

Taller de epidemiología molecular sobre enfermedades virales

Beatriz Gómez,* Luis Cabrera,** Carlos F. Arias***

Resumen

Con el propósito de promover la interacción entre investigadores en epidemiología y virología se realizó un taller sobre epidemiología molecular de virus en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México el 29 de septiembre de 1995. En este taller, en el que participaron 18 ponentes de 10 instituciones diferentes, los investigadores presentaron sus trabajos y experiencias en esta área. Durante el taller se hizo un análisis somero de la frecuencia y distribución de las enfermedades virales de importancia epidemiológica y se presentaron trabajos sobre: rotavirus, poliovirus, virus sincitial respiratorio, virus del dengue, papilomavirus, VZV, virus de la rabia y virus de las hepatitis.

Palabras clave: Taller enfermedades virales, epidemiología molecular

Summary

A workshop on viral epidemiology was held on September 29, 1995 at the Medical School of the Universidad Nacional Autónoma de México. The aim of this workshop was to promote interaction among scientists working in viral epidemiology. Eighteen scientists from ten institutions presented their experiences and work. General aspects of the epidemiology of meaningful viral diseases in the country were discussed, and lectures presented on the rota, polio, respiratory syncytial, dengue, papilloma, rabies, VIH and hepatitis viruses.

Key words: Workshop on viral diseases/ Molecular epidemiology

Introducción

La epidemiología ha sido un factor determinante para el control de las enfermedades infecciosas, gracias al conocimiento de los patrones y los mecanismos de transmisión de los agentes patógenos. En el caso de las enfermedades virales es particularmente importante comprender los mecanismos de diseminación del agente infeccioso en la población, ya que nuestras principales líneas de defensa

son la prevención de la infección y el mantenimiento de niveles altos de inmunidad tanto en las comunidades como en los individuos. De hecho, la integración de programas de inmunización con programas de vigilancia epidemiológica adecuados ha sido la clave para el control de muchas enfermedades virales.^{1,2}

Ahora bien, la aplicación de métodos moleculares le ha dado una nueva dimensión a la vigilancia epidemiológica de virus. Muchas preguntas impor-

*Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México

**Organización Panamericana de la Salud

***Instituto de Biotecnología, UNAM.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Facultad de Medicina, UNAM, Circuito Interior CU 04510, México. D.F.

tantes que antes eran difíciles de resolver se pueden ahora contestar de manera inequívoca utilizando herramientas moleculares. Por ejemplo, se puede establecer de manera clara la asociación entre infección y presencia o ausencia de síntomas para una variante de un virus particular; se pueden estudiar los patrones de transmisión; se pueden identificar los huéspedes o los nichos ecológicos que sirven como reservorios; se puede establecer la importancia de las variantes de un virus en la endemidad y epidemidad de la enfermedad; y en evaluar el impacto de los programas de vacunación, monitoreando la desaparición de variantes virales particulares.^{1,3}

La epidemiología molecular se fundamenta en la variabilidad genética de los agentes infecciosos, y en este sentido las aplicaciones más poderosas están sin duda alguna en la virología. Esto es la consecuencia, como mencionan Kewand Nathanson,³ de varias de las propiedades básicas de los virus. En primer lugar, los tiempos de replicación de los virus son típicamente muy cortos, de tal manera que las poblaciones virales pueden aumentar de manera rápida en un huésped, y si las condiciones favorecen la transmisión eficiente del virus a otros individuos, una variante viral puede expandirse de manera explosiva en unos cuantos días. En segundo lugar, las polimerasas que llevan a cabo la replicación del genoma de virus de RNA y de retrovirus tienen frecuencias de error muy altas,⁴ lo que da lugar a que las poblaciones de estos virus consistan de una amplia colección de variantes distribuidos alrededor de una secuencia genómica consenso. Tercero, las condiciones cambiantes del medio ambiente, tales como la dinámica de la respuesta inmune en los individuos o la disponibilidad de nuevas especies que sirvan como huéspedes, pueden dirigir a los virus hacia una evolución rápida. Cuarto, la migración geográfica de los huéspedes humanos y animales puede facilitar la ampliación y diseminación de los agentes virales. Por último el pequeño tamaño de los genomas virales permite su caracterización detallada por medio de una gran variedad de métodos analíticos.^{1,3}

Por las razones antes mencionadas, es claro que la epidemiología molecular de virus es un área que debe ser desarrollada para contender de manera más efectiva tanto con los virus que nos son ya familiares, como con aquellos que puedan apa-

recer o reaparecer en el futuro, y que han sido descritos por Joshua Lederberg, quizás de manera no exagerada, como los únicos competidores reales de la raza humana en el dominio de este planeta.⁵

En el análisis de la frecuencia y distribución se planteó el cambio del patrón epidemiológico de algunas de las enfermedades virales previsible con vacunas y que han sido dominadas o están en proceso de eliminación o control, como es el caso de la viruela de la que se ha logrado su erradicación mundial (último caso en Merka, Somalia, en 1987);⁶ de la poliomielitis que ha sido eliminada de América (último caso en Junin, Perú, en 1993)^{1,2} y en futuro cercano de todo el mundo; del sarampión el cual es probable que se elimine antes del año 2000 si se cumple el objetivo del programa correspondiente; y de la fiebre amarilla, de la cual a pesar de seguirse manifestando en brotes y epidemias en regiones selváticas de América del Sur transmitida por mosquitos del género *Haemagogus*, es de fácil control en áreas urbanas con el uso de la vacuna, no obstante que puedan existir densidades altas del vector *Aedes aegypti*.^{7,8} Sin embargo, aún persisten desafíos no resueltos de enfermedades para las cuales, a pesar de que se han desarrollado inmunógenos efectivos, éstos no han sido incorporados a programas rutinarios de vacunación universal o sólo están accesibles a una minoría de la población, y por supuesto, el desafío también existe para el control de las enfermedades para las cuales no se han desarrollado todavía vacunas efectivas.^{1,3}

Dentro de los retos importantes a enfrentar está el virus del dengue,^{1,3,7} donde un alto número de personas en las zonas de riesgo han sido ya infectadas una vez y están en posibilidad de ser reinfectados por virus de un serotipo diferente, lo cual como se sabe aumenta el riesgo de cursar como dengue hemorrágico. En particular, es preocupante la reciente llegada del dengue serotipo 3 a nuestro país, el cual había estado ausente en los últimos años. Otro motivo de preocupación son los virus respiratorios, los cuales a pesar de no existir estudios epidemiológicos amplios y detallados, tienen sin duda alguna un peso específico importante en los índices de morbilidad y mortalidad, particularmente en la población infantil, en la que sobresalen los virus sincitial respiratorio y parainfluenza 3;^{1,3} el VI,^{9,10} donde las cifras de prevalencia

en la ciudad de México son ya, tan o más altas que en otras grandes ciudades incluyendo Nueva York, Miami, Los Angeles y Río de Janeiro; los rotavirus, importantes agentes etiológicos de las gastroenteritis infantiles,^{1,2} cuya frecuencia de infección se ha mantenido aún después del particular esfuerzo desarrollado para controlar las enfermedades diarreicas iniciado con la llegada del cólera a México. La estabilidad en la frecuencia de infección por rotavirus contrasta con la marcada reducción en las diarreas de origen bacteriano lograda al mejorar las condiciones sanitarias generales, lo que sugiere que para reducir la morbilidad y mortalidad causada por estos virus tendrá que implementarse un programa de vacunación específico.¹¹ Otros problemas importantes son los papilomavirus,¹² causa frecuente de cáncer cérvico uterino en las mujeres mexicanas; la rabia humana y animal,¹³ misma que es todavía azote en América Latina; los virus de la hepatitis, que siguen siendo un problema importante de salud^{1,2} y de los que se conoce muy poco de sus características epidemiológicas en nuestro país. Además de estas enfermedades, hay todavía otras localizadas a nichos ecológicos particulares en América, como las fiebres hemorrágicas causadas por hantavirus en los Estados Unidos, o por los arenavirus de Junín en Argentina y de Machupo en Bolivia,^{1,2} o a nichos ecológicos en otra partes del mundo, como los recientes episodios de fiebre hemorrágica por filovirus en África (causados por el virus Ebola), así como enfermedades de las cuales hay muy poca información y que pudieran tener una presencia relevante en México y América Latina, como son las encefalitis de origen viral, los virus lentos, los priones, etc.^{1,25}. Todas estas enfermedades significan retos y a la vez oportunidades de investigación para identificar y modificar factores de riesgo, entender las enfermedades en los individuos y en las poblaciones y para el desarrollo tecnológico de protección.¹⁻³

Para algunas de las enfermedades virales ya mencionadas el reto principal de los países en desarrollo, es proporcionar las condiciones adecuadas de saneamiento básico y de la vivienda, así como mejorar la higiene de la población por medio de la elevación del nivel educativo. Sin embargo, para muchas otras la única defensa que tenemos es entender los diversos aspectos de la

epidemiología de los virus lo mejor posible y desarrollar medidas preventivas.¹¹

Resultados

A continuación resumiremos los aspectos relevantes de las presentaciones llevadas a cabo durante el taller. Los doctores Carlos Arias del Instituto de Biotecnología de la UNAM y Juan Calva del Instituto Nacional de la Nutrición, presentaron resultados preliminares de un estudio que llevan a cabo sobre la epidemiología molecular de los rotavirus, en colaboración con investigadores del Hospital Infantil de México, del Instituto Mexicano del Seguro Social y de las Universidades de Yucatán, Nuevo León y San Luis Potosí. Para este estudio se colectaron muestras de heces fecales de niños menores de dos años con diarrea aguda y sin diarrea, en seis diferentes localidades del país. 53% de las muestras diarreicas fue positiva para rotavirus, mientras que el 7% de las muestras control presentó este agente. La caracterización con anticuerpos monoclonales de las proteínas de superficie del virus, así como con el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de los genes de estas proteínas, indicaron que las cepas circulantes presentan una variabilidad mayor a la esperada. Queda por determinarse el significado de la variabilidad encontrada, en términos de inducción de inmunidad protectora.

La maestra en ciencias Herlinda García del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) presentó los datos sobre frecuencias de aislamiento de rotavirus en muestras de niños con diarrea obtenidas en clínicas ubicadas en varios estados de la República, incluyendo Veracruz, Nuevo León, Puebla, Michoacán y Tamaulipas, habiendo encontrado frecuencias que variaron entre el 35 y 75%. En el diagnóstico y caracterización de las muestras utilizó el sistema de rotavirus, que se basa en la detección del genoma de los rotavirus (compuesto por once segmentos de RNA doble cadena) en geles de poliacrilamida. Este método, que fue uno de los primeros empleados para estudiar la epidemiología de los virus a nivel molecular, permite la distinción de variantes. El serotipo de la proteína VP7 de estos virus está siendo determinado por PCR.

La primera vacuna contra rotavirus está a punto de ser autorizada para su uso en infantes por parte de las autoridades de los Estados Unidos, y en México existe el interés por determinar su utilidad. En este sentido, la información obtenida en el tipo de estudios descritos anteriormente será clave para evaluar de manera objetiva el éxito o fracaso que se obtenga con ésta o con otras vacunas contra rotavirus que se prueben en nuestro país en el futuro.

El doctor Fernando Puerto presentó un proyecto sobre el dengue en el Estado de Yucatán que se realiza en el Centro de Investigaciones Regionales doctor Hideyo Noguchi de la Universidad de Yucatán. El trabajo multidisciplinario comprende varios puntos de vista, entre otros, social, clínico, epidemiológico y entomológico. Los resultados obtenidos en este estudio han permitido identificar los factores de riesgo en la transmisión de la enfermedad, favoreciendo la implementación de medidas para el control del vector, así como el aislamiento e identificación de los diferentes serotipos del virus que circulan en la región. Los resultados obtenidos en este estudio han sido considerados en el diseño de las campañas de prevención contra el dengue que se llevan a cabo en el Estado. Las cepas del virus que han circulado en los seis últimos años en Yucatán se encuentran almacenadas para su futura caracterización por métodos moleculares. Su tipificación por estos métodos, sin la necesidad del previo aislamiento del virus en cultivo de células, será de gran valor práctico para la vigilancia epidemiológica del virus.

El doctor Celso Ramos, del Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública habló sobre los resultados que han obtenido en su grupo respecto a infecciones por flavivirus que afectan al sistema nervioso central. De manera particular sobre la neuropatología en las infecciones por dengue y sobre la importancia de los niveles de interleucinas y otras citocinas en la severidad de la infección.

El maestro en ciencias José Carmen Gudíño presentó el trabajo que realizan en el INIRE en relación al aislamiento y la identificación de los subtipos de VIH circulantes en el país. A través de la secuenciación de un fragmento del gene que codifica por la proteína gp120 del virus y del análisis

de las muestras por PCR y electroforesis de heteroduplex, las cepas aisladas en México se han clasificado tentativamente como pertenecientes al subtipo B.

Sobre rabia habló el doctor Juan Antonio Montaño de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Su ponencia versó sobre la distribución de la infección a nivel mundial así como de los diferentes serotipos circulantes. Discutió los ciclos de transmisión de la rabia y los hallazgos en estudios epidemiológicos donde se han caracterizado las cepas de este virus mediante el uso de anticuerpos monoclonales. Estudios similares están planeados a llevarse a cabo en México, complementando el uso de anticuerpos monoclonales, con el análisis de regiones hipervariables del genoma del virus usando la técnica de PCR y digestión con enzimas de restricción.

El doctor Guillermo Vázquez del Hospital Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social presentó los resultados obtenidos en un estudio sobre la prevalencia del virus sincitial respiratorio en pacientes con infección de las vías respiratorias bajas en una comunidad de Tlaxcala. Sus resultados sugieren que la frecuencia de infección por bacterias fue baja, mientras que en el 24% de los pacientes se identificó el virus sincitial respiratorio por inmunofluorescencia de exudados nasofaríngeos. Los virus colectados no han sido caracterizados de manera más detallada.

Sobre la detección del virus sincitial respiratorio por la técnica de PCR habló la doctora Beatriz Gómez, de la Facultad de Medicina de la UNAM, quien describió una técnica que permite simultáneamente identificar y clasificar al virus en subtipos, a través de la determinación del **polimorfismo** en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del DNA viral amplificado por RT-PCR. Este método se fundamenta en las secuencias reportadas para las proteínas F y G del virus, en las diferencias que existen entre estas proteínas en los distintos tipos y subtipos virales, y en el hecho de que los genes que codifican por dichas proteínas son contiguos en el genoma del virus. Actualmente en el laboratorio de la doctora Gómez se está utilizando esta técnica para tipificar aislados del virus sincitial respiratorio que se tienen en el acervo de su laboratorio. Las perspectivas de este trabajo son carac-

terizar a través de este método un número mayor de aislados que puedan dar una visión representativa de las cepas que circulan en el territorio nacional.

Discusión

Aunque es indudable que las herramientas moleculares empiezan a ser empleadas con mayor frecuencia en los estudios epidemiológicos en nuestro país, se puede apreciar de los resúmenes de las presentaciones que la epidemiología molecular de virus es todavía muy incipiente en México. Esto, creemos es no sólo debido al problema general de la limitación de los recursos en infraestructura que se requieren para este tipo de estudios, sino en particular debido a la falta de entrenamiento en las metodologías moleculares por parte de los epidemiólogos, y sobre todo a los pocos investigadores que se dedican a la virología, y más especialmente a la virología molecular, en nuestro país. Aunque el bajo número de investigadores es un problema general de la ciencia en México, este problema es particularmente agudo en el caso de la virología. Esto se refleja, por ejemplo, en el número de proyectos apoyados en esta área por el CONACyT durante el año de 1995. De 230 proyectos apoyados en los Comités de Salud y Ciencias Naturales, sólo siete estuvieron relacionados con algún aspecto del estudio de los virus, ya sea a nivel epidemiológico, investigación básica sobre su replicación, interacción con la célula huésped o patogénesis, o con la caracterización de la respuesta inmune en las infecciones virales. Como punto de referencia cabe mencionar que el número de proyectos apoyados para el estudio de bacterias y parásitos fue tres veces más alto.

Por otro lado, la débil respuesta de la comunidad científica del país ante la actual epidemia del VIH; ante el riesgo de un brote importante de dengue hemorrágico; ante los brotes anuales de rotavirus; y ante la presencia de virus de gran impacto en la salud de la población infantil como el virus sincitial respiratorio, ha demostrado que uno de los problemas más severos que afronta México en el área de las ciencias microbiológicas es el de la falta de un número adecuado de virólogos que sean capaces de responder al reto que nos presen-

tan las actuales enfermedades virales ya presentes en el país, y aquellas que seguramente surgirán o resurgirán en un futuro cercano.

Debido a estas razones, consideramos que para impulsar la epidemiología molecular de virus en México se requiere de un programa bien establecido, con énfasis en la formación de recursos humanos en diversas áreas de la virología, y en la estimulación del contacto y la colaboración entre los investigadores de este campo, los cuales además de ser escasos, se encuentran aislados en diversas instituciones del país. Algunas de las actividades que ayudarán a lograr estos objetivos serían:

1. Promover activamente el estudio de la virología en los niveles de licenciatura y posgrado de las diferentes instituciones de educación superior del país, por medio de cursos, seminarios y simposios llevados a cabo tanto por investigadores nacionales como extranjeros de reconocida calidad.
2. Organizar cursos nacionales de entrenamiento en la metodología empleada en la epidemiología molecular de virus.
3. Organizar reuniones científicas periódicas donde puedan interaccionar los investigadores y estudiantes interesados en diversos aspectos de la virología.
4. Promover la elaboración de programas específicos de apoyo a proyectos en virología por parte del gobierno federal y de las instituciones que dan apoyo a la ciencia en México.

Referencias

1. Nathanson N. Epidemiology. En: Virology. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. (Eds). Lippincott-Raven Publishers. 3a. Edición. Philadelphia, 1996, pp 151-271.
2. White DO, Fanner FJ. Medical Virology. Academic Press. 4a. Edición New York. 1994.
3. Kew, O& N. Nathanson. Molecular epidemiology of viruses. Sem. Virol. 1995;6:357-358.
4. Coffin JM. Retroviridae. The virus and their replication. En: Virology. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. (Eds). Lippincott-Raven Publishers. 3a. Edición. Philadelphia, 1996, pp 1767-1848.
5. Morse, SS. & A. Schluenderberg. Emerging viruses: The evolution of viruses and viral diseases. J. Infect. Dis. 1990;162:1-7.

6. Fenner F, Henderson DA, Arita I, Jezek Z, Ladnyi ID. Smallpox and its eradication.. World Health Organization, Geneva. 1988.
7. Monath TP. The arbovirus: epidemiology and Ecology» vols 1-5 CRC Press Boca Raton, Florida 1988.
8. Monath TP. Yellow fever Victor, Victoria? Conqueror, conquest? Epidemics and Research in the last forty years an prospects for the future. Am. J Trop. Med Hyg. 1991;45:1-5.
9. Koff WC, Wong-Stahl F, Kennedy RC, eds. En: "Aids Research Reviews" Vols 1 on (anually) . Dekker, New York. 1991.
10. Jasney B. AIDS: the unanswered questions. Science 1993;260:1253-64.
11. Kapikian AZ, Chanock RM. Rotavirus En: Virology. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. (Eds). Lippencot-Raven Publishers. 3a. Edición, Philadelphia, 1996 pp 1657-1708.
12. Pfister HD. Papilloma viruses and human cancer CRC Press, Boca Raton, Florida. 1990.
13. Advisory Committee on Immunization practices, Centers for Disease Control 1991 Rabies prevention United States, Morb Mortal Weekly Rep. 1991 40 (rr-3), 1-10.