

DESARROLLO DE LA BIOTECNOLOGIA EN EL CENTRO NACIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA. I- SALUD Y MEJORA ANIMAL

Development of biotechnology at National Center of Animal and Plant Health I – Health and animal improvement

María T. Frías Lepoureau, Siomara Martínez Marrero, Lester J. Pérez Rodríguez, Lydia M. Tablada Romero

Resumen:

La Biotecnología ha impactado revolucionariamente en todas las áreas del conocimiento de la Biología. En particular, la biotecnología agropecuaria, específicamente las aplicadas a la salud y mejora animal, tiene un amplio abanico de fines diversos que abarca desde el diagnóstico de enfermedades, el desarrollo de vacunas, la mejora genética de las poblaciones para incrementar su rendimiento o eficacia, la caracterización y conservación de los recursos genéticos pecuarios y la calidad de alimentos.

La contribución que la biotecnología agropecuaria puede brindar, para enfrentar los grandes retos de garantizar la seguridad alimentaria sin destruir la base de los recursos del medio ambiente, es un aspecto a considerar.

Desde mediados de la década de los años 80 del siglo pasado, el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), institución científica creada en 1969, comienza a trabajar en la introducción y aplicación de herramientas biotecnológicas en el desempeño de sus objetivos de trabajo, en sus dos ramas fundamentales: la salud animal y la protección vegetal.

En la presente compilación se exponen algunos resultados de la introducción de estas tecnologías en la salud y mejora animal.

Palabras clave: *Biotecnología animal, diagnóstico veterinario, estudios raciales del bovino, epidemiología molecular*

ABSTRACT:

Biotechnology has a revolutionary impact in all areas of knowledge on Biology. Specifically, agricultural biotechnologies applied to animal breeding and health can be applied to a wide range of different purposes ranging from the diagnostic of animal diseases, vaccine development, genetic improvement of animal populations increasing their performance or effectiveness, characterization and

preservation of livestock genetic resources and improvement of food destined to animals.

The contribution offered by agricultural biotechnologies to face the challenges of ensuring food safety without destroying the base of environment resources is an aspect to be considered.

Since the beginning of the 80s, the National Center for Animal and Plant Health (CENSA), which is a scientific institution created in 1969, began working on the introduction and use of biotechnological tools in the performance of its work goals in its two main branches: animal health and plant protection.

In this review, some results on the application of these technologies on animal health and breeding are presented.

(Key words: animal biotechnology; veterinary diagnostic; animal racial studies, molecular epidemiology)

INTRODUCCIÓN

Los retos de la agricultura para el siglo XXI son diversos y complejos, por lo que asumirlos implica efectuar intervenciones de índoles económica, social, ambiental y tecnológica. En el mundo existe cada vez mayor demanda de alimentos por parte de una población creciente, el fenómeno de la globalización económica en condiciones variables del mercado y una serie de efectos producidos por el cambio climático sobre la producción, por citar algunos de los principales desafíos. (1)

En este contexto, los países en desarrollo se enfrentan a una creciente inseguridad alimentaria que empeorará las condiciones de vida de millones de personas. La necesidad de aumentar, tanto la inversión en investigación como la productividad agrícola, deben estar en el centro de cualquier estrategia para reducir el hambre y la pobreza (2).

Según la FAO (3), el desarrollo y la difusión de nuevas tecnologías son factores importantes que determinarán el futuro de la agricultura. Este estudio, examinó tres aspectos de suma importancia: la biotecnología, las tecnologías que favorecen una agricultura sostenible y la dirección de las futuras investigaciones.

Desde la creación del Frente Biológico en 1981, Cuba ha trabajado intensamente en el desarrollo de la Biotecnología a través de la ejecución de diferentes programas, contando con una red de centros para la investigación y formación del potencial humano necesario para alcanzar los resultados que hoy se muestra. En la actualidad, la industria biotecnológica cubana en general, ha generado 1200 patentes internacionales de diferentes productos. En el 2008, las exportaciones de éstos se incrementaron en el 20% con respecto al 2007 (4) y hoy la biotecnología constituye el segundo renglón de ingresos por bienes exportables (5).

Desde mediados de la década de los años 80, el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), comienza a trabajar en la introducción y utilización de biotécnicas moleculares en el diagnóstico de patologías de interés agropecuario, apoderándose de tecnologías como la Hibridación de Ácidos Nucleicos (HAN) (Peralta, 1986, com. pers.), la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (6) y más recientemente el PCR en tiempo real (7).

Posteriormente los análisis de secuencias de especies de microorganismos permitieron el estudio molecular de diferentes patógenos como base de estudios epidemiológicos (6), a lo que se une la utilización de diversos sistemas de expresión de genes de diferentes patógenos para la generación de candidatos vacunales (8). Se trabaja además, en la utilización de técnicas bioinformáticas para el análisis de los genomas y proteomas de microorganismos de interés para el diseño de nuevos candidatos vacunales y moléculas terapéuticas (9).

En esta revisión se presentan algunos de los resultados de los últimos quince años sobre la utilización de herramientas biotecnológicas en la salud y mejora

animal en Cuba, obtenidos en el CENSA, como una contribución a las investigaciones en Biotecnología en la esfera animal en nuestro país. Estos se agrupan de la siguiente manera:

- ✓ Diagnóstico de patologías veterinarias de etiología microbiana
- ✓ Caracterización molecular y análisis filogenéticos en virus y bacterias emergentes de la ganadería porcina, bovina y aviar
- ✓ Introducción de los análisis moleculares en los estudios raciales del Programa de Genética Bovina nacional
- ✓ Programa de formación de recursos humanos en Biotecnología animal

Diagnóstico de patologías veterinarias de etiología microbiana

El diagnóstico en Medicina Veterinaria constituye la base para el control y erradicación de las enfermedades, de ahí la necesidad de contar con métodos cada vez más sensibles y certeros.

Los métodos de Biología Molecular se aplican cada vez más al diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Para que estos métodos se lleguen a utilizar ampliamente necesitan ser fáciles, específicos, seguros, sensibles, reproducibles y finalmente automatizados para facilitar la evaluación de gran cantidad de muestras (10).

Dentro de las aplicaciones de los métodos moleculares se encuentran la detección de microorganismos no cultivables, de difícil diagnóstico, microorganismos peligrosos o aquellos que están presentes en pocas cantidades en los hospederos (10). La detección de microorganismos no deseados en productos y líneas celulares como parte de la calidad de los mismos, es otro aspecto estudiado a partir de técnicas moleculares (11). Así mismo, la detección a nivel molecular resulta imprescindible en la determinación de sustancias o restos de materiales no permitidos en alimentos, como parte de la vigilancia de determinadas enfermedades (12).

Para la introducción de la tecnología de PCR en el diagnóstico, el CENSA desarrolló la producción de forma recombinante de enzima *Taq* DNA Polimerasa (AmpliCEN), principal fuente de costo en el PCR (13). La obtención de un extracto crudo de *Taq* DNA Polimerasa recombinante permitió la extensión de la tecnología de PCR a diferentes sistemas de diagnóstico de animales y plantas en el CENSA y en varios Hospitales e Institutos de investigaciones nacionales que realizan el diagnóstico de importantes enfermedades. Dentro de las aplicaciones del diagnóstico molecular se destacan:

- ✓ Diagnóstico molecular de virus de interés veterinario

La emergencia y re-emergencia de enfermedades transfronterizas de los animales (TADs *de sus siglas en inglés*) ha tenido un enorme impacto negativo tanto económico como social en todo el mundo. Baste decir que en un período de solo 18 meses la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) reportó numerosos brotes de TADs en tres continentes: fiebre aftosa (África, Asia y Sudamérica),

peste porcina clásica (África, Asia y Europa) e Influenza aviar (África, Asia y Europa). Los sistemas de alerta temprana y la detección rápida e inequívoca de estos agentes son vitales para prevenir la diseminación de las enfermedades a grandes áreas geográficas (14).

El diagnóstico y control de enfermedades virales de importancia económica ha progresado de forma notable en la última década, gracias a la aplicación de tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa basadas en gel (PCR convencional) y en detección de fluorescencia en tiempo real (PCR en tiempo real) (15).

El CENSA ha desarrollado, optimizado y evaluado nuevos ensayos de PCR sensibles y específicos para la detección de virus de importancia veterinaria sobre la base de la recopilación y el análisis de datos de secuencias de genomas virales de interés, la selección de las dianas de amplificación y el diseño de cebadores. Esto incluye la predicción de eficiencia y especificidad de amplificación a través del empleo de herramientas bioinformáticas. Ejemplo de ello son:

- Un ensayo de RT-PCR múltiple para el diagnóstico rápido y diferencial del virus de la peste porcina clásica de otras infecciones por *Pestivirus* en cerdos (16)
- Ensayo de RT-PCR para la detección de infecciones por el virus de la encefalomiocarditis en cerdos (17)
- Ensayo de PCR para la detección del virus de la enfermedad de Aujeszky en muestras clínicas (18)
- Ensayo de RT-PCR en tiempo real para la detección de virus de influenza aviar (IA) subtipo H5 (19) (Fig.1)

Tabla I. Valores de eficiencia de complementariedad de los cebadores propuestos por los Laboratorios de Referencia de la OIE, para la detección de influenza aviar H5 y los cebadores desarrollados por Lee y col., 2001. (Tomada de Pérez y col., 2012a)

Accession number_H5 AI isolate	Spackman et al., 2002 H5HL1/H5HR1	Lee et al., 2001 H5155f/H5699r	Slomka et al., 2007b J3/B2a	Slomka et al., 2007b H5-kha-1/H5-kha-3	VIA Weybridge, UK HA-875/HA-1114r
DQ366314_H5N1_CLADE0	(192*/369)/(397/397)	(397/397)/(297/327)	(350/436)/(396/444)	(392/415)/(293/428)	(368/368)/(457/457)
EF456805_H5N1_CLADE1	(192*/369)/(397/397)	(397/397)/(308/334)	(350/436)/(444/444)	(392/415)/(266/428)	(368/368)/(449/457)
DQ320922_H5N1_CLADE2.2	(192*/369)/(338/397)	(366/397)/(308/334)	(350/436)/(396/444)	(358/415)/(293/486)	(368/368)/(457/457)
DQ992769_H5N1_CLADE4	(192*/369)/(397/397)	(397/397)/(308/334)	(350/436)/(378/444)	(392/415)/(333/428)	(368/368)/(457/457)
DQ366338_H5N1_CLADE2.4	(192*/369)/(338/397)	(397/397)/(244/327)	(405/436)/(396/444)	(392/415)/(293/428)	(317/368)/(457/457)
AY741221_H5N1_CLADE6	(192*/369)/(397/397)	(397/397)/(308/334)	(350/436)/(396/444)	(392/415)/(293/486)	(368/368)/(457/457)
DQ914814_H5N1_CLADE7	(192*/369)/(338/397)	(279/397)/(308/334)	(372/436)/(396/444)	(392/415)/(293/428)	(368/368)/(457/457)
AY950233_H5N1_CLADE8	(192*/369)/(397/397)	(397/397)/(308/334)	(345/436)/(396/444)	(392/415)/(293/486)	(368/368)/(457/457)
EF670479_H5N1_CLADE9	(166*/369)/(338/397)	(397/397)/(308/334)	(350/436)/(396/444)	(392/415)/(293/428)	(368/368)/(457/457)
DQ826532_H5N2_2007_Canada	(257/415)/(300/428)	(210/368)/(394/457)	(261/334)/(327/327)	(239/436)/(272/444)	(250/369)/(320/397)
EF491876_H5N1_2008_Canada	(318/415)/(329/428)	(210/368)/(394/457)	(261/334)/(297/327)	(239/436)/(308/444)	(250/369)/(320/397)
CY036365_H5N2_2001_USA	(369/369)/(320/397)	(334/334)/(327/327)	(242/436)/(302/444)	(223/482)/(304/428)	(124*/368)/(394/457)
EF607854_H5N1_2007_USA	(318/415)/(329/428)	(210/368)/(394/457)	(261/334)/(297/327)	(239/436)/(308/444)	(250/369)/(320/397)
CY028235_H5N2_2007_USA	(318/415)/(329/428)	(210/368)/(394/457)	(261/334)/(297/327)	(239/436)/(308/444)	(250/369)/(320/397)
EU871921_H5N7_2008_USA	(257/415)/(300/428)	(210/368)/(303/457)	(261/334)/(327/327)	(239/436)/(308/444)	(250/369)/(320/397)
AY497096_CK/Mexico/232/94 (H5N2)	(369/369)/(397/397)	(334/334)/(327/327)	(242/436)/(203/444)	(135*/415)/(304/428)	(141*/368)/(394/457)
GU052636_CK/El Salvador/ 102711-2/2001 (H5N2)	(139*/369)/(397/397)	(334/334)/(327/327)	(222/436)/(166*/444)	(143*/482)/(304/428)	(141*/368)/(394/457)
GU186557_CK/Guatemala/ 194573/2002 (H5N2)	(182*/369)/(397/397)	(334/334)/(327/327)	(222/436)/(166*/444)	(157*/482)/(304/428)	(141*/368)/(394/457)
EU099401_CK/Guatemala/ 270475-4/2003 (H5N2)	(127*/369)/(397/397)	(334/334)/(279/327)	(222/436)/(166*/444)	(176*/482)/(304/428)	(116*/368)/(394/457)
DQ256383_A/parrot/CA/ 6032/2004 (H5N2)	(182*/369)/(397/397)	(334/334)/(308/327)	(202/436)/(189*/444)	(157*/415)/(304/428)	(172*/368)/(307/457)
AB275427_CK/Ibaraki/10/ 2005 (H5N2)	(182*/369)/(320/397)	(334/334)/(327/327)	(191*/436)/(193*/444)	(143*/482)/(245/428)	(141*/368)/(367/457)
FJ864690_CK/Mexico/435/ 2005 (H5N2)	(182*/369)/(397/397)	(334/334)/(327/327)	(221/436)/(189*/444)	(157*/482)/(304/428)	(141*/368)/(248/457)

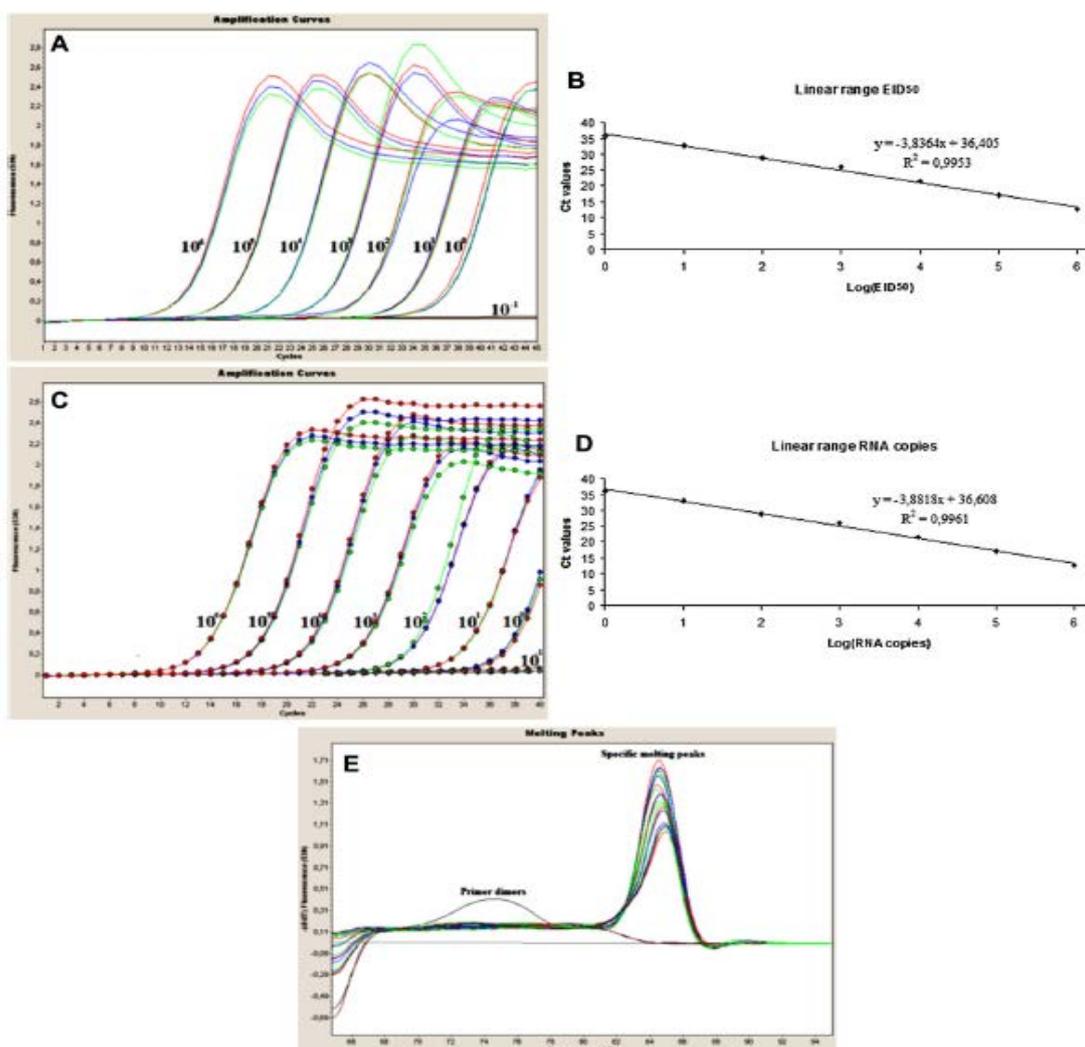


Fig. 1. Ensayo de RT-PCR en tiempo real para la detección específica del virus de influenza aviar subtipo H5, basado en SYBR-Green y la pareja de cebadores seleccionados de la Tabla 1. A y C) curvas de amplificación que muestran la sensibilidad del ensayo por dosis infecciosas y número de copias respectivamente. B y D) rango lineal en ambas condiciones. E) Curvas de disociación específicas de muestras positivas y negativas del ensayo que muestran su especificidad. Tomada de Pérez y col, 2012a

Como se puede apreciar, los cebadores utilizados por los laboratorios de referencia no detectan todas las cepas (cepas americanas, europeas y las nuevas cepas emergentes del nuevo linaje *México B*) a diferencia de los cebadores reportados por Lee y col, 2001. 20. Esto quedó demostrado por primera vez por el estudio “in silico” desarrollado en el CENSA, mediante un nuevo ensayo de RT-PCR en tiempo real (Fig. 3).

- El desarrollo de nuevas tecnologías de amplificación en tiempo real para la detección de virus emergentes que afectan al cerdo, exóticas, reemergentes y transfronterizas: Múltiple para la detección simultánea de circovirus porcino 2 (PCV2), torque teno sus virus 1 (TTSuV1) y 2 (TTSuV2), parvovirus

porcino (PPV) y el virus de la enfermedad de Aujeszky (EA) (21) y para nuevas cepas emergentes del virus de la peste porcina clásica (22)

- ✓ Diagnóstico del Síndrome Respiratorio Crónico aviar (SRC).

Una de las patologías de mayor impacto económico en la avicultura mundial es el SRC, enfermedad infecto-contagiosa cuya etiología es un complejo multifactorial donde intervienen varios agentes y factores, reconociéndose a *Mycoplasma gallisepticum* como el agente etiológico principal (23). En los últimos años se ha reportado además la participación de cepas altamente virulentas de *Mycoplasma synoviae*. El CENSA desarrolló el diagnóstico basado en PCR. La aplicación de esta metodología contribuyó al estudio de la etiología del SRC en Cuba, ofreciendo un sistema de diagnóstico eficiente (24).

- ✓ Diagnóstico del síndrome respiratorio porcino (SRP)
- Se establecieron sistemas de PCR simple para la detección y caracterización de dos entidades bacterianas: *Streptococcus suis* y *Pasteurella multocida* (Fig. 5). Se reportó por primera vez la presencia de los tipos capsulares cps2 y cps9 de *S. suis*. El estudio de tres marcadores genéticos muramidasa (mrp), factor extracelular (ef) y la hemolisina (syl) asociados a la virulencia de esta entidad, mostró 6 genotipos diferentes, de los cuales el genotipo mrp⁻ef⁻syl⁻cps2⁺ fue el más frecuente, aislado incluso de procesos invasivos. La tipificación molecular realizada a los aislados de *P. multocida*, demostró la presencia de 2 tipos capsulares A y D, el estudio de marcadores de patogenicidad-adherencia fimbria (fim), proteína externa (ompH), sialidasas (nan H y nan B) en estos aislados reveló la presencia de diferentes genotipos. (25)
- Se ratificó la presencia de *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorinis* y *Ureaplasma ssp* asociados a esta patología. (26)

- ✓ Detección de restos mamíferos en muestras de harinas y piensos

Este aspecto fue abordado por la necesidad de implementar un programa de vigilancia para la Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE), comenzando así el uso de estas tecnologías moleculares en trabajos relacionados con la seguridad alimentaria en el laboratorio de Biología Molecular del centro. Se introdujo un método de PCR que permite la rápida identificación de los materiales de origen bovino en los piensos destinados al consumo animal. El ensayo de PCR desarrollado permitió la detección de materiales de origen bovino presentes en los concentrados comerciales (27), y de otras especies animales (28). En la actualidad se analizan todas las muestras de harinas y concentrados de importación en el país.

- ✓ Detección de microorganismos del género *Mycoplasma* como parte del control de la calidad de productos biotecnológicos.

En las últimas décadas se ha establecido la detección del género *Mycoplasma* como parte del sistema de aseguramiento de la calidad de la industria biofarmacéutica en aquellos productos que en su obtención utilizan biológicos

(Ej. anticuerpos monoclonales, líneas celulares, entre otros). El PCR, fue aprobado por la Farmacopea Europea 5.8 (29) como técnica para la detección de rutina de estos microorganismos en productos biofarmacéuticos. El Laboratorio de Diagnóstico de Micoplasmas (MYCOLAB), puso a punto un ensayo de PCR que cumple con los requisitos de estabilidad, sensibilidad y especificidad recomendados (30) (Fig. 2).

En la actualidad el Laboratorio MYCOLAB está categorizado como un laboratorio Acreditado por el Órgano Nacional de Acreditación de la República de Cuba (31) y ha sido designado por la OIE (32) como Laboratorio de Referencia para la Micoplasmosis aviar.



Fig. 2 Detección de micoplasmas en cultivos de células, sueros y productos biotecnológicos mediante técnicas micoplasmológicas y moleculares

- ✓ Obtención de proteínas recombinantes para su utilización como antígenos en técnicas serológicas e inmunoquímicas para el diagnóstico.

La obtención de antígenos recombinantes constituye uno de los pilares de la biotecnología ya que se pueden obtener proteínas biológicamente activas.

Por otra parte, el desarrollo de ensayos rápidos, no instrumentales, para su realización al lado del animal, que brinde resultados en minutos, marca tendencias actuales en el diagnóstico veterinario (33). En Cuba, el CIGB de Sancti-Spíritus cuenta con la tecnología de Tiras reactivas de flujo lateral que permite sistemas simples y rápidos para su uso en el campo y en los laboratorios territoriales,

El sistema actual de diagnóstico de las hemoparasitosis en Cuba requiere de metodologías sensibles, específicas y reproducibles (34), particularmente para *A. marginale* resulta de interés si se tiene en cuenta que el diagnóstico serológico es el de elección.

Para la PPC, principal problema zoonosario nacional, resulta de interés la evaluación de la respuesta a la vacunación, herramienta indispensable del programa de control.

Se obtuvieron proteínas recombinantes de *Anaplasma marginale* y del virus de la PPC, que han demostrado la factibilidad de su uso en ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral (35) (36).

Caracterización molecular y análisis filogenéticos en virus emergentes en la ganadería porcina, bovina y aviar.

En la actualidad, el análisis filogenético es una poderosa herramienta y su aplicación a estudios de epidemiología molecular contribuye a desarrollar estrategias para el control de enfermedades infecciosas (37). Esto es especialmente significativo en las enfermedades virales debido a las elevadas tasas de cambios en el genoma viral, lo que permite extraer conclusiones sobre el origen de un linaje y/o la influencia de presiones inmunológicas y ambientales a través de análisis de presión de selección (38).

Las reconstrucciones filogenéticas se usan fundamentalmente en la diferenciación y clasificación de aislados incluidos en el nivel de especie, principalmente en genotipos, en estudios de epidemiología molecular así como en estudios de evolución de determinados agentes virales bajo condiciones ambientales específicas (37). La diferenciación de los diferentes genotipos virales tiene una gran relevancia en el diagnóstico, especialmente cuando cepas de diferente potencial patogénico co-circulan en una población determinada (37).

Uno de los grandes aportes del análisis filogenético está directamente relacionado con los estudios de epidemiología molecular (37). A través de inferencias de filogenia se puede determinar el origen de cepas virales introducidas en un país (39) así como la evolución de determinados genotipos virales en el campo (40).

En el CENSA desde fines de la década del 90 se han potenciado los estudios basados en análisis filogenéticos que unido a los datos epidemiológicos han fomentado el desarrollo de la epidemiología molecular como una ciencia emergente y esclarecedora de interrogantes ante brotes de agentes virales, ejemplo de ello lo han constituido, estudios realizados con el virus de la peste porcina clásica, el circovirus porcino tipo 2, los torques teno sus virus 1 y 2, el virus de la influenza aviar y de los coronavirus bovino y aviar.

✓ Virus de la peste porcina clásica

-Estudios de epidemiología molecular en el brote del 1993 del virus de la peste porcina clásica (PPC) permitieron esclarecer que la reemergencia de la enfermedad era una reintroducción interna (Fig. 8) (6).

-Análisis posteriores sobre este agente evidenciaron que el mismo había evolucionado hacia poblaciones virales con cambios no sinónimos en la proteína E2 que sugerían un escape a la vacunación (40).

-Resultados recientes demostraron la presión de selección de la vacuna sobre la cepa de campo y la disminución de la diversidad genética del virus en el país generado por un efecto cuello de botella dado por la acción de la vacuna (Fig. 3)(41).

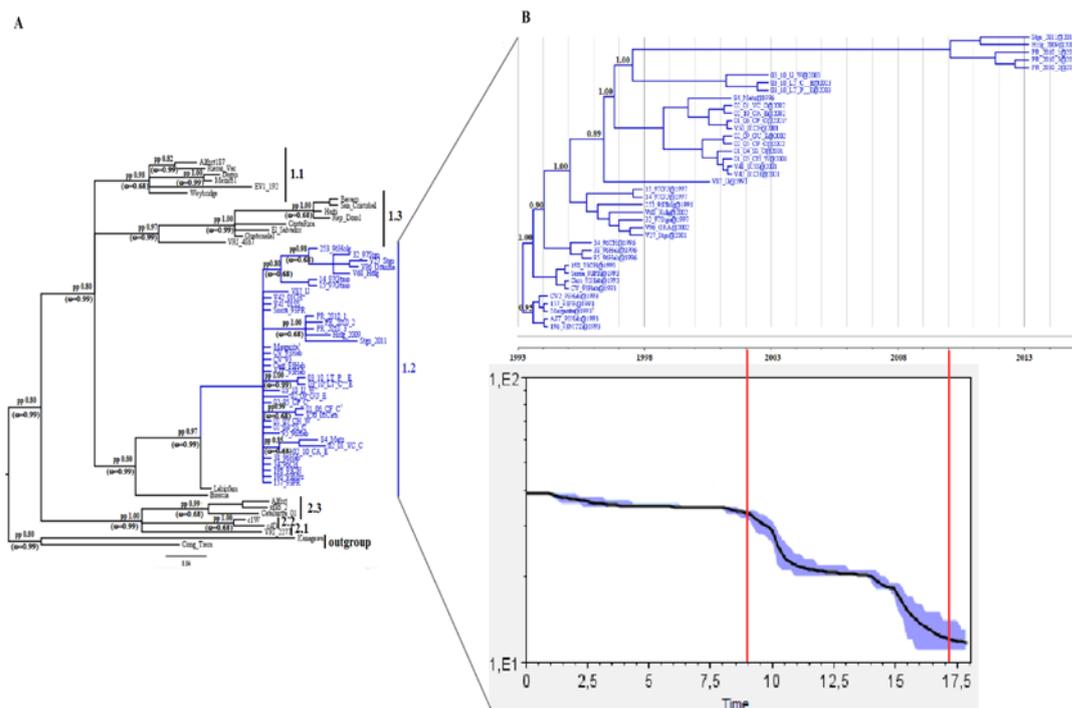


Fig. 3. Análisis filogenético de los virus de campo de la peste porcina cubanos. En el panel A se muestra el árbol filogenético obtenido con el programa MrBayes, y además los valores de presión de selección entre ramas calculados con el PAML 4.3 expresados como $(w=dN/dS)$. Este resultado evidencia que todos los aislados cubanos pertenecen al mismo genotipo (1.2) y que la vacunación no ejerce un cambio de genotipo aún cuando ejerza cambios en la secuencia de los sitios antigénicos de la E2. En el panel B se muestra la divergencia el tiempo de los aislados cubanos a partir de su ancestro común (cepa Margarita) así como la divergencia genética poblacional de las cepas virales de campo, determinada por un análisis de coalescencia (panel B debajo). Los análisis del panel B se realizaron con el programa BEAST v6.1. Estos datos evidencia que las cepas de campo cubanas han divergido en el tiempo de su ancestro y que su diversidad ha disminuido haciendo homogénea la población viral en los últimos 17 años, como causa posiblemente, de un efecto cuello de botella en el que solo sobreviven las mismas cepas virales que escapan a la respuesta del hospedero a la vacunación contra este agente viral. Tomado de Pérez y col., 2012d

✓ **Circovirus porcino tipo 2**

- Estudios de clasificación del genotipo viral circulante en el país (7)
- Determinación de la introducción del virus en la isla (42), lo que demostró por primera vez a nivel internacional que para virus recombinantes las redes filogenéticas de haplotipos son capaces de determinar mejor el origen de un agente que los árboles filogenéticos clásicos.

✓ Coronavirus aviar. Virus de la bronquitis infecciosa aviar

Estudios filogenéticos realizados con la región hipervariable del gen que codifica para la proteína de la espícula de este agente ha permitido determinar circulan en Cuba al menos tres genotipos diferentes del virus y que esto podría ser un problema para el actual programa de vacunación establecido para su control en el país (43)

✓ Coronavirus bovino. Diarrea invernal bovina

Un estudio de epidemiología molecular realizado a partir de secuencias completas del gen S de coronavirus bovino permitió determinar la diversidad genética de las cepas circulantes en las diferentes regiones de Cuba y su posible origen. (44)

✓ Virus de influenza aviar

El virus de influenza aviar subtipo H5 es exótico para Cuba, no obstante brotes de enfermedades respiratorias ocasionadas por este agente viral han sido reportados en países de Centro América y el Caribe, por lo que la vigilancia para este agente viral es de gran importancia en nuestro país. A partir de secuencias depositadas en la base de datos GenBank por investigadores mexicanos, se determinó que el nuevo linaje MéxicoB (Figura 4b) escapaba al ensayo de referencia para la detección del subtipo H5 (45) por la falta de complementariedad de las secuencias de este nuevo linaje emergente, la sonda de hidrólisis del ensayo y los cebadores (Figura 4a), por lo tanto era necesario un nuevo ensayo para la detección específica de este agente. Esta decisión de cambio de protocolo para la detección del virus de H5 por parte del laboratorio de Virología Animal del CENSA estuvo soportado por este análisis de epidemiología molecular. (ver acápite de diagnóstico)

La novedad e impacto científico de los resultados expresados con anterioridad en el campo del diagnóstico, caracterización molecular y análisis filogenético de virus emergentes para la ganadería porcina, bovina y aviar fueron reconocidos por la OIE que designó al CENSA como Centro Colaborador para la epidemiología y diagnóstico de enfermedades transfronterizas, emergentes y reemergentes de los animales (46)

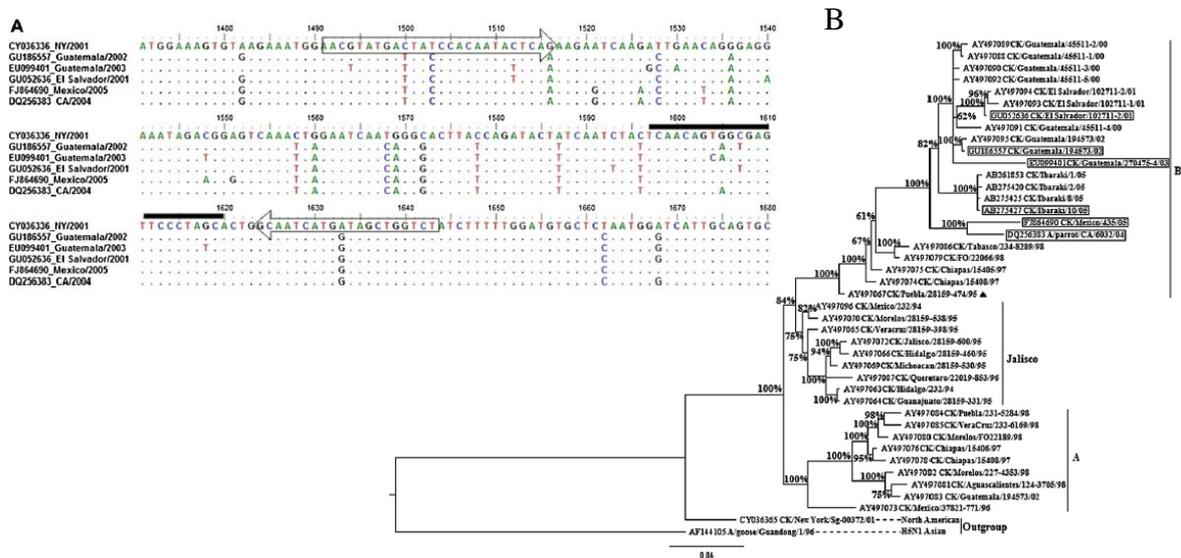


Fig. 4. Análisis de secuencias y filogenético para el virus de influenza aviar H5. Como se observa en la figura los aislados del nuevo linaje emergente B (señalados en recuadros), son los que se escapan al ensayo de referencia propuesto para este virus en el continente americano. Tomado de Pérez y col., 2012a

Análisis moleculares en los estudios raciales de bovinos en Cuba.

Los genes vinculados a las características productivas, como los relacionados con la resistencia a las enfermedades o la adaptación a condiciones ambientales adversas, se pueden identificar y transferir a entornos más productivos, mediante selección asistida por marcadores o modificaciones genéticas. Estas aplicaciones pueden ser especialmente útiles en países en desarrollo (3).

En la actualidad es posible emplear un conjunto de herramientas moleculares que permiten acceder a todos los sitios del genoma de la especie en cuestión mediante la detección de marcadores genéticos que identifiquen a los individuos pertenecientes a la misma población y a su vez, determinen su variabilidad.

La introducción de las herramientas moleculares en este campo comenzaron en el CENSA en el año 2002 con el empleo de los microsatélites para determinar paternidad en bovinos cubanos (47). Los trabajos se extendieron a la amplificación por PCR de los genes que codifican para las proteínas lácteas de una vaca alta productora de leche, recordista mundial en producción de leche y dos de sus descendientes (48). Posteriormente se extendió esta tecnología a la caracterización de tres razas bovinas cubanas: Criollo de Cuba, Cebú cubano y Siboney de Cuba (49).

Con relación al ganado bovino Criollo Cubano, producto del prolongado proceso de selección natural casi empíricamente dirigido, descendientes del ganado *Bos taurus* traído por los españoles a Cuba y del ganado procedente de África, con genes *Bos indicus*, se realizó su caracterización mediante herramientas de tipificación de seis proteínas lácteas, marcadores de polimorfismos de ADN

amplificados aleatoriamente, 30 *loci* de microsatélites, la región *D-loop* del ADNmt y seis microsatélites del cromosoma Y. Se confirmó la presencia de genes de *Bos indicus* en el Criollo Cubano, supuestamente *Bos taurus* puro, con potencial genético para ser utilizado en programas de mejora de la calidad de la leche. Se comprobó que existe una elevada variabilidad genética en el rebaño, con alelos propios de la raza y un patrón intermedio entre ambos extremos uniparentales por la composición haplotípica del ADNmt (50).

A su vez, la variación molecular del cromosoma Y evidencia un proceso reciente de introgresión del ganado Cebú, mediada por los machos, lo que concuerda con su origen histórico (50). Por primera vez se logra la caracterización molecular de un genofondo de interés para la ganadería cubana, con casi todos los marcadores disponibles para estos fines. Esta es una valiosa contribución al conocimiento de la variabilidad genética del ganado Criollo de Cuba, como punto de partida y base para el diseño y desarrollo de programas de mejora productiva y conservación de esta raza autóctona, ya sea *in situ* o *ex situ*.

A partir de estos análisis se brindan tecnologías moleculares para el estudio de razas autóctonas con vistas al incremento de la potencialidad productiva lechera en condiciones tropicales, resistencia a enfermedades y su contribución a la conservación de la biodiversidad. Fig. 5

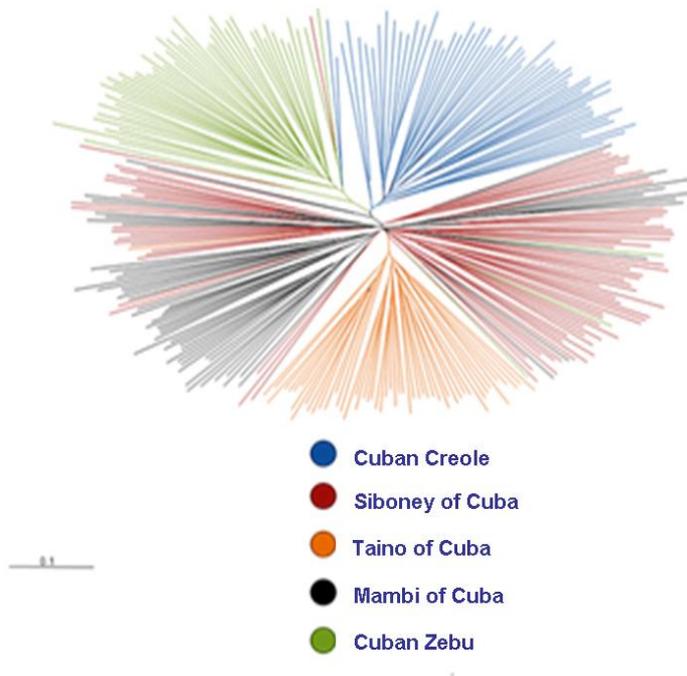


Fig. 5: Árbol “Neighbor-Joining” basado en las distancias genéticas entre todos los animales, estimadas por el logaritmo de las proporciones de alelos compartidos. Cada línea representa un animal individual y los rebaños se diferencian por colores de acuerdo a la leyenda.

Formación de talento humano: Doctorado en Biotecnología Agrícola, Mención Animal.

Una parte importante del desarrollo de la Biotecnología es la formación de recursos humanos a todos los niveles (4).

La formación de capital humano es uno de los objetivos fundacionales del CENSA. Desde la década del 80 hasta los presentes numerosos han sido las acciones realizadas para la inclusión de las herramientas biotecnológicas en sus programas de formación entre ellos, cursos y entrenamientos especializados, tesis de diplomas y doctorales de estudiantes, profesionales e investigadores de la institución y otros centros nacionales y extranjeros. A partir de 1997 se implementó el Programa de Maestría de Microbiología Veterinaria, certificado por el Sistema Nacional de Acreditación del Ministerio de Educación Superior; cuyas tres menciones aplican las herramientas moleculares.

La preparación del talento humano de los países en desarrollo, específicamente los países del ALBA, para impulsar la incorporación y aplicación de estas tecnologías y su impacto en la agricultura, es el objetivo prioritario del Doctorado en Biotecnología Agrícola, Mención Animal que se realiza desde el 2006 entre el CENSA y la Escuela Socialista de Agricultura Tropical (ESAT) de la República Bolivariana de Venezuela. Este Programa Curricular fue aprobado por el Consejo Nacional de Universidades de este país y ejecuta su cuarta edición en la actualidad.

CONSIDERACIONES GENERALES

Los resultados obtenidos por el CENSA en la aplicación de las herramientas biotecnológicas en el diagnóstico, caracterización molecular y análisis filogenético de virus y bacterias patógenas a las especies animales de interés económico así como en los estudios raciales de la ganadería bovina, han tenido un impacto científico y productivo positivo en el desarrollo pecuario nacional.

Bibliografía

- [1] Palmieri V, Alarcón E y Rodríguez D. Situación y desempeño de la agricultura en ALC desde la perspectiva tecnológica. Informe de 2008. 2009, San José, Costa Rica.
- [2] FAO. Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030. 2010. Informe resumido. Departamento económico social. Disponible en (<http://www.fao.org>).
- [3] FAO Desafíos globales, potenciales y prioridades. 2009 Disponible en (<http://www.fao.org>).
- [4] Lage A. Cuba: industria farmacéutica de clase mundial al servicio del pueblo. Cuba: World Class Pharma that Puts People First Inter Press Service, 2009 Roma, Italia
- [5] Triana J. 2010. El estado de la economía cubana. Conferencia impartida en CIGB.
- [6] Díaz de Arce H, Núñez JI, Ganges, LL, Barrera M, Frías MT, Sobrino F. Molecular Epidemiology of classical swine fever in Cuba. Virus Research 1999. 64: 61-67
- [7] Pérez LJ, Díaz de Arce H, Percedo MI, Domínguez P, Frías MT.. First report of porcine circovirus type 2 infections in Cuba. Research in Veterinary Science 2010 88 528-530
- [8] Martínez S, Pedroso M y Corona B. Internet. Tendencias en vacunas veterinarias. Disponible en (<http://www.monografias.com>).
- [9] Naranjo D, Díaz de Arce H, Pérez E, Valiente PA, Carrasco R y Martínez S Modelación por homología de la catepsina b de Fasciola hepática. Comunicación corta. Rev. Salud Anim 2007. Vol. 29 No. 1: 58-64
- [10] OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Sixth Edition 2009.
- [11] Reina M. Las contaminaciones. Técnicas de estudio de líneas celulares. Proc Soc Exp Biol Med. 2003 122:478
- [12] Pascoal A, Prado M, Calo P, Cepeda A, Velásquez JB. Detection of bovine DNA in raw and heat-processed foodstuffs, comercial foods and specific risk materials by a novel specific polymerase chain reaction. Method. Eur Food Res Technol 2005. 220, 444-450
- [13] Corona B , Martínez S. Taq recombinant polymerase, AmpliCEN, generalization of its use. Revista Salud Animal. 2004. 26. No. 2:
- [14] Belak S. Molecular diagnosis of viral diseases, present trends and future aspects. A view from the OIE Collaborating Centre for the Application of Polymerase Chain Reaction. Methods for Diagnosis of Viral Diseases in Veterinary Medicine. Vaccine 2007. 25: 5444–5452.
- [15] Hoffmann B, Beer M, Reid SM, Mertens P, Oura CAL, van Rijn PA, et al. A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organization for Animal Health. Vet. Microbiol 2009. 139, 1–23.

- [16] Díaz de Arce H, Pérez LJ, Frías MT, Rosell R, Tarradas J, Nuñez JI, Ganges, LL, A multiplex RT-PCR assay for the rapid and differential diagnosis of classical swine fever and other pestivirus infections. *Veterinary Microbiology* 2009. 139, 245-252
- [17] Pérez LJ y Díaz de Arce H. A RT-PCR assay for the detection of Ecephalomyocarditis virus infections in pigs. *Brazilian Journal of Microbiology* (2009) 40: 988-993
- [18] Pérez LJ y Díaz de Arce H. Development of a polymerase chain reaction assay for the detection of pseudorabies virus in clinical samples. *Brazilian Journal of Microbiology* (2009) 40: 433-438
- [19] Pérez LJ, Díaz de Arce H, Cilloni F, Salviato A, Marciano S, Perera CL, et al. An SYBR Green-based real-time RT-PCR assay for the detection of H5 hemagglutinin subtype avian influenza virus. *Molecular and Cellular Probes* 2012 1-9
- [20] Lee MS, Chang PC, Shien JH, Cheng MC, Shieh HK. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J Virol Meth* 2001;97:13-22.
- [21] Pérez LJ, Perera CL, Frías MT, Nuñez JI, Ganges LL, Díaz de Arce H. A multiple SYBR Green I-based real-time PCR system for the simultaneous detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus, pseudorabies virus and Torque teno sus virus 1 and 2 in pigs. *Journal of Virological Methods* 2011;179 (2012) 233– 241
- [22] Pérez LJ, Díaz de Arce H, Tarradas J, Rosell R, Perera CL, Muñoz M, Frías MT, et al. Development and validation of a novel SYBR Green real-time RT-PCR assay for the detection of classical swine fever virus evaluated on different real-time PCR platforms. *Journal of Virological Methods* 2011. 174 53–59
- [23] Kleven, S. H. Mycoplasma in the etiology of multifactor respiratory disease. *Poultry Science* 2000.77: 1146-1149
- [24] Lobo E , Martínez,S. Variability in the expression of Mycoplasma pullorum surface antigens Patogenicity markers. *Rev. Salud Anim.* 2004 Vol. 26 No. 2: 142.
- [25] Espinosa I y Martínez S..Pasteurella multocida, Bordetella bronchiseptica y Streptococcus suis en el complejo respiratorio porcino. *Rev. Salud Anim* 2008. Vol. 30 No. 3:
- [26] Burguer Y, Lozada Y, Lobo E (2012) Detección de micoplasmas en cerdos con sintomatología respiratoria en Cuba *Rev Salud Animal* 2012 Vol 34 No. 1
- [27] Martínez S, Corona B, Carpio Y, Lleonard R. PCR for the detection of bovine materials in animal feedstuffs *Rev. Salud Anim* 2004 Vol. 26 No. 2: 216
- [28] Corona B, Lleonard R, Carpio Y, Uffo O , Martínez S. PCR detection control of DNAs of bovine, ovine-caprine and porcine origin in feed as part of bovine spongiform encephalopathy program. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2006.Vol. 5 No.3: 312- 317.
- [29] *Farmacopea Europea* 5.8: Mycoplasmas. 2007 Appendix 2.6.7

- [30] Lobo E, Hernández Y, Vega A , Martínez S. Desarrollo de un sistema de diagnóstico para la detección de micoplasmas en cultivos celulares, sueros y productos biofarmacéuticos. Rev. Salud Anim 2006 Vol. 28 (1)
- [31] ONARC, Certificado de laboratorio acreditado para el diagnóstico de micoplasmas por la NC ISO/IEC 17025:06, 15 de julio 2011.
- [32] OIE 2012 disponible en www.oie.int
- [33] Unión Europea (2007). Comunicación de la comisión al consejo, al parlamento Europeo, al comité económico y social europeo y al comité de las regiones .Sobre el informe intermedio relativo a la estrategia en el ámbito de las ciencias de la vida y la biotecnología SEC 2007 pag 441, Bruselas
- [34] Anónimo. Taller Nacional de Garrapatas y Hemoparasitos 2008. Universidad Agraria de la Habana.
- [35] Corona B. Utilización del gen *msp5* y de la proteína MSP5 recombinante del aislamiento Habana de *Anaplasma marginale* en la detección de la anaplasmosis bovina subclínica, Tribunal de Salud Animal, Cuba 2004
- [36] Frias MT, Suarez M, Perera CL, Pérez LJ, Rodriguez P. HeberFast Line® anti PPC”: immunochromatographic system for the detection of anti-E2 antibodies against Classical Swine Fever virus. En Annual Meeting ASF-CSF 2012, Hannover, Alemania.
- [37] Olvera A, Busquets N, Cortey M, de Deus N, Ganges L, Núñez J.I, et al. Applying phylogenetic analysis to viral livestock diseases: Moving beyond molecular typing. Vet. J. 2010. 184,130-137.
- [38] Klein J. Understanding the molecular epidemiology of foot-and-mouth-disease. Virus. Infect. Gen. Evol. 2009. 9, 153–161.
- [39] Manokaran G, Lin YN, Soh ML, Lim EAS, Lim CW, Tan BH. Detection of porcine circovirus type 2 in pigs imported from Indonesia. Vet. Microbiol. 2008. 132, 165-170.
- [40] Díaz de Arce H, Ganges LL, Barrera M; Naranjo D; Sobrino F, Frías, MT y Núñez JI. Origin and evolution of viruses causing classical swine fever in Cuba. Virus Research 2005 112 123–131
- [41] Pérez LJ, Selection pressure on a region of B/C domain of the E2-gene of classical swine fever virus in endemic swine populations under C-strain vaccination. Genetic, Infections and Evolution 12 1405 – 1412
- [42] Pérez LJ, Díaz de Arce H, Cortey M, Dominguez P, Percedo MI, Perera CL et al. Phylogenetic networks to study the origin and evolution of porcine circovirus type 2 (PCV2) in Cuba. Veterinary Microbiology 2011 151 245–254.
- [43] Acevedo AM, Díaz de Arce, H, Brandao P, Colás M, Olivera S. Pérez LJ. First evidence of the emergence of novel putative infectious bronchitis virus genotypes in Cuba. Research in Veterinary Science 2012 en prensa.

- [44] Martínez N, Brandão P E, Pinheiro de Souza S, Barrera M, Santana N, Díaz de Arce H, Pérez L J. Molecular analysis of bovine coronavirus based on the S glycoprotein gene. *Genetic Infections and Evolution* 2012. 12 1870-1878.
- [45] Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, et al. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 haemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3256e60.
- [46] OIE 2012 disponible en www.oie.int
- [47] Sanz A., Uffo O, Martínez, S. Comunicación corta. Empleo de los microsatélites en pruebas de paternidad en caninos *Rev. Salud Anim* 2002 . Vol. 23: No. 3 211-212.
- [48] Uffo O, Martínez S. Amplificación por PCR de los genes que codifican para la A-lactoalbúmina, la β -lactoglobulina y la κ -caseína de una Vaca alta productora de leche y dos de sus descendientes e Identificación de las variantes alélicas por RFLP *Rev. Salud Anim.* 2002 Vol. 24 No. 1: 22-26.
- [49] Uffo O, Martin-Burriel I, Martínez S, Ronda R, Osta, R, Rodellar C, Zaragoza; P. Caracterización genética de seis proteínas lácteas en tres razas bovinas cubanas. *Animal Genetic Resources Information GRI* 2006 39:15-24.
- [50] Uffo O, Acosta A, Martínez S, Ronda, R. Genetic characterization of Cuban Creole cattle using molecular tools *Biotechnología Aplicada* 2012; Vol.29, No.2

Autores:

Dra. Lydia M. Tablada Romero

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria

Teléfono: 53 047 83 3206

Fax: 53 047 86 1104

Email: lydia@censa.edu.cu

Doctora en Medicina, Doctora en Ciencias Veterinarias, Investigadora Titular, Profesora Auxiliar UNAH, Especialista de primer y segundo grados en Microbiología. Presidenta del Consejo Científico del CENSA y del Tribunal Permanente de Salud Animal. Miembro del Consejo Científico de la UNAH y Miembro de Honor de la Sociedad Veterinaria para desastres de Cuba. Especialidad de trabajo: Microbiología. Asesora. Miembro de Mérito. Academia de Ciencias de Cuba

Dra. María T. Frías Lepoureau

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria

Investigadora Titular

Teléfono: 047 849133

Email: mariat.frias@infomed.sld.cu / frias@censa.edu.cu

Doctora en Medicina, Doctora en Ciencias Veterinarias, Investigadora Titular, Especialista de II Grado en Microbiología, Profesora Adjunta. Especialidad de trabajo: Virología animal.

Académica Titular

Academia de Ciencias de Cuba

Dra.C. Siomara Martínez Marrero

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria

Jefa del Grupo de Biología Molecular

Teléfono: 53 047 86 3014 ext. 28; 53 047 86 3206

Fax: 53 047 86 1104

Email: siomara@censa.edu.cu

Investigadora titular del CENSA. Dr. en Ciencias Veterinarias

Académica de Mérito

Academia de Ciencias de Cuba

DrC. Lester J. Pérez Rodríguez

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria

Jefe Grupo de Virología Animal

Departamento de Microbiología

Presentado: 10 de junio de 2013

Aprobado para publicación: 20 de junio de 2013