

LA IMPORTANCIA DE LOS SISTEMAS DE VIGILANCIA GRIPAL

Pilar Pérez Breña y José Carlos Aguilar Ruiz

Servicio de Virología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid.

Los virus de la gripe humana (influenza) constituyen un importante problema de salud, tanto para los países en vías de desarrollo como industrializados. Destacan por su capacidad de producir epidemias anuales en la especie humana y, ocasionalmente, pandemias (epidemias extendidas a muchos países). Las epidemias de gripe se asocian a un exceso de morbilidad y mortalidad, incluso en las temporadas epidémicas de baja intensidad. Durante una temporada epidémica media, alrededor del 10% de la población mundial contraerá la gripe, originándose un fuerte impacto económico debido a la pérdida de productividad laboral y a los costes derivados de la atención a los pacientes.

Estos virus son los responsables de la enfermedad de "tipo gripal", aunque el espectro de infecciones que originan abarca desde la afectación leve del tracto respiratorio superior hasta la neumonía grave. Los ancianos y las personas con enfermedades cardiorrespiratorias de base son los grupos de población con mayor riesgo de desarrollar las complicaciones asociadas a la infección gripal.

El control de la gripe se basa fundamentalmente en la utilización de vacunas inactivadas. Su uso va dirigido a la protección individual, especialmente de los pacientes de riesgo, más que a la prevención de grandes epidemias. La eficacia de la vacuna depende de su óptima formulación, ya que requieren una estrecha semejanza antigénica entre las cepas vacunales seleccionadas y los virus circulantes en cada momento. La información obtenida del análisis antigénico de los aislamientos virales, así como la determinación de su potencial capacidad de difusión en las poblaciones, son los ejes básicos en la vigilancia gripal. El actual desarrollo de vacunas de virus atenuados y los nuevos fármacos antigripales inhibidores de la neuraminidasa constituirán las alternativas de prevención y control en un futuro cercano.

EVOLUCIÓN Y CIRCULACIÓN DE LOS VIRUS INFLUENZA

Los virus influenza presentan un genoma RNA segmentado, de polaridad negativa. De los tres tipos existentes, A, B y C, sólo los dos primeros se asocian a epidemias de gripe de morbilidad y mortalidad significativa. Los virus Influenza A pueden ser subtipados, de acuerdo con la naturaleza antigénica y genética de sus glucoproteínas de superficie. Hasta la fecha, se han identificado 15 subtipos de hemaglutinina (H) y 9 subtipos de neuraminidasa (N). Todos los subtipos han sido detectados en hospedadores aviares; sin embargo, sólo los virus H3N2, H1N1 y H2N2 han causado pandemias en el ser humano.

La capacidad de los virus gripales humanos para causar epidemias recurrentes e infecciones repetidas a lo largo de la vida se debe a su extraordinaria variabilidad antigénica, alcanzada por diferentes mecanismos. Los virus del tipo A sufren un cambio antigénico progresivo denominado "deriva antigénica" (*antigenic drift*), que consiste en la acumulación de mutaciones puntuales, dando como resultado cambios de aminoácidos en determinadas regiones antigénicas de las glucoproteínas de superficie. Las mutaciones ocurren como consecuencia de errores de la RNA-polimerasa viral y la presión inmune permite seleccionar aquellos virus que escapan a los anticuerpos neutralizantes, inducidos por virus infectantes previos o vacunales. En los períodos interpandémicos cada variante antigénica reemplaza a su predecesora, de tal forma que la cocirculación de diferentes variantes de un determinado subtipo ocurre durante períodos relativamente cortos. Los virus B también presentan deriva antigénica, aunque su patrón de evolución es más complejo, pudiendo detectarse diferentes tipos antigénicos durante una misma epidemia.

Los virus Influenza A pueden mostrar, además, otro mecanismo de variación antigénica conocido como "salto antigénico" (*antigenic shift*), que da como resultado la aparición de un virus con un nuevo subtipo de hemaglutinina, acompañado o no de un nuevo subtipo de neuraminidasa. Su introducción en la población humana puede originar una pandemia, si se cumplen las condiciones de transmisibilidad suficientes. En las últimas pandemias de gripe humana se han observado tres tipos de salto antigénico: i) por transmisión directa de un virus A desde una especie animal al hombre (virus H1N1 de la pandemia de 1918; ii) por aparición de un nuevo virus, cuyo genoma es el resultado de la mezcla y redistribución de genes entre dos virus A, producida en el curso de la coinfección de un hospedador intermediario apropiado (pandemia por H2N2 de 1957 y por H3N2 en 1968); iii) debido a la reintroducción de un virus mantenido sin cambios fuera de la circulación, en un laboratorio o en un reservorio desconocido en la naturaleza (virus H1N1 que reapareció en 1977 y desde entonces circula conjuntamente con los H3N2).

Finalmente, hay que destacar la creciente detección de casos de transmisión interespecie de virus gripales ocurrida en los últimos años. El paso de los virus aviares directamente al hombre, antes considerado muy improbable, ha sido documentado recientemente. En 1997-1998 un virus aviar, el H5N1, produjo en Hong-Kong 18 casos de enfermedad humana grave que causó la muerte de seis personas, y en 1999 se aisló en China otro virus aviar (H9N2) en dos niños que presentaban cuadros de tipo gripal. Muy recientemente, se ha comunicado el primer caso detectado de infección natural en un animal por virus B, virus humano del que no se conoce reservorio animal. Este virus era similar a las cepas del virus Influenza B circulantes durante el período 1995-1998, el cual fue aislado de un hisopo faríngeo procedente de una foca (*Phoca vitulina*) con síntomas respiratorios.

PLANES PARA LA PREVENCIÓN DE UNA PANDEMIA

Estos casos comentados previamente alertan sobre la posibilidad de que aparezca, en un futuro próximo, un virus gripal cuyos antígenos de superficie resulten "nuevos" para el hombre. Además, debemos destacar la importancia que tienen los animales como reservorio de los virus de la gripe, y el riesgo de que los virus portadores de una hemaglutinina nueva, puedan originar en el hombre cuadros clínicos más graves o diferentes de los actualmente conocidos.

Recogiendo esta preocupación, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado a los diferentes países la necesidad de poner a punto planes estratégicos de emergencia frente a un posible virus con potencial pandémico, con el fin de establecer medidas tempranas de control, necesarias para proteger a la población. Uno de los aspectos esenciales de estos planes es el desarrollo de sistemas de vigilancia de gran eficacia y de laboratorios especializados con tecnología de alto nivel para conseguir detectar, en el menor tiempo posible, la introducción de un nuevo virus en la población. Es esencial, a la hora de activar medidas de control frente a una posible pandemia o epidemia de grandes proporciones, conocer las posibles formas de transmisión intra e interespecie, la existencia de reagrupamientos genéticos, o la determinación del origen y relaciones filogenéticas del nuevo virus con otros circulantes en diversas especies.

SISTEMAS DE VIGILANCIA

La vigilancia gripal es, pues, un objetivo de salud pública a escala mundial. Ya en 1947, la (OMS) estableció una red de vigilancia internacional de la gripe, que en la actualidad se asienta en el trabajo conjunto de cuatro Centros Internacionales Colaboradores (Tokio, Melbourne, Londres y Atlanta) y, aproximadamente, 110 Centros Nacionales de Gripe, distribuidos en más de 70 países. El intercambio de información y la ayuda entre los centros nacionales y los colaboradores regionales (Comunidades Autónomas), persigue varios fines: i) conocer cuáles son los virus gripales que están circulando, para realizar una correcta selección de las cepas que deben incorporarse a la vacuna de la siguiente temporada; ii) cuantificar la extensión de la epidemia de gripe y describir la distribución de los casos por edad, sexo, estado vacunal y otros datos de interés; iii) optimizar la efectividad de las medidas de prevención y control; iv) detectar la aparición de una nueva cepa pandémica. Para ello es necesario analizar de forma integrada los datos virológicos y clínico-epidemiológicos recogidos de manera continua a intervalos de tiempo no superiores a una semana.

El esquema de vigilancia de la gripe en España se basa en la colaboración entre las redes de médicos centinelas de las Comunidades Autónomas y los laboratorios de virología. El conjunto de todos ellos constituye la Red Nacional de Vigilancia de la Gripe. El centro coordinador es el Instituto de Salud Carlos III, donde se informatizan e integran los datos epidemiológicos y virológicos generados durante cada una de las semanas, con el fin de ofrecer una información conjunta de la epidemia de gripe en nuestro país. La información así elaborada se remite a las autoridades e instituciones sanitarias y a las principales redes de vigilancia internacionales, como el *Sistema Flunet* de la OMS, y el EISS, que integra a los países europeos.

Vigilancia epidemiológica

Para estimar la extensión de la actividad gripal se utiliza una amplia variedad de índices. El principal marcador de incidencia se basa en el número de pacientes con cuadros gripales que acuden a las consultas. Otros índices que pueden emplearse son el absentismo escolar o laboral, las tasas de venta de fármacos que combaten síntomas gripales, o la hospitalización por infecciones respiratorias agudas. El impacto de las epidemias de virus Influenza sobre la mortalidad es estimado de un modo retrospectivo, y se evalúa como el exceso de mortalidad asociado a la gripe.

En el sistema de vigilancia español, los médicos centinelas son los responsables de la recogida semanal de la información clínico-epidemiológica y de la selección y obtención de muestras de secreciones respiratorias de algunos enfermos para el análisis virológico. Los datos que se recogen incluyen la edad, sexo, manifestaciones clínicas, antecedentes de vacunación, complicaciones, valoración asistencial (derivación a un especialista, hospitalización etc.) y baja laboral. Forman parte de la red médicos de familia y pediatras de atención primaria. La distribución de los médicos centinela en cada territorio responde a criterios urbano-rurales, de dispersión geográfica, pirámide de edad, distribución laboral de la población (industrias, servicios, agricultura), etc., y debe cubrir, como mínimo, el 1% de ésta.

Vigilancia virológica

El otro pilar de vigilancia de la gripe lo constituyen los laboratorios de virología. En líneas generales, podemos distinguir tres tipos de laboratorios encargados de la vigilancia gripal: laboratorios regionales asociados a redes centinelas, laboratorios nacionales y laboratorios internacionales, estos últimos integrados en el sistema de vigilancia de la OMS.

Los laboratorios regionales realizan el aislamiento de los virus gripales circulantes así como, en aquellas redes que así lo establezcan, las determinaciones de anticuerpos pre y postvacunales frente a los virus de la vacuna recomendada por la OMS en cada temporada. Los laboratorios de los Centros Nacionales, dependiendo de la dotación tecnológica de que dispongan, y de acuerdo con las prioridades que cada país asigna a la política de vigilancia gripal, confirman o determinan el tipo o subtipo de los virus aislados por los laboratorios regionales, o desarrollan un análisis genético o antigénico más profundo. Los Centros Nacionales de Gripe remiten los virus, parcialmente caracterizados, a los Centros Internacionales Colaboradores de la OMS, para que éstos realicen el análisis genético y antigénico comparativo de las cepas recibidas de los distintos países.

Los reactivos y los métodos diagnósticos utilizados por los diferentes laboratorios son heterogéneos, y no es fácil estimar si los resultados obtenidos son comparables. Los centros nacionales e internacionales deben actuar como referencia para la introducción de nuevas tecnologías, asegurando la calidad de los diagnósticos de los laboratorios que de ellos dependen.

Diagnóstico y caracterización de los virus gripales

El diagnóstico y la caracterización de estos virus se encuentran en continuo progreso, y en los últimos años se ha incrementado el número de métodos disponibles, por lo que cada laboratorio debe elegir los ensayos de acuerdo con sus posibilidades y prioridades.

Serología

Los estudios serológicos se basan en demostrar un aumento significativo del título de anticuerpos entre el suero recogido en la fase aguda de la enfermedad y durante la convalecencia. Rara vez proveen un diagnóstico lo suficientemente rápido como para ser útil para el paciente. La técnica más clásica es la fijación del complemento, que mide anticuerpos específicos de tipo, principalmente frente a la nucleoproteína. Tiene la ventaja de poder realizarse a la vez el mismo ensayo con otros antígenos, y así detectar varios agentes infecciosos de forma simultánea, pero es una técnica laboriosa y con una sensibilidad baja. La técnica básica en los estudios de vigilancia serológica es la inhibición de la hemaglutinación. Sus resultados se correlacionan bien con la capacidad neutralizante y protectora frente a la reinfección por virus homólogos, por lo cual se utiliza para medir respuestas a la vacunación. Detecta anticuerpos frente a la hemaglutinina, es decir frente a los antígenos específicos de subtipo. Sus mayores inconvenientes son la sensibilidad a los inhibidores no específicos, presentes en los sueros, y las reacciones cruzadas entre las cepas del mismo subtipo.

Detección de virus por aislamiento en cultivo celular

Es una herramienta clásica en el diagnóstico de estas infecciones, pero la obtención de los resultados requiere varios días. El aislamiento de los virus gripales es indispensable para el análisis antigénico, necesario en el diseño de la vacuna. Existen diversas líneas celulares que permiten el crecimiento de los virus gripales, como las MDCK, LLC-MK2, A-549. Su elección es crítica para la sensibilidad del aislamiento, ya que las células de distintas procedencias, o incluso de diversos linajes dentro de una misma línea, mantienen diferentes niveles de replicación dependiendo de la cepa circulante. Es aconsejable, por lo tanto, evaluar los cultivos celulares disponibles al inicio de cada temporada. En la actualidad, la línea más utilizada es la MDCK. El empleo de huevos embrionados de gallina con fines diagnósticos está siendo progresivamente desplazado por los cultivos celulares. La utilización de cultivos acelerados mediante la centrifugación (*shell vial*) permiten diagnosticar la infección antes de que el efecto citopático sea visible. El ensayo se basa en la reacción de anticuerpos marcados con fluoresceína (o una enzima) frente a antígenos de expresión temprana (nucleoproteína). La sensibilidad suele ser algo menor que la de los cultivos convencionales.

Diagnóstico rápido mediante la detección de antígenos víricos

Las técnicas rápidas son esenciales para un diagnóstico médico inmediato. La detección directa de antígenos víricos en muestras respiratorias, por inmunofluorescencia (IF) o enzimo-inmunoanálisis (EIA), proporciona resultados rápidos y fiables, especialmente en muestras de niños pequeños. La IF es el método más barato, pero necesita un elevado nivel de experiencia para su interpretación y, a diferencia del EIA, no se puede automatizar. La calidad de los reactivos utilizados en ambas técnicas es crítica para la obtención de buenos resultados. Los anticuerpos monoclonales han supuesto una importante mejora, al paliar en gran medida los problemas de las reacciones inespecíficas asociadas al uso de antisueros policlonales.

Diagnóstico rápido por PCR

La más reciente alternativa para establecer un diagnóstico rápido de las infecciones por virus de la gripe la constituye la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Su elevada sensibilidad y las perspectivas futuras de una realización más simple y automatizada, la convierten en una excelente herramienta de diagnóstico y en la técnica base para la caracterización genética de estos virus. En su diseño, hay que tener presente la gran capacidad de variación de estos virus por lo que, en la identificación de los tipos A, B y C, la elección de iniciadores se ha enfocado sobre genes internos conservados, como el de la proteína matriz, mientras que para la determinación de subtipo, se buscan las regiones más conservadas dentro de cada gen de HA o NA. El diseño de iniciadores se ha visto facilitado por el gran número de secuencias publicadas.

Una más reciente aproximación al diagnóstico por PCR, aplicada con éxito a los virus Influenza, la constituye la PCR en tiempo real (*TaqMan PCR*), que ofrece resultados rápidos y sensibles, con menor probabilidad de contaminación. Existen también algunas descripciones de PCR múltiples, que permiten la detección de varios virus respiratorios en una sola reacción, simplificando de forma importante el trabajo de diagnóstico.

Caracterización antigénica y genética de los virus de la gripe

El análisis antigénico de las cepas para la identificación de subtipo y variante, se basa desde hace años en la inhibición de la hemaglutinación. Este ensayo utiliza antisueros específicos obtenidos del hurón, frente a las cepas representativas o prototipos recientes. Enfrenta, en tablero de ajedrez, los virus a caracterizar y los virus prototipo frente a los antisueros patrón, considerando significativa una reducción mayor o igual a cuatro veces el título del virus a caracterizar.

El análisis genético de las variantes de interés ha recibido un gran impulso gracias a la introducción de la RT-PCR. Los productos de amplificación obtenidos con iniciadores que amplifican regiones de alta variabilidad genética pueden analizarse por secuenciación u otras técnicas, como el análisis de restricción enzimática, permitiendo un estudio genético del virus directamente de la muestra clínica. Este tipo de análisis, con el complemento de los análisis antigénicos, ayudan a tomar decisiones en el diseño anual de las vacunas y son utilizados para detectar la redistribución de genes, o para elucidar el origen y la evolución de los virus Influenza.

BIBLIOGRAFÍA

ANÓNIMO. Influenza pandemic plan. The role of WHO and guidelines for national and regional planning. WHO/CDS/CSR/EDC/99. Informe de Abril 1999.

COX N, BENDER C. Molecular epidemiology of influenza. *Sem Virol* 1995; 6:359-370.

COX N, SUBBARAO K. Global epidemiology of influenza: past and present. *Annu Rev Med* 2000; 51:407-421.

- DE JONG JC, CLAAS ECJ, OSTERHAUS ADME, WEBSTER RG, LIM WL. A pandemic warning. *Nature* 1997; 389:554.
- GORMAN OT, BEAN WJ, KAWAOKA Y, DONATELLI I, GUO Y, WEBSTER RG. Evolution of influenza A virus nucleoprotein genes: implications for the origin of H1N1 human and classical swine viruses. *J Virol* 1991; 65:3704-3714.
- HANNOUN C, TUMOVA B, EUROPEAN SCIENTIFIC WORKING GROUP ON INFLUENZA (ESWI). Survey on influenza laboratory diagnostic and surveillance methods in Europe. *Eur J Epidemiol* 2000; 16:217-222.
- ITO T, GORMAN OT, KAWAOKA Y, BEAN WJ, AND WEBSTER RG. Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. *J Virol* 1991; 65:5491-5498.
- LUDWIG S, STITZ L, PLANZ O, VAN H, FITCH WM, SCHOLTISSEK C. European swine virus as a possible source for the next influenza pandemic?. *Virology* 1994; 212:555-561.
- MUÑOZ FM, GALASSO GJ, GWALTNEY JM, *et al*. Current research on influenza viruses and other respiratory viruses: II International Symposium. *Antivir Res* 2000; 46:91-124.
- OSTERHAUS ADME, RIMMELZWAAN GF, MARTINA BEE, BESTEBROER TM, FOUCHIER RAM. Influenza B virus in seals. *Science* 2000; 288:1051-1053.
- PÉREZ BREÑA P, DE MIGUEL C, ORDOBÁS M, *et al* Sistema de vigilancia para el estudio de la circulación gripal en Madrid durante el quinquenio 1986-1991. *Med Clin* 1994; 102:401-406.
- TAUBENBERGER JK, REID AH, KRAFFT AE, BIJWAARD KE, FANNING TG. Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Science* 1997; 275:1793-1796.
- WEBSTER RG, BEAN WJ, GORMAN OT, CHAMBERS TM, KAWAOKA Y. Evolution and ecology of influenza A viruses in ducks. *Virology* 1992; 84:268-278.
- ZAMBON M. Laboratory diagnosis of influenza. En: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ (eds). *Textbook of influenza*, 1ª ed. Oxford: Blackwell Science, 1998; pp 291-313.