

Diagnóstico en bacteriología animal con anticuerpos monoclonales y sondas de DNA.



*Coll Morales, J.
Departamento Virología. Instituto Na-
cional de Investigaciones Agrarias.
Embajadores, 68. 28012-Madrid.
España.*

INTRODUCCION

Los métodos de identificación de una enfermedad se han basado tradicionalmente en síntomas clínicos. Más tarde la anatomopatología permitió ahondar en la sintomatología de una enfermedad. Con el desarrollo de la microbiología, después de Pasteur, se pudo en muchos casos aislar y cultivar el agente etiológico. Su clasificación queda especificada por su capacidad de crecimiento en tal o cual medio de cultivo, capacidad de producir fermentación, gas, cambio de pH, resistencia a fagos, etc. etc. Más modernamente ello ha llevado a la utilización de «galerías» y claves taxonómicas. Con el desarrollo de la inmunología se dio paso a los estudios serológicos

(presencia de anticuerpos específicos) y sus correlaciones con la patología.

En la práctica actual el método más satisfactorio para establecer la presencia de una infección, es la demostración del agente causal. En bacteriología ello significa el aislamiento clonal y la identificación microscópica. La microscopía suele ser más rápida y el cultivo suele ser más preciso y además permite la identificación de las sensibilidades a los antibióticos. El diagnóstico a través de los anticuerpos circulantes (IgM o IgG) aunque se lleva a cabo en numerosos casos, tiene sus propias dificultades de interpretación al ser medida indirecta.

La detección específica del antígeno

no bacteriano también se ha utilizado, pero está mucho menos desarrollada. El principal problema consiste en obtener antisueños policlonales suficientemente específicos para diferenciar las bacterias entre sí.

Los avances de la Inmunología (anticuerpos monoclonales, 1975) y de la Ingeniería genética (DNA recombinante, 1960 - 1970) han hecho posible la introducción de nuevas técnicas para la detección específica de las bacterias.

La obtención y selección de anticuerpos monoclonales está permitiendo el desarrollo de reactivos de alta especificidad y estabilidad. Esta parece ser la dirección de la investigación en



una institución del prestigio y la tradición del Instituto Pasteur (Delagneau, comunicación personal). Una vez desarrollados estos reactivos pueden aplicarse fácilmente a varias nuevas técnicas como métodos de screening (posibilidad de automatización, simplicidad, rapidez, sensibilidad, etc.). Como métodos para confirmación y estudios epidemiológicos, pueden usarse técnicas basadas en separación electroforética de extractos celulares bacterianos, transferencia a papel y reconocimiento con anticuerpos marcados (blotting).

La Ingeniería Genética ha permitido el desarrollo de sondas de DNA como método para detectar genes bacterianos. Estos métodos se basan en la hibridación DNA-bacteria/DNA-sonda y en la posterior detección del DNA utiliza como sonda. Aunque en laboratorios bien equipados estos procedimientos se utilizan normalmente desde hace varios años, no son todavía posibles las simplificaciones técnicas que harían utilizable esta tecnología a nivel de laboratorios clínicos en Medicina o Veterinaria. Una vez que se disponga de la tecnología para utilizar las sondas, su aplicación facilitaría la identificación bacteriana y la detección de resistencias a antibióticos en tiempos mucho más cortos que con los métodos actuales.

Existen por lo tanto, dos apartados tecnológicos en cuanto a la obtención de reactivos específicos en los que se está avanzando actualmente (1): anticuerpos monoclonales y sondas DNA.

ANTICUERPOS MONOCLONALES

En 1975, Kohler and Milstein pusieron a punto una nueva técnica que permite que los linfocitos B productores de anticuerpos puedan ser inmortalizados. Esta inmortalización se consigue mediante la fusión *in vitro* de los linfocitos B con células tumorales de mielomas. El posterior clonaje de los híbridos resultantes de dicha fusión, hace que se puedan aislar clones productores de una única especie molecular de anticuerpo. Utilizando animales inmunizados frente a un antígeno conocido como donantes de linfocitos B y seleccionando después de la fusión los clones celulares de híbridos

productores de anticuerpos frente a ese antígeno, es posible aislar clones celulares de híbridos productores de un solo anticuerpo con una especificidad prefijada: anticuerpos monoclonales (24).

La producción de anticuerpos monoclonales con una especificidad prefijada, es por lo tanto posible mediante la separación de clones celulares de híbridos. Estos productos se utilizan ya en diagnóstico en hospitales y en veterinaria sustituyendo a los anticuerpos policlonales que se venían usando para estos diagnósticos. Este hecho es debido principalmente a que (19):

- Los anticuerpos monoclonales son más reproducibles y ofrecen mayor garantía de suministro. El método convencional de obtención de anticuerpos depende más de la variabilidad animal y de su peculiar productividad.

- Los anticuerpos monoclonales son más específicos y de mayor pureza que los anticuerpos policlonales que se producen según los métodos convencionales. Este punto es de singular importancia a la hora de utilizar anticuerpos como métodos de diagnóstico de enfermedades.

- No es necesario el obtener antígeno cada vez que se quiere preparar un anticuerpo, al contrario que en los métodos convencionales. Este punto por sí solo abarata la producción de muchos anticuerpos ya que los antígenos necesarios para producirlos según el método convencional se encarecen al ser necesario emplearlos muy purificados.

- No es absolutamente necesario purificar el antígeno, aunque si es conveniente. Este hecho hace que sea posible el diagnóstico basado en la detección de sustancias moleculares cuya purificación es actualmente imposible, abriendo así un enorme abanico de posibilidades.

Ya se han obtenido los primeros usos de anticuerpos monoclonales para serotipaje de cepas de *Mycobacterias*, *estreptococcus A* y *estreptococcus agalactiae* (23) y varios grupos están produciendo anticuerpos monoclonales antibacterias para su uso como reactivos en diagnóstico. Como ya ha

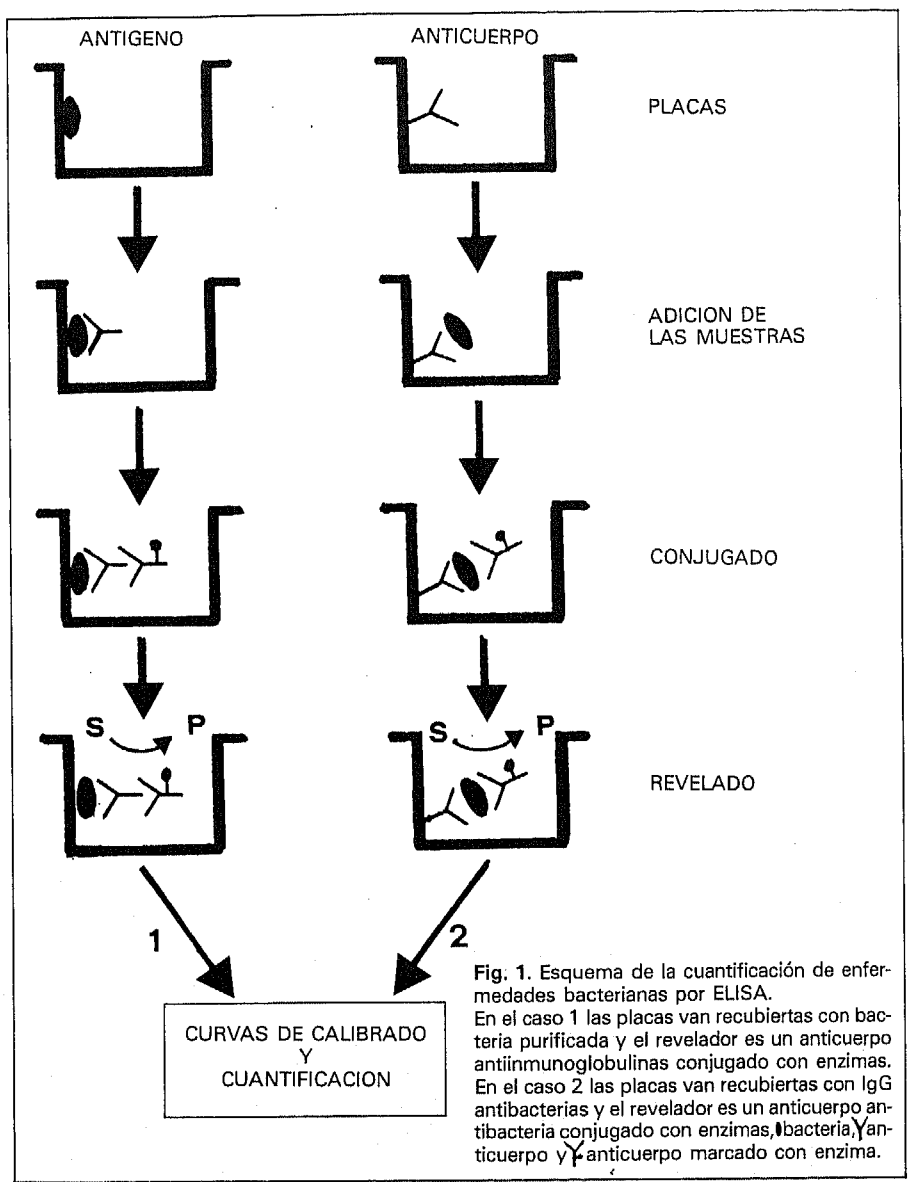
ocurrido con algunos géneros bacterianos y en virus, el empleo de anticuerpos monoclonales llevará al descubrimiento de nuevos serotipos y a una mayor profundización en los estudios epidemiológicos y de vacunas (9, 20, 21). Los anticuerpos monoclonales servirán también para examinar estructuras antigénicas en detalle y encontrar semejanzas o diferencias no detectables por serología convencional. Este parece ser el caso, descrito recientemente del antígeno de 65 KDa encontrado en microbacterias gracias a los anticuerpos monoclonales y cuya distribución se extiende a *Nocardia*, *Propionibacterium*, *Neisseria*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Actinomycetes* y *Escherichia* (26). La profundización en el estudio de este interesante antígeno bacteriano puede abrir un nuevo campo en diagnóstico/terapéutica.

El creciente uso de anticuerpos monoclonales hace que puedan utilizarse con mayor fiabilidad algunas técnicas de inmunodiagnóstico, así como que se vayan desarrollando otras nuevas.

Muchos de los métodos de detección usados tradicionalmente (fijación de complemento, RIA, hemaglutinación, aglutinación directa, inmunodifusión, etc.) si bien no están abandonados, si están siendo sustituidos por nuevos métodos que tienen más ventajas, tanto desde el punto de vista tecnológico (sensibilidad, especificidad, reproducibilidad), como desde el punto de vista de sencillez (disminución del número de pasos, utilización de reactivos estables, rapidez, medidas objetivas, cuantificación con aparatos sencillos, etc.). También se observa una tendencia en Medicina, tanto humana como animal, a poder realizar las pruebas *in situ*, bien sea en la oficina del doctor, o bien sea en el campo.

Entre los métodos de detección que actualmente están aplicándose, figuran los siguientes:

- ELISA, en la fase sólida (22) bien sea en pocillo para probar un número de muestras elevado (Fig. 1), bien sea en tiras para determinación cualitativa en campo. Por ejemplo, recientemente se han puesto en práctica unas tiras capaces de detectar *streptococcus A* (Fig. 2) en muestras de faringe hu-



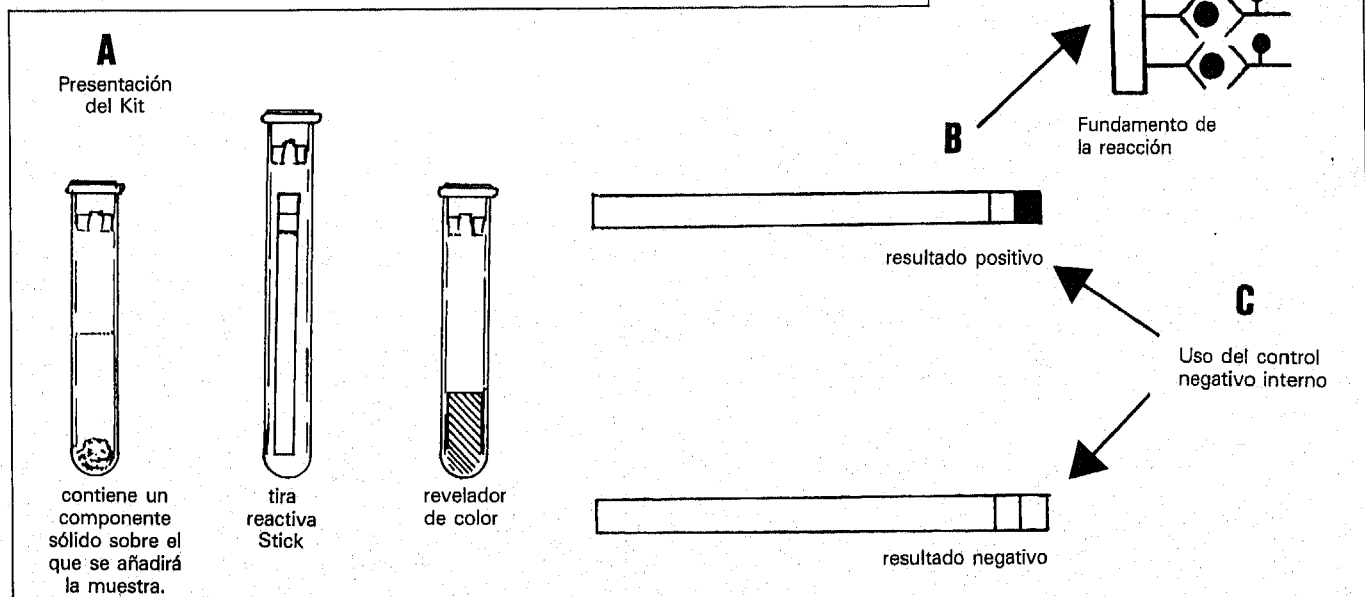
mana en unos 15 minutos y sin necesidad de aparatos costosos.

- Inmunofluorescencia, que utiliza moléculas de anticuerpos marcadas con fluorescencia (verde) o rodamina (rojo) y microscopia. (Basados en anticuerpos monoclonales y FACS).

- Inmunoblotting, que utiliza la separación de las moléculas antigénicas por electroforesis, transferencia a papel de nitrocelulosa e identificación con anticuerpos marcados.

Fig. 2. Ejemplo del tipo de Kit inmunológico, Sticks o tiras.

El líquido a analizar se vierte sobre el tubo que contiene el anticuerpo conjugado (A), después se introduce en el tubo la tira reactiva que lleva pegado anticuerpo específico contra la bacteria a analizar (B). La reacción se deja que transcurra unos minutos y el conjugado directamente proporcional a la cantidad de sustancia a analizar, se mide por la actividad enzimática en el revelador de color (A). Una de las tiras lleva un anticuerpo no específico, lo que sirve de control negativo interno (C). Ensayos de este tipo se han manufacturado ya para *Streptococcus A*. La utilización de anticuerpos con actividad frente a varias bacterias, permitirá un diagnóstico diferencial rápido y en un solo paso.



- Técnicas de aglutinación, utilizando esferas de látex artificiales con diámetros homogéneos (12).

Entre los principales métodos de detección actualmente en desarrollo (25) y en algunos casos con aplicaciones actuales restringidas, están:

- «Particle counting immunoassay» (PACIA), ensayo de aglutinación en un paso. Cuenta las partículas que quedan sin aglutinar (14, 15).

- Nuevos marcadores, que aumentan la sensibilidad de los métodos: fluoroinmunoensayo (basado en la medida cuantitativa de fluorescencia), luminiscencia (basada en la cuantificación de reacción de oxidación del luminol), sistemas avidina-biotina, etc.

- Técnicas ELISA homogéneas, que se basan en simplificar el ELISA a un solo paso utilizando el sustrato unido a un transportador de alto Pm.

Este resulta estéricamente impedido por la unión del anticuerpo al complejo (antígeno-enzima). Enzyme channeling (sistemas con peroxidasa, glucosa oxidasa y catalasa que sólo funcionan localmente cuando la peroxidasa-anticuerpo se hallan cerca de la glucosa oxidasa-antígeno). Unión de 2 partes de la misma enzima al acercarse el Ag y el Ac, etc. (Delagneau, comunicación personal).

- Nefelometría, mide la turbidez originada por la reacción antígeno-anticuerpo. Tiene el inconveniente de que ambos deben estar bien filtrados para evitar falsos positivos (23).

- Técnicas de ELISA utilizando esferas magnéticas para facilitar la separación de fases (Magnelia, Instituto Pasteur).

SONDAS DE DNA

Puesto que toda enfermedad infecciosa parece estar relacionada con el DNA (bien sea del hospedador, bien sea del agente infeccioso), resulta lógico el desarrollo de métodos de diagnóstico que sean capaces de detectar el (los) gen (es) causantes de una enfermedad. Con el desarrollo moderno de la Ingeniería Genética (1) es posible identificar, aislar y producir en can-

tividad, todo tipo de genes, también los que causan las enfermedades bacterianas, es decir los genes bacterianos. Debido a la complementariedad de las dos cadenas que integran un DNA, una de ellas (sonda) puede utilizarse para buscar su complementaria entre una mezcla compleja de cadenas de DNA. Este proceso se denomina hibridización y es altamente específico y controlable. La detección de la sonda una vez hibridizada al gen bacteriano, permite identificar la bacteria portadora. El uso de sondas de DNA permite, por lo tanto, pensar en alternativas altamente específicas para la identificación y clasificación bacterianas, así como para la detección temprana de resistencia a antibióticos.

Aparte de los Centros de investigación en los que se usan estas técnicas a nivel de laboratorio, varias casas comerciales están interesadas en las simplificaciones técnicas que harían posible el desarrollo de estas pruebas a escala de Kit de diagnóstico. Entre ellas pueden mencionarse a: Enzo-Biochem, está muy avanzada en métodos de marcaje no radioactivo de Sondas DNA (enzimas, avidina) para varios virus y para clamidias; Integrated Genetics (Framingham, Mass.) ha desarrollado una sonda para *Salmonella*; Cetus (Emeryville, Calif.) está desarrollando sondas para bacterias del intestino; Amgen (Thousand Oaks, Calif.) e Hybritech (San Diego), están investigando sondas para diferentes bacterias implicadas en enfermedades infecciosas humanas; Institute Pasteur Production, tiene un programa de desarrollo de Kits de sondas de DNA; etc.

Para detectar la resistencia bacteriana a los antibióticos, las sondas detectan los genes bacterianos (muchas veces presentes en plásmidos) que codifican para esa resistencia. Aunque existen muchos estudios a nivel de laboratorio, todavía no se están utilizando en clínica. Para la identificación de bacterias el caso más estudiado es la detección de *Salmonella*. Mientras que el procedimiento microbiológico lleva de 5-7 días, la presencia de *Salmonella* puede detectarse en menos de 2 días por medio de una sonda de DNA ya desarrollada (2). La sonda es un segmento único que comprende un 1% del total del DNA de *Salmonella*. Esta sonda hibridiza con 352 cepas de *Salmonella* pero no con otros tipos de

bacterias. La aplicación de esta sonda está esperando pruebas de campo que permitan establecer su potencial.

Desde el punto de vista de la tecnología se necesitan: identificación del segmento de DNA, secuenciación-síntesis de la sonda, marcaje, tecnología de Kits «listos para usar» y pruebas de campo. Una vez identificado el segmento de DNA utilizable como sonda, se produce en grandes cantidades mediante su introducción en una bacteria, o bien, mediante síntesis de polinucleótidos. Después viene el problema de marcarlo para su detección y más tarde conseguir un protocolo sencillo para que estas sondas puedan manejarse por personal poco entrenado y en laboratorios sencillos. En los laboratorios de investigación todas las sondas de DNA están marcadas con isótopos radioactivos. Para su detección se utiliza la exposición a películas fotográficas o contadores radioactivos. Más recientemente, sin embargo, se está abandonando este método debido a la corta vida media de las sondas, la necesidad de instrumental complejo-costoso y el problema de los desechos radioactivos. Las nuevas estrategias incluyen el empleo de marcadores enzimáticos o fluorescentes.

Seguidamente pasaremos revista a algunos de los avances específicos de la Ingeniería Genética en el aislamiento y clonaje de genes bacterianos (Tabla 1). Los desarrollos en este área van generalmente unidos a los esfuerzos de obtención de vacunas bacterianas con las nuevas tecnologías de DNA recombinante.

En algunas enfermedades, la adhesión de las bacterias a tejidos específicos es esencial para la iniciación de la infección; en otras es la presencia en el hospedador de concentraciones anormalmente altas de una misma bacteria lo que produce la enfermedad. La existencia de proteínas específicas, necesarias para la adhesión de las bacterias a ciertos tejidos, permite que los genes de estas proteínas puedan utilizarse para la detección de cepas patógenas.

La colibacilosis es causa importante de muertes en los terneros jóvenes y en los cerditos recién nacidos. Esta enfermedad está producida por *E. coli*

Tabla 1
Avances en la obtención de sondas bacterianas por técnicas de Ingeniería Genética.

Bacteria	Métodos de Ingeniería Genética
<i>E. coli</i> enteropatógeno	— Clonaje de genes para las proteínas de adhesión o anclaje.
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	— Clonaje de la proteína de anclaje en <i>E. coli</i> o <i>B. subtilis</i> .
<i>Chlamydia trachomatis</i>	— Clonaje de una proteína antigénica en <i>E. coli</i>
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	— Obtención de genes de proteínas pilares.
<i>Treponema pallidum</i>	— Clonaje de 3 proteínas de anclaje.
<i>Vibrio cholerae</i>	— Obtención de péptidos de sus toxinas.
<i>Salmonella typhimurium</i>	— Sonda de DNA (1% genoma) en estudios de campo.
<i>Shigella sonnei</i>	— Antígeno de virulencia codificado en un plásmido se ha trasferido a <i>S. Typhi</i> .
<i>Streptococcus</i>	— Clonaje de los genes correspondientes a antígenos comunes de <i>streptococcus</i> en <i>E. coli</i> (proteína M de los «pili»).
<i>Bordetella pertusis</i>	— Identificación de genes antigénicos usando mutantes por trasposones. Expresión de toxinas en <i>E. coli</i> .
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	— Genes sintéticos codificantes de los péptidos neutralizantes por análisis de la respuesta humoral y anticuerpos monoclonales.

enteropatógena que tiene la capacidad de adherirse selectivamente al intestino delgado de estos animales y de producir enterotoxinas. La adhesión de estas cepas al intestino delgado es debida a la presencia en su superficie de «pili». En el *E. coli* enteropatógeno, los apéndices proteicos de adhesión tienen una estructura antigénica diferente en las cepas que afectan a los cerdos (antígenos K 88), o a los terneros (antígenos K 99).

Estos genes de adhesión son altamente interesantes para su utilización como marcadores en identificación de cepas patógenas. Un grupo de investigadores pertenecientes a varios centros de investigación, insertaron los genes que codifican los polipéptidos de adhesión en vectores genéticos adecuados, que cuando se introdujeron por transfección en *E. coli* K-12 y bajo condiciones de cultivo especiales, produjeron una cantidad grande de estos genes. La purificación posterior de estos genes para su posible utilización en diagnóstico está en estudio (17).

En el *Mycoplasma Pneumoniae*, una bacteria causante de neumonías, la adhesión de los micoplasmas al epitelio respiratorio es necesaria para la iniciación de la infección. Una proteína presente en la superficie celular de este microorganismo es importante en este fenómeno de adhesión. La proteína de adhesión está localizada en el apéndice de anclaje de este microorganismo

a las células epiteliales respiratorias y la identificación del gen codificante servirá para la identificación de cepas de micoplasma.

La estrategia experimental de obtener bancos de genes que codifican proteínas inmunogénicas, en *E. coli* K-12, con el fin de utilizarlas para fines diagnósticos, también se está empleando en *Chlamydia trachomatis*. Este microorganismo es un parásito intracelular obligado de células eucarióticas.

La utilización de fragmentos de DNA sintéticos en la fabricación de sondas bacterianas puede tener también un futuro brillante. Este es el caso, por ejemplo, de dos antígenos sintéticos que ya han demostrado su efectividad en la inducción de anticuerpos protectivos contra la toxina diftérica y contra ciertos serotipos de *S. typhimurium*.

Además se han encontrado determinantes antigénicos comunes a varias toxinas, lo que podría simplificar en la práctica un primer diagnóstico general y sobre todo las vacunaciones. Así por ejemplo, la secuencia de aminoácidos 50-64 de la toxina del cólera es idéntica a la toxina labil al calor de *E. coli*. Los anticuerpos anti 50-64 bloquean por igual la toxina del cólera y la toxina labil al calor de *E. coli*.

Los factores limitantes en el desa-

rrollo de sondas de DNA contra ciertas bacterias pueden ser, la falta de conocimiento de los mecanismos intrínsecos de infección, el requerimiento o no de adhesión de las bacterias a células hospedadoras, la multiplicidad de serotipos de una misma especie bacteriana involucrados en el proceso infeccioso, los mecanismos intrínsecos de aparición o cambio de estos serotipos, la estructura de las toxinas patógenas, la localización de los genes que codifican estas toxinas en el genoma bacteriano, etc. Esto significa que cada especie bacteriana se debe considerar como un caso particular, en el cual la metodología a emplear dependerá de la información disponible hasta ese momento.

Muy recientemente se ha comunicado el uso de «DNA huella-dactilar» para identificar individuos animales. Se han usado sondas de fragmentos de DNA satélite para hibridizar el DNA de animales y pájaros cortando con enzimas de restricción y separando en geles de agarosa (10, 18). Es posible que algún procedimiento de este tipo pueda a su vez emplearse en bacterias.

APLICACION A LA BACTERIOLOGIA ANIMAL EN ESPAÑA

Para el estudio de la posible aplicación de las nuevas tecnologías a la bacteriología animal en España, hay que tener en cuenta: la importancia económica relativa de las especies animales, la existencia de enfermedades en España, la urgencia del diagnóstico para una actuación posterior de prevención o terapéutica y las nuevas tecnologías.

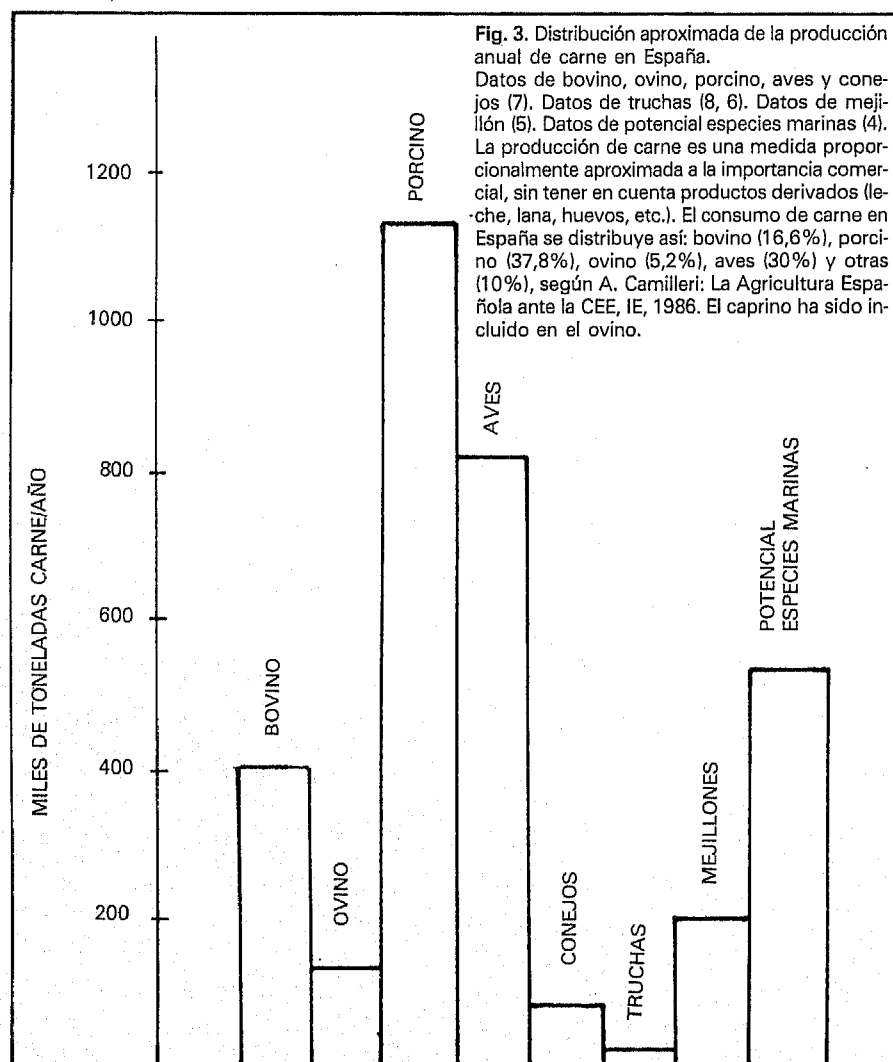
La Fig. 3 expone una distribución aproximada de la producción anual de carne en España (datos recopilados de 4, 5, 6, 7 y 8). Teniendo en cuenta nuestro ingreso en el Mercado Común Europeo es de suponer que a partir de ahora se pondrá un mayor énfasis en ovino y animales marinos por ser ambos específicos de España. Según este punto de vista las enfermedades del ganado ovino vendrían a ser las más importantes. Se conoce poco de las enfermedades bacterianas en Acuicultura marina (13 y Tabla 2).

La «Office International des Epizoo-

Tabla 2
Síntomas y causas de las principales enfermedades bacterianas conocidas
Acuicultura Marina.

Especie	Síntomas	Bacteria
Anguila	• enrojecimiento de aletas y piel • podredumbre de branquias	<i>aeromonas</i> <i>chondrococcus</i>
Peces planos	• enrojecimiento en branquias • degeneración de aletas y bultos	<i>vibrio</i> <i>pseudomonas</i>
Lubinas	• branquias amarillas • branquias blanquecinas • necrosis de las aletas • partes blanquecinas en vísceras • hemorragias en piel	<i>aeromonas</i> <i>trachonoma</i> <i>vibrios</i> <i>pasteurella</i> <i>aeromonas</i>
Salmones	• enrojecimiento muscular • hemorragias en piel y branquias • edemas, riñón inflado • lesiones zona ventral	<i>vibrio</i> <i>aeromonas</i> <i>corynebacterium</i> <i>sporocytophaga</i>
Langostino	• natación desorientada en larvas • manchas marrones • filamentos en branquias	<i>vibrio</i> <i>bacterias</i> <i>quitinolíticas</i> <i>leucotrix</i>
Ostras	• necrosis locales • mortalidades larvarias	sin identificar sin identificar

Datos recopilados de «Acuicultura Marina Animal» (13).



ties» (OIE) divide las enfermedades de animales en tres categorías: A, B y C, según la posible extensión geográfica de una epidemia (3). De la lista proporcionada por España a la OIE, las enfermedades bacterianas más frecuentes se exponen en la Tabla 3. Es de resaltar, que la única enfermedad bacteriana en la categoría A, la Perineumonía contagiosa, no está declarada por España a la OIE.

Tomando en cuenta la distribución aproximada de la producción de carne en España (Fig. 2), la posible repercusión de la entrada de España en el Mercado Común y las enfermedades existentes en España (Tabla 3), las enfermedades que quedan con un mayor relieve son: la Agalaxia (ovino), la Brucelosis (bovinos y ovinos) la Tuberculosis y Paratuberculosis (bovinos, ovinos y aves), la Salmonelosis (todas las especies e importancia en zoonosis que afectan al hombre) y la Mamiitis (bovinos y ovinos).

El tipo de problema con que nos enfrentamos a diario es distinto del problema más extendido en el tiempo que supone una vigilancia. La aparición de cualquier brote de enfermedad animal requiere medios técnicos capaces de dar un diagnóstico rápido y un tratamiento más o menos específico para cortar todo posible progreso de la enfermedad. En estos problemas diarios la tecnología que hay que desarrollar para cada enfermedad se refiere a técnicas de diagnóstico rápidas y sencillas aunque no sean extraordinariamente específicas y sensibles. La medicina preventiva (vacunas) o vigilancia del animal sano, aunque muy deseable, no tiene la urgencia de los problemas cotidianos. La tecnología que hay que desarrollar para cada enfermedad se refiere a técnicas de diagnóstico específicas y sensibles, tanto más cuanto menor sea la prevalencia de la enfermedad (Fig. 4).

Por desgracia pocos métodos modernos se han desarrollado en el tema del tratamiento a pesar de la amenaza que suponen las crecientes resistencias a antibióticos y su transferencia inespecífica. La aplicación de sondas de DNA a la detección de dichas resistencias (2), la identificación del carácter antimicrobiano de nuevas familias de péptidos recientemente descubiertas en los anfibios (11) o el uso de

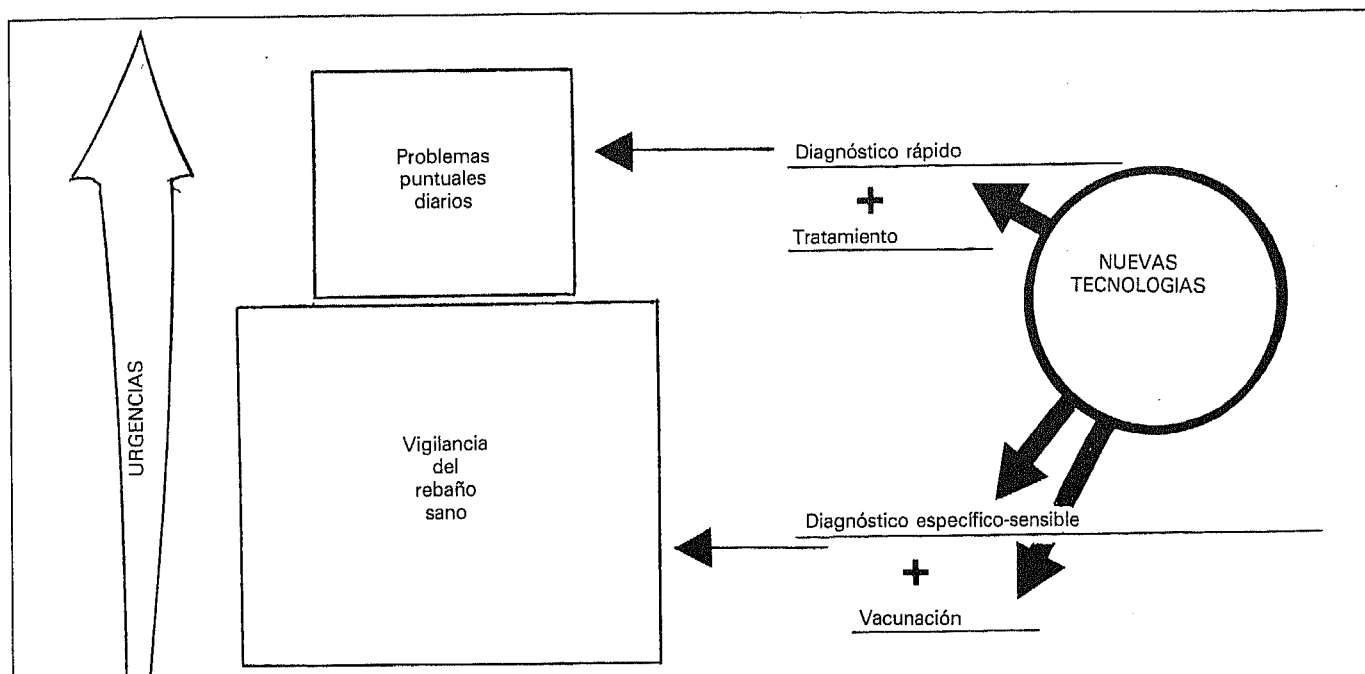


Fig. 4. Incidencia de los nuevos medios tecnológicos en el control de enfermedades según su urgencia.

En el control de una enfermedad existen dos problemas principales, el diario y el de vigilancia, que exigen dos estrategias complementarias: el diagnóstico rápido específico-sensible y vacunación. Aparte existen otras estrategias de gestión-organización de gran importancia pero en las que sólo indirectamente inciden las nuevas tecnologías. Por desgracia, pocos métodos modernos se han desarrollado en el tema de tratamiento a pesar de la amenaza que suponen las crecientes resistencias a antibióticos y su transferencia interespecífica.

Tabla 3
Enfermedades bacterianas y agentes etiológicos declarados por España a la IOE.

Bovino	Ovino	Porcino	Aves
B			
anaplasmosis (anaplasmas)	agalaxia (micoplasma)	—	micoplasmosis (micoplasma)
brucelosis (brucella)	brucelosis (brucella)	—	—
tuberculosis (micobacterium)	paratuberculosis (micobacterium)	—	tuberculosis (micobacterium)
carbunco, C* (bacillus)	carbunco (bacillus)	—	—
—	aborto enzoot. (clamidias)	—	—
salmonelosis, C* (salmonella)	salmonelosis (salmonella)	salmonelosis, C* (salmonella)	salmonelosis, C* (salmonella)
leptosporosis (leptospira)	—	—	—
septicemia hemorr. (pasteurella)	—	—	—
C			
—	pedero (bacterioide)	—	—
—	enterotoxemia (clostridium)	—	—
—	—	mal rojo (erysipelothesis)	—
listerelosis (listeria)	—	—	—
botulismo (clostridium)	—	—	—
—	—	disenteria vibronica (treponema)	—
—	—	—	coriza (haemophilus)

* Algunas enfermedades de clase C se recogen en la clase B debido a parentescos en los agentes etiológicos. Las mamitis del ganado bovino y ovino al ser causadas por complejos etiológicos (streptococcus y estafilococcus) no están en la Lista de la OIE, pero deben de figurar entre la lista de enfermedades bacterianas debido a su importancia económica en España.

la síntesis de lipopolisacáridos utilizando dipéptidos transportadores (16) son algunos de los recientes desarrollos con posibles futuras aplicaciones terapéuticas.

En diagnóstico rápido, sencillo, de bajo costo y ejecutable en el campo se está avanzando en pruebas de tiras que al mismo tiempo unen una gran especificidad y sensibilidad debido al uso de anticuerpos monoclonales. El antecedente humano está en los test de embarazo y ovulación que se pueden hacer en casa (home-test) y más recientemente el de *Streptococcus* grupo A y Alergias. El sistema se describe someramente en la Fig. 2. Este sistema se podría aplicar a enfermedades cuyo desenlace pueda ser rápido.

En diagnóstico altamente específico y sensible están, por un lado, los ELISAS a base de anticuerpos monoclonales y por otro lado, las sondas de DNA. En ambos casos su aplicación parece más indicada a estudios epidemiológicos a medio-largo plazo. Dados los avances conseguidos en el caso de las *Salmonellas* (sondas de DNA para detección) y las *Mycobacterias* (anticuerpos monoclonales para serotipaje), sería lógico con temas de investigación en estas tecnologías y en es-

tas especies. La puesta a punto de la tecnología de Sondas de DNA en el caso de *Salmonellas*, permitiría abordar el problema de sus resistencias a antibióticos, siendo este un tema im-

portante por su relación con la sanidad humana.

Más adelante y una vez desarrolladas estas tecnologías de diagnóstico,

podría pensarse en su aplicación a la Brucelosis, a la Perineumonía y a las enfermedades que se identifiquen como prioritarias al desarrollarse la Acuicultura marina.

Summary: The recent developments in immunology and in genetic engineering will allow new reagents to be applied to the bacterial diagnostic field.

The monoclonal antibodies and the DNA probes are the new reagents that already allow and furthermore will allow more sensible, more specific, faster and automatic diagnostics. In this review some of the new applications are discussed.

Key words: Diagnostic. Bacteriology. ELISA. Probes. Monoclonal antibodies.

BIBLIOGRAFIA

- Alonso, C.B.; Coll, J.M.; Herranz, E.L. La Ingeniería Genética en la Biotecnología. Cuaderno CDTI n° 4. Segunda edición. 79 págs. Madrid, 1981.
- Anónimo. Using DNA probes as diagnostic tools. *Chemical Week*. 22: 18-20, 1984.
- Anuario de Sanidad Animal. FAO. Animal production and health series. 121-130, 1985.
- Arnal, J.I. Posibilidades de la Acuicultura en el litoral español. Beca Rumasa de Investigación 1980. Págs. 242 y 243.
- Bardach, J.E.; Ryther, J.H.; Mc Larney, W.O. Aqualculture. The farming and husbandry of freshwater and marine organisms. Pg. 772. Ed. Wiley Inters.
- Blanco Cachafeiro, M.C. La trucha. Cría industrial. Pg. 230. Ed. Mundi Prensa.
- Boletín Mensual de Estadística. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaría General Técnica. 3 de Marzo, 1987.
- Brown, E.E. World fish farming: Cultivation and economics. Pg. 206. Ed. Avi. 1977.
- Brown, F.; Chanock, R.M.; Lerner, R.A. Vaccines 86: New approaches to immunization. Ed. Cold Spring Harbour Laboratory, 1986.
- Burke, T.; Bruford, M.W. DNA fingerprinting in birds. *Nature* 327: 149-152, 1987.
- Cannon, M. Antimicrobial peptides. A family of wound healers. *Nature* 328: 478-479, 1987.
- Coll, J.M. Microtiter latex C-reactive protein test for screening large number of samples. *Clin. Chem.* 33: 1258, 1987.
- Coll, J.M. Acuicultura Marina Animal. 2ª ed. Pg 670. Ed. Mundi Prensa.
- Collet-Cassart, D.; Magnusson, C.G.M.; Ratcliffe, J.G.; Cambiaso, C.L.; Masson, P.L. Automated particlecounting immunoassay for alpha-fetoprotein. *Clin. Chem.* 27: 64-67, 1981.
- Collet-Cassart, D.; Mareschal, J.C.; Sindic, C.J.M.; Tomasi, J.P.; Masson, P.L. Automated particlecounting immunoassay of C-reactive protein and its application to serum, cord serum and cerebro spinal fluid samples. *Clin. Chem.* 29: 1127-1131, 1983.
- Hammond, S.M.; Claesson, A.; Jansson, A.M.; Larsson, L.G.; Pring, B.G.; Town, C.M.; Ekstrom, B. A new class of synthetic antibacterials acting on lipopolysaccharide biosynthesis. *Natures* 327: 730-732, 1987.
- Hernández, P.E. Producción de vacunas bacterianas en la Ingeniería Genética y sus aplicaciones ed. J.R. Pellón 93-104, Ed. Acribia, S.A., 1986.
- Hill, W.G. Genetic probes DNA fingerprints applied to animal and bird populations. *Nature* 327: 98-99, 1987.
- Hurtado, S.M.; Coll, J. Otras tecnologías relacionadas: Tecnología de hibridomas. Aplicaciones de la Ingeniería Genética, 161-172. J.R. Pellón. Ed. Acribia, 1986.
- Laver, W.G.; Air, G.M. Immune Recognition of protein antigens. Current communications in Molecular Biology. Cold Spring Harbour, 1985.
- Lerner, R.A.; Chanock, R.M.; Brown, F.: Vaccines 85: Molecular and chemical basis of resistance to parasitic, bacterial and viral diseases. Ed. Cold Spring Harbour Laboratory, 1985.
- Martínez, J.; Coll, J.M. Clinical preliminary studies on C-reactive protein quantification by ELISA. *Clin. Chem.* (en prensa), 1987.
- Mitchison, D.A.; Coates, A.R.M. Monoclonal antibodies in bacteriology in Monoclonal antibodies in Clinical Medicine. *Acad. Press*. 301-310, 1982.
- Palomo, C.; Martín, S.H.; Coll, J.M. Obtención de anticuerpos monoclonales y posible uso en diagnóstico clínico. *Inmunológica* (revisiones). 3: 322-347, 1982.
- Voller, A.; Bartlett, A.; Bidwell, D. Immunoassays for the 80s. MTP Press Limited, 1981.
- Young, D.B.; Ivanyi, J.; Cox, J.M.; Lamb, J.R. The 65 KDa antigen of mycobacteria a common bacterial protein? *Immunol. Today*. 8: 215-219, 1987.