

Alerta precoz por Sándor Belák

La gripe aviar se ha extendido a 51 países — 36 en este año tan sólo — muchos de ellos pobres y con gran densidad de población.

¿Pueden las tecnologías nucleares contribuir a descubrir estas enfermedades contagiosas?

Las epizootias muy contagiosas son una amenaza transfronteriza cada vez más inquietante.

Estas enfermedades son la fiebre aftosa, la peste porcina, la peste bovina... y la gripe aviar, sumamente patógena, a la que la prensa ha dedicado últimamente tantos titulares. Estas enfermedades — que los expertos denominan EAT (enfermedades animales transfronterizas) — aparecen o reaparecen periódicamente en todo el mundo y provocan pérdidas de miles de millones de dólares, además de amenazar la salud, la vida y los medios de subsistencia de millones de familias agricultoras pobres y de sus vecinos.

Solamente en los últimos 18 meses, la *Office International des Epizooties* (OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal) ha comunicado numerosos de brotes de EAT en varios continentes: fiebre aftosa en África, Asia y América Latina, peste porcina clásica en África, Asia y Europa, y peste bovina en África y Asia. Y, más recientemente, ha habido una intensa cobertura mediática en torno a la sumamente patógena gripe aviar (HSNI), que ha tenido brotes muy graves en Asia, África y Europa, donde enfermaron muchas aves (muriendo millones de ellas), otros animales y también personas.

El costo de los brotes de EAT debe estimarse tanto en función de los esfuerzos para controlarla como de las pérdidas consiguientes en medios de subsistencia. Por ejemplo, el costo del brote de fiebre aftosa de 2001 en Reino Unido fue estimado en más de 4 500 millones de euros para el sector público y en más de 7 500 para el sector privado. El problema ético que plantea la estrategia de erradicación y las consecuencias sociales del sacrificio de tantísimos animales son sólo algunos de los costos encubiertos que es preciso tener en cuenta al evaluar los efectos de estas enfermedades amenazadoras.

Actualmente hay más organizaciones y más expertos que aúnan sus fuerzas para prevenir y combatir las EAT: servicios veterinarios, institutos de investigación y organizaciones internacionales, como el OIEA y la Organización para la Alimentación y la Agricultura, que tienen una división conjunta en Viena (Austria). En el programa conjunto FAO/OIEA se trabaja con miras al descubrimiento precoz de nuevas enfermedades, la gripe aviar entre ellas, empleando para ello técnicas nucleares y de radiación.

Los problemas son tan graves como arduos, pero las tecnologías nucleares pueden ofrecer una solución.

Para la mayoría de los países en desarrollo, descubrir las EAT sigue siendo una cuestión vital. El problema estriba en su incapacidad de detectar el virus rápidamente y poder determinar con suficiente antelación si se trata de la cepa H5N1 u otro subtipo, de forma que las autoridades puedan adoptar las medidas de control correspondientes, por lo están haciendo grandes esfuerzos con miras a la rápida detección del agente patógeno. El reconocimiento precoz de estas infecciones virales impediría su propagación a vastas poblaciones animales en extensas regiones geográficas. Así pues, el desarrollo de métodos de diagnóstico innovadores y potentes, nucleares o relacionados con la energía nuclear, es en la actualidad un problema crucial para la investigación veterinaria y los servicios de salud animal.

La virología molecular ofrece una gama de métodos nuevos capaces de acelerar y mejorar el diagnóstico de las enfermedades infecciosas, tanto animales como humanas. Los métodos de detección molecular, como las tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permiten realizar un diagnóstico muy rápido. El descubrimiento del virus puede hacerse en cuestión de horas o incluso de minutos, con un nivel de sensibilidad inferior a un solo organismo patógeno.

Los métodos moleculares han contribuido mucho al pronto descubrimiento de agentes infecciosos, tanto de los ya bien conocidos como de los de reciente aparición, como los virus Nipah y Hendra, o los corona dentro del espectro de los virus del SRAS, así como a la detección y caracterización molecular de la cepa H5N1 de la gripe aviar, sumamente patógena, que actualmente constituye una amenaza mundial. Los métodos de amplificación del ácido nucleico, aunque inicialmente costosos y laboriosos, se han abaratado bastante y son fáciles de usar en los laboratorios de diagnóstico.

En Suecia, las primeras pruebas de diagnóstico por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se practicaban ya en 1987, tan sólo dos años después de la primera descripción del principio de la PCR. En los dos últimos decenios, se han desarrollado y validado en este país 50 pruebas PCR, y actualmente se emplean de forma rutinaria en los laboratorios de diagnóstico.

Cuando se examina el parentesco genético de varios virus, el objetivo no es una detección de gran alcance, sino obtener una alta resolución filogenética o huella dactilar de un virus concreto o aislado. Para ello, se focalizan las regiones genómicas variables de los virus y éstas muestran la dirección de la evolución del virus, indicando frecuentemente el origen de la primera infección. Estos análisis filogenéticos por PCR se utilizan para agrupar los pestivirus, entre ellos el virus de la peste porcina clásica y el virus de la diarrea viral bovina, así como para clasificar agentes patógenos aislados (H5N1, por ejemplo).

Los análisis por PCR de alta resolución filogenética son instrumentos útiles para la rápida identificación de las diversas variantes de los virus. La identificación genética es muy exacta y rápida (unos días u horas). La propagación de las variantes de los virus puede ser rastreada y atajada rápidamente, para así impedir la propagación a grandes extensiones geográficas.

La rápida identificación filogenética y el rastreo de los virus se conocen como 'epizootiología molecular'. Por ejemplo, se realizaron estudios de este tipo cuando se identificaron variantes genéticas del virus de la peste porcina clásica en varios países de Europa Central y cuando se partía de la hipótesis de que los genotipos de Europa y Estados Unidos del virus del síndrome respiratorio y reproductor del ganado porcino evolucionaban a partir de un antepasado común descubierto en Europa oriental.

Los análisis por PCR en tiempo real constituyen un método innovador y rápido para descubrir los virus. El diagnóstico se puede automatizar aun más empleando la robótica para la extracción y manipulación del ácido nucleico. En comparación con los análisis de amplificación anteriores, el análisis por PCR en tiempo real tiene otra ventaja más: se puede utilizar *PCR cuantitativo*, lo que permite estimar la carga viral (la cantidad de virus en sangre). El aspecto cuantitativo es fundamental cuando un virus frecuente en los animales está posiblemente generando síntomas relacionados con la carga viral, por ejemplo, los coronavirus felinos o el circovirus porcino 2. La medición de la carga viral también tiene importancia para evaluar los efectos de los tratamientos antivirales, especialmente en virología humana.

Para garantizar la fiabilidad de los análisis de diagnóstico por PCR es importante incorporar *controles internos*. Al incluir ese control intrínseco, con su fluoróforo específico llamado 'reporter', se obtiene información sobre la calidad de la muestra y los errores del laboratorio. De forma simultánea, el sistema muestra la amplificación de las secuencias de nucleótidos y garantiza la seguridad en el diagnóstico.

En la actualidad, tanto las autoridades nacionales como internacionales exigen pruebas rigurosas de que los análisis de diagnóstico son de la mayor fiabilidad posible. Los organismos internacionales como la OIE, FAO/OIEA, las instituciones nacionales de investigación y las empresas mercantiles, hacen grandes esfuerzos para lograr una normalización a escala internacional.

Teniendo en cuenta estas exigencias, los laboratorios de diagnóstico han comenzado a validar y normalizar los análisis

rutinarios de diagnóstico por PCR. Por ejemplo, la norma EN ISO/IEC 17025:2000 ofrece directrices para laboratorios acreditados y especifica muchos parámetros importantes. También la OIE publicó en 2000 una norma para la validación de los análisis de diagnóstico en veterinaria.

¿Cuánto se tarda en identificar y caracterizar un virus patógeno como el de la gripe aviar?

Gracias a las técnicas moleculares, el plazo es de uno o dos días, mucho más breve que con los métodos convencionales. En Suecia se ha inventado un análisis por PCR de una sola fase y en tiempo real para la detección rápida y simultánea de un amplio espectro de virus de la gripe, entre ellos los relacionados con la extremadamente virulenta gripe aviar.

La rapidez en la identificación y detección es fundamental para una alerta precoz, tan necesaria, sobre todo, para los países en desarrollo. La detección simultánea de diferentes subtipos de gripe aviar permite a las autoridades observar la aparición de cepas de la gripe en aves salvajes, granjas avícolas y algunas especies de mamíferos. El método representa un instrumento sumamente rápido y fiable para el diagnóstico de una de las peores epizootias transfronterizas del mundo.

Sándor Belák trabaja en la División Conjunta de Investigación y Desarrollo, Departamento de Virología, Universidad Sueca de Ciencias de la Agricultura (SLU) y el Instituto Nacional de Veterinaria (SVA) de Uppsala, Suecia. Correo-e:sandor.belak@sva.se.

Antecedentes de la gripe aviar

Técnicamente, la gripe aviar o "gripe del pollo" se conoce por una serie de números y letras: HPAI del subtipo H5N1.

El actual brote de la gripe aviar apareció en Asia en 2004 y se debe a un virus del tipo H5. Además, el virus fue identificado como perteneciente al subtipo N1, un descubrimiento importante que reveló que esta gripe podría ser mortal para los humanos.

HPAI aparece tras la infección del animal por algunas cepas del virus A de la gripe. Estas se clasifican en subtipos en función de sus dos proteínas externas, denominadas hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N).

¿Cómo se identifica y detecta el virus? Normalmente, a partir de una muestra patológica, se empieza por aislar el virus en los embriones de los huevos de pollo. Este proceso dura de cuatro a siete días. A continuación, hay que identificar el subtipo del virus aislado por medio de una batería de anticuerpos específicos que atacan las distintas proteínas H y N.

La identificación solamente puede efectuarse en laboratorios especializados. Para confirmar el carácter patógeno de un subtipo, hay que inocular después el virus aislado a pollos de cuatro a seis semanas de edad, sensibles al virus. Las cepas se consideran sumamente patógenas cuando la mortalidad que producen en los pollos inoculados es superior a 75% en un plazo de diez días.

El gran problema es que los procedimientos actuales de detección son lentos. Afortunadamente van surgiendo métodos más rápidos, gracias al apoyo del OIEA, la FAO y otros institutos y organizaciones.