en los casos en los que el aislamiento vírico en cultivo celular o el cultivo de bacterias resulta complicado de realizar, como en el caso del circovirus porcino. Otra de las ventajas es que evita la manipulación de agentes vivos, lo que es especialmente relevante en agentes infecciosos que causan problemas de salud grave o cuantiosas pérdidas económicas. ■

DICCIOCReSA

Autora: Dra. Lilianne Ganges Espinosa

AGENTE QUELANTE

Sustancia que forma complejos con iones de metales pesados. A estos complejos se los conoce como quelatos, palabra que proviene de la palabra griega chele que significa “garra”.

ANTICUERPO

Biol. y Med. Sustancia producida en el organismo animal por la presencia de un antígeno, contra cuya acción reacciona específicamente. Anticuerpo monoclonal: anticuerpo específico frente a un único antígeno.

ANTÍGENO

Biol. y Med. Sustancia que, introducida en un organismo animal, da lugar a reacciones de defensa, tales como la formación de anticuerpos.

BIOMOLÉCULA

Molécula constituyente de los seres vivos. Los seis elementos químicos o bioelementos más abundantes en los seres vivos con los que se crean todo tipos de biomoléculas son el carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre.

BIOSENSOR

Instrumento para la medición de parámetros biológicos o químicos. Suele combinar un componente de naturaleza biológica y otro físico-químico.

COMPLEMENTO

Biol. Conjunto de proteínas plasmáticas que actúan mediante reacción en cascada y se fijan finalmente sobre la pared de células ajenas al organismo como las bacterias, a las que destruye.

CULTIVO

Biol. y Med. Método de obtención de microorganismos, células o tejidos mediante siembras controladas en medios adecuados.

FLUORÓFORO

También llamado fluorocromo, es un componente de una molécula que hace que ésta sea fluorescente.

INMUNOMODULADOR

Sustancia que modifica (puede aumentar o disminuir) la capacidad del sistema inmune de ejercer una o más de sus funciones, como la producción de anticuerpos, el reconocimiento antigénico, o la secreción de mediadores inflamatorios.

INTERFERÓN

(Del ingl. interferon, der. de to interfere, intervenir, interferir). Bioquím. Glicoproteína sintetizada por células infectadas por virus, que inhibe la multiplicación de estos.

LISIS CELULAR

Rompimiento de la membrana celular que está compuesta por fosfolípidos que separan el contenido celular del ambiente extracelular.

NANOPARTÍCULA

Partícula microscópica con una dimensión menor de 100 nm.

PIROSECUENCIACIÓN

Tecnología de determinación de secuencia de ADN a gran escala, aplicable a genomas completos, mediante el proceso de emisión de luz condiciones de temperatura ambiente o baja (luminiscencia).

SEMBRAR

Biol. Poner microorganismos, células o tejidos en un medio de cultivo adecuado para su multiplicación.

SINCITIO

En medicina, es una especie de amasijo celular formado por células fusionadas.

TERMOCICLADOR

Aparato que permite realizar los ciclos de temperaturas necesarios para una reacción en cadena de la polimerasa de amplificación de ADN.

CReSA Training Programs: compromiso con la formación

Los CReSA *Training Programs* son cursos y programas de formación organizados por el CReSA a petición de administraciones y empresas. Estos programas versan sobre temas relacionados con las competencias y conocimientos de los investigadores del centro: bacteriología, virología, inmunología, entomología, epidemiología, investigación y desarrollo, patología, diagnóstico, bioseguridad, control y erradicación de enfermedades, etc. Los cursos pueden ser en línea o presenciales (en el CReSA o en las instalaciones designadas por el solicitante) y se pueden impartir en catalán, castellano o inglés.

¿A QUIÉN VAN DIRIGIDOS?

La oferta formativa se dirige a veterinarios, biólogos, productores, técnicos de laboratorio, periodistas científicos, estudiantes y otros profesionales relacionados con las ciencias de la salud, que pertenecen tanto al sector público como al sector privado:

- Administraciones o entidades públicas
- Universidades
- Centros de investigación
- Empresas y cooperativas agroalimentarias
- Empresas farmacéuticas
- Empresas biotecnológicas
- Organizaciones de investigación por contrato (CRO)
- Asociaciones de productores

- Agrupaciones de defensa sanitarias
- Sociedades científicas
- Centros de educación secundaria

¿CÓMO FUNCIONAN?

Los programas de formación se diseñan de forma personalizada, en función de las necesidades del demandante, por lo que se adaptan la temática, los formadores y la duración a cada curso. Para ello, los pasos a seguir son los siguientes:

Paso 1

El solicitante contacta con el CReSA y plantea sus necesidades de formación: objetivos, temas a tratar, número de asistentes y perfil, etc.

Paso 2

El CReSA estudia la propuesta y elabora un programa preliminar, que incluye agenda, contenidos, ponentes y presupuesto.

Paso 3

El solicitante aprueba la propuesta y se acuerdan las fechas de la formación.

PARA MÁS INFORMACIÓN SOBRE LOS CReSA TRAINING PROGRAMS:

Elisabet Rodríguez González
Responsable de Comunicación
elisabet.rodriguez@cresa.uab.cat
Tel.: 935814564



CReSA^R

Centre de Recerca en Sanitat Animal



Edifici CReSA. Campus UAB.
08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès) Spain.
Tel. (+34) 93 581 32 84
Fax (+34) 93 581 44 90
e-mail: cresa@uab.cat
www.cresa.cat

Patrocinadores

