

DESAFÍOS Y RESPUESTAS DE LA SANIDAD ANIMAL. POR DÓNDE VAMOS

Discurso de apertura del curso

EXCMO. SR. D. ELÍAS F. RODRÍGUEZ FERRI

Académico de Número de la RACVE

24 de octubre de 2011

El escalado progresivo de la población humana, que puede alcanzar los 9.500 millones de habitantes para el 2050 establece la necesidad de un aumento sustancial de los censos de animales productores de alimentos, lo que supone, por añadidura, numerosas modificaciones más, estructurales y no estructurales. Aunque resulta muy difícil hacer previsiones, sin duda éstas ocuparán a nuestros hijos en las próximas décadas. En cualquier caso, los animales no son solo fuente de alimentos, pues forman con el hombre un todo indivisible, ocupando el supernicho ecológico que representa la Tierra, con interacciones imprescindibles. Este panorama obliga a conocer cuanto afecta de forma positiva y negativa a su existencia, pues directa o indirectamente, condicionan la vida del hombre.

La Veterinaria cumple, en la actualidad, funciones muy relevantes para la Sociedad, todas ellas claramente interrelacionadas: Sanidad Animal y Salud Pública, Biomedicina, Producción Animal, Seguridad y Tecnología de la Producción Alimentaria, y Bienestar Animal y Medio

Ambiente. La Sanidad Animal se ocupa del estudio de los procesos infecciosos que afectan a la salud de los animales, incluyendo sus causas, sus consecuencias y los procedimientos relacionados con su prevención, control y erradicación. Antes del nacimiento de la Microbiología y Parasitología, como ciencias, formaba parte de la Medicina Veterinaria integral, pero a finales del siglo XIX, los avances derivados de los trabajos de Pasteur y Koch y sus respectivas escuelas, proporcionaron a la Sanidad Animal un cuerpo de doctrina propio y se establecieron vínculos entre la Sanidad Animal y la Salud Humana. Precisamente la moderna Veterinaria surge al tiempo de creación de las Escuelas de Veterinaria, para luchar contra las epidemias, con la peste bovina como objeto central de la misma; en aquella época, los veterinarios que surgían de las aulas eran inmediatamente enviados allí donde las epidemias hacían estragos, con el fin de organizar su lucha.

Con ocasión de la gripe aviar por el virus influenza H5N1 y el riesgo de pandemia ha renacido ahora la antigua propuesta de integración de la Salud Pública y Sanidad Animal, en particular en materia de zoonosis, bajo el lema «Un Mundo, Una Salud». En relación con ello hemos asistido en los últimos años, con cierta regularidad, a la emergencia de enfermedades infecciosas con potencial pandémico, la mayoría de las cuales, fueron zoonosis; de hecho, más del 61% de los patógenos humanos reconocidos, son de origen animal, cifra que todavía elevan algunos autores. En la actualidad, la interrelación de los dominios de Salud y los riesgos de las zoonosis demandan una interacción más transversal entre Sanidad Animal y Salud Pública, esta es la idea que se reclama desde 2003, cuando la detección, prevención y control de la gripe aviar se convirtió en una especie de cruzada de la que surgió el «Programa Mundial sobre Influenza Aviar», que estableció un precedente significativo para el control de las enfermedades emergentes. La iniciativa, que reconoce las interconexiones entre la salud humana, animal y ambiental puede definirse como una estrategia mundial para ampliar las colaboraciones y comunicaciones interdisciplinarias en todos los aspectos de la salud referidos al hombre, los animales y el ambiente.

La cuestión, sin embargo, no es nueva. Ya en la mitología griega el centauro Quirón, que conocía las artes de la curación, las aplicaba tanto al hombre como a los animales. Quirón fue un claro precedente

del médico y veterinario y por ello representa el símbolo de la unidad, pues actuó como médico, veterinario y naturalista y además compartió su sabiduría con sus discípulos Esculapio y Melampo. A lo largo de la Historia otros hitos relacionan las dos Medicinas, como la intervención de Giovanni Maria Lancisi, médico del Papa Clemente XI, que fue encargado de llevar a cabo un estudio sobre la peste bovina, o Rudolf Virchow, el primero en utilizar el término «zoonosis», quien afirmó que «entre la Medicina Humana y Animal, no deberían existir líneas divisorias». En 1964, Calvin Schwabe, reconocido como el fundador de la Epidemiología Veterinaria, acuñó el término «Una Medicina» para expresar la interrelación existente entre la salud humana y la animal y, finalmente, en 1975, la FAO, OIE y OMS firmaron un informe conjunto titulado «La contribución de la Veterinaria a la práctica de la Salud Pública» que estableció el concepto de Salud Pública Veterinaria, como un área de cooperación, sin duda el embrión de lo que, años más tarde, se convertiría en la plataforma para respuesta internacional frente a la peste aviar.

DESAFÍOS ACTUALES DE LA SANIDAD ANIMAL

El objetivo de la Sanidad Animal es, globalmente, la erradicación de las enfermedades infecciosas de los animales. Como lograr esto es, simplemente, una utopía, la Sanidad Animal se plantea también otras alternativas, compatibles con la idea final de lo posible. En cualquier caso, simplemente la dimensión del hecho supone ya un concepto limitante, condicionado por el alto número de variables que entran en juego. Dado que los retos que supone alcanzar el objetivo son numerosos, se exige de sus ejecutores preparación, conocimiento, medios tecnológicos, capacidad de trabajo e integración en equipo, una buena dosis de generosidad y entrega y, por encima de todo, una gran vocación.

El conocimiento de los agentes que causan las enfermedades infecciosas es imprescindible; solo cuando a finales de siglo XIX comenzó a descifrarse la existencia de microorganismos en su origen, pudo sentarse las bases sobre las que desarrollar después el diagnóstico y la lucha. En la actualidad, el desafío se mantiene para conocer con el mayor detalle posible todo lo que de forma directa o indirectamente se

relaciona con la enfermedad y la dinámica de su actuación. En cualquier caso, la enfermedad es una consecuencia de la compleja interacción entre un hospedador susceptible y un agente dotado de capacidad para establecerse en él y producirle daño. Por esta razón es preciso conocer en qué bases asientan la susceptibilidad o la resistencia a un patógeno, cómo puede mejorarse la segunda o disminuir la primera y de qué manera se desarrolla el proceso que, al final, justifica el cuadro clínico. En lo primero, uno de los desafíos de la Sanidad Animal tiene que ver con resolver el enigma que relaciona los patógenos con sus hospedadores. ¿qué hace que los agentes patógenos sean tan diferentes en lo que a disponibilidad de hospedadores se refiere?, ¿qué diferencias definen un patógeno de hospedador único, de otro múltiple? ¿existen razones de ventaja evolutiva en alguno de los casos? ¿qué razones justifican la resistencia? ¿la resistencia es una condición estable o inestable? Como se ve, son muchas las preguntas y escasas las respuestas.

Otro de los desafíos de la Sanidad Animal se relaciona con el desarrollo de la epidemiología y la aplicación de su método en la vigilancia y el control. A los inconvenientes que supone el comercio internacional, los viajes o los mercados, como elementos facilitadores de la transmisión, se añade ahora el cambio climático, que está cambiando los patrones epidemiológicos tradicionales de muchas enfermedades. El desarrollo de sistemas de vigilancia apoyados en marcadores centinelas, por ejemplo, debe anticipar la presencia de la enfermedad, antes de la aparición de un foco.

La Sanidad Animal debe incorporar los instrumentos y métodos que ponen a su disposición las nuevas tecnologías, para llevar a cabo sus fines. El diagnóstico, que es el primer paso que denuncia la enfermedad, debe ser rápido y certero y, en la medida de lo posible, integrar la mayor información para asegurar el dictamen. Un retraso puede suponer un desastre incontrolable, pero también un diagnóstico equivocado y la adopción de medidas que no se correspondan con la causa, conduce a idéntico resultado. El laboratorio es insustituible, porque su capacidad de acierto se basa en datos objetivos, que deben ser interpretados correctamente. El desafío de la Sanidad Animal es el desarrollo de métodos sensibles, específicos, rápidos y adaptables, capaces de llevar a cabo, con rigor y certeza, el mayor número de estudios en el menor tiempo

posible. Las técnicas moleculares, son la respuesta de mayor autoridad en la actualidad, sin despreciar otros métodos.

Por último, diagnosticado un proceso, se impone su control y eliminación y en lo sucesivo, su prevención; este es, también, un campo crítico para la Sanidad Animal. La Vacunología se ocupa del diseño, estudio y producción de vacunas y nació en relación directa con la Sanidad Animal y con ella continua. Las vacunas contra la rabia, el carbunco, el cólera aviar o el mal rojo porcino, dan testimonio de ello, igual que las vacunas inactivadas, los toxoides o los adyuvantes. Estos y otro sinfín de aportaciones más, han puesto en manos de la Ciencia Médica y Veterinaria un instrumento decisivo en la lucha contra las enfermedades infecciosas. La prueba está que en la extinción de la viruela (oficialmente el 9 de diciembre de 1979) y la peste bovina (2011), las dos únicas enfermedades en los que se ha logrado tal propósito, el uso de vacunas fue decisivo.

Nuevos métodos de atenuación mediante técnicas de ingeniería genética para la obtención de vacunas más eficaces y seguras, el diseño de vacunas marcadas, vacunas de subunidades, recombinantes o vacunas de ácidos nucleicos y el desarrollo de nuevos adyuvantes, constituyen alguno de los retos más significativos de la Sanidad Animal actualmente.

En el campo de la sueroterapia, un recurso de gran tradición en Sanidad Animal, las novedades surgieron también progresivamente, desde la purificación de inmunoglobulinas y el descubrimiento de los anticuerpos monoclonales, a lo que se ha sumado en la actualidad la posibilidad de producir anticuerpos recombinantes y aptámeros.

RESPUESTAS

Las posibilidades de control y erradicación están condicionadas al diagnóstico y la lucha. Entre las herramientas al alcance de la Sanidad Animal para lograr este propósito, el recurso principal depende hoy de la Biotecnología. De hecho, ahora mismo es ya difícil entender el presente y mucho menos el futuro de la Sanidad Animal, incluso de la Ciencia Veterinaria, sin su concurso.

El término «Biotecnología» fue utilizado por primera vez en 1919, aunque su desarrollo se produjo cuando se incorporaron al trabajo técnicas del ADN recombinante. La Ingeniería Genética hizo de la Biotecnología una ciencia principal desde el punto de vista científico permitiendo una nueva Revolución Biológica. En esencia supone el uso de sistemas biológicos y organismos vivos o derivados para la creación o modificación de productos o procesos. Se apoya en métodos y técnicas derivadas de la biología y genética molecular y celular, microbiología, parasitología, inmunología, bioquímica o epidemiología, que pueden ser utilizadas donde quiera que se utilicen microbios o células.

La Sanidad Animal posee un enorme atractivo para el desarrollo y aplicación de los recursos generados por la Biotecnología, que a través de la Genómica, Proteómica, Transcriptómica y Bioinformática ha propiciado un impulso tecnológico determinante en la investigación. Según la Asociación Española de Bioempresas este sector integró en 2009 a 1.095 empresas con actividades en Biotecnología, con una plantilla que llegó a 150.000 empleados y una cifra de negocios de 53.000 millones de euros. Dominan las empresas del sector alimentario (42%) seguidas de las aplicaciones en salud humana (38%) y en tercer lugar se sitúa el grupo de empresas con actividad en Sanidad Animal, junto con otras.

La OCDE ha definido la Biotecnología como «la aplicación de los principios científicos y de la ingeniería, al procesamiento de materiales por agentes biológicos, para proveer bienes y servicios». En España, la Biotecnología es considerada prioridad estratégica en el actual Plan Nacional de I+D+i en el que se define como «uno de los factores clave de la revolución de la economía basada en el conocimiento, que condiciona el éxito de cualquier estrategia que se proponga mejorar la salud de los ciudadanos, la mejora de la producción agraria, la alimentación o las tecnologías de la producción, entre otras.

I. DIAGNÓSTICO

Los avances tecnológicos que han permitido el desarrollo del diagnóstico, son numerosos. Después de que en 1944 se demostrara que el ADN era el material genético y en 1953 la estructura de la doble

hélice, en 1960 se descubrió la enzima polimerasa, que define el sitio de comienzo de la síntesis del ADN. A partir de aquí, los acontecimientos se sucedieron vertiginosamente, hasta la secuenciación del genoma de la primera bacteria en 1997 y del genoma humano en 2001.

El descubrimiento de la renaturalización del ADN, en 1961, después de su desnaturalización por calentamiento, es el origen de las técnicas de hibridación. La utilización de enzimas que cortan el ADN en secuencias palindrómicas específicas, que en la naturaleza protege a las bacterias de infecciones por fagos, permitió obtener y estudiar fragmentos de ADN, lo que unido al descubrimiento de enzimas capaces de unir fragmentos separados, condujo a estudios de recombinación *in vitro* y dio origen a la Tecnología del ADN recombinante, es decir, a la Ingeniería Genética o lo que es lo mismo, a la Biotecnología Moderna.

1. Diagnóstico molecular

Con carácter general la detección de material genético de un microorganismo en muestras clínicas, indica su presencia en el momento de obtenerlas, pero no puede asegurar que el microorganismo en cuestión estuviera activo. La detección de ARNm, si que indica, sin embargo, que el microorganismo de procedencia, esta metabólicamente activo. En cualquier caso la detección molecular permite identificar una infección de forma directa, sin cultivo, lo que supone siempre una gran ventaja y evita riesgos.

Las técnicas modernas de detección del ADN, base del diagnóstico molecular, se fundamentan en descubrimientos realizados en los últimos 30 años. Sobre la hibridación, que permite organizar una doble hélice estable en combinaciones de ADN, ARN o mixtas, varios desarrollos mediante electroforesis condujeron a los métodos Southern, Northern y Westernblot y en 1985 a la descripción de la reacción en cadena de la polimerasa, realizada por Mullis, una metodología que permite detectar cantidades mínimas de ADN o de ARN en muestras de cualquier origen. En el diagnóstico la PCR permite la detección de tan solo 10 ó 50 copias de ADN problema en una muestra y ello sin condiciones especiales de mantenimiento. Entre las numerosas variaciones

disponibles en la actualidad, la PCR en tiempo real o PCR cuantitativa es posiblemente la opción de mayor rendimiento. También se considera la metodología más moderna para el estudio de la expresión génica (junto a los «microarrays») proporcionando una medida del nivel de transcripción correspondiente a la secuencia de los «primers» utilizados.

Un «microarray» es un dispositivo basado en la hibridación molecular, que consiste en series de matrices ordenadas espacialmente, con ligandos inmovilizados en puntos concretos o en una matriz sólida. La miniaturización permite el anclaje, en unos pocos centímetros, de cientos o miles de «spots» de oligonucleótidos, alineados en filas y columnas, cada uno de los cuales se corresponde con una secuencia específica. De ordinario se utilizan entre 5.000 y 8.000 sondas, aunque se pueden alcanzar 20.000 y hasta 60.000 en un único soporte. Aunque habitualmente se asocian al estudio del ADN, también se puede aplicar el estudio de proteínas o carbohidratos y constituye una auténtica revolución; su importancia en el diagnóstico, se prevé tan importante como lo es ahora la PCR. En la práctica permite estudiar la mutación de un gen, la presencia de genes de virulencia o su expresión y llevar a cabo el genotipado y secuenciación de genes, en agentes patógenos. Las potencialidades en Sanidad Animal son enormes y en función de la gran cantidad de información disponible, procedente sobre todo, de experimentos científicos, se está generando un nuevo tipo de «software» analítico muy útil. Su uso se adapta, por ejemplo, a la investigación de enfermedades de etiología desconocida, de enfermedades en las que puede estar presente más de un patógeno y cuando se precisa la subtipificación.

En el estudio de proteínas la electroforesis bidimensional y la espectrometría de masas son los métodos de mayor aceptación. La electroforesis bidimensional permite separar mezclas complejas de proteínas informando sobre el estado de la enfermedad, los efectos de una terapia determinada o la presencia de mutaciones; la tecnología DIGE (electroforesis diferencial en gel) es actualmente la más eficaz por su fiabilidad estadística al estudiar muestras del mismo gel utilizando réplicas biológicas y fluoróforos que le proporcionan gran sensibilidad y rango lineal. La espectrometría de masas es una técnica analítica que identifica moléculas de forma rápida, fiable y con alto rendimiento; permite conocer las proteínas codificadas por un genoma y obtener

«huellas peptídicas digitales» o tandem MS, con las que se identifica una molécula exacta por comparación con las generadas teóricamente a partir de bases de datos; también puede utilizarse para identificar secuencias de ADN permitiendo un análisis rápido y automatizado de productos de PCR. Hace uso de un espectrofotómetro tipo MALDI-TOF/TOF, que utiliza una técnica de desorción/ionización láser asistida por matriz y un detector de iones.

Dos desarrollos de gran interés diagnóstico en Sanidad Animal, están representados por los biosensores y los bioindicadores bioluminiscentes. Los primeros son un dispositivo de análisis que convierte una señal biológica en eléctrica para lo que utiliza un bioreceptor formado moléculas de reconocimiento (anticuerpos, enzimas, ácidos nucleicos o componentes celulares), que responden a procesos biocatalíticos, inmunológicos y genómicos que constituyen el biomarcador (esto es, la sustancia o señal que se detecta). Los biosensores representan un campo con una tasa de expansión impresionante, estimada en más del 60% anual, en su mayoría dependiente de la industria de la salud humana (en la diabetes, los biosensores de glucosa), aunque puede aplicarse a la vigilancia de alimentos, del medio ambiente o Sanidad Animal. En la actualidad, algunas compañías intentan ya comercializar esta tecnología en el campo veterinario, incluyendo biosensores para la detección de *E. coli* 0157:H7 y otros. El inconveniente es su coste.

Los CIBBS (bioindicadores bioluminiscentes) son dispositivos que utilizan «chips» diseñados para recoger señales emitidas por bacterias modificadas por manipulación genética, que emiten luz en presencia de contaminantes. La enzima que cataliza la reacción luminiscente es una luciferasa, una enzima aislada de bacterias u hongos. Los genes responsables constituyen bioindicadores («bioreporters») de tal modo que ante un producto químico o un agente biológico dispuesto en su ambiente, responden emitiendo luz. En el sistema de la luciferasa los genes de la reacción bioluminiscente se utilizan en la construcción de («bioreporters») que emiten luz verdosa y se han incorporado en diversos («arrays») en sistemas de seguimiento de infecciones por agentes patógenos en ratón, por ejemplo, de *S. Typhimurium*. Además se incluye también el sistema Aequorin y el de la proteína verde fluorescente, estos

últimos basados en una fotoproteína de la medusa *Aequorea victoria*, utilizada en la detección de bacterias patógenas y virus.

La Nanotecnología representa la ciencia de los sistemas a escala nanométrica. Las aplicaciones ya comenzaron a comienzos de los 2000 y no han dejado de crecer. En Sanidad Animal se han propuesto varios tipos de aplicaciones en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, mediante la inoculación de «puntos cuánticos», nanocristales que pueden unirse a proteínas presentes en la superficie de las bacterias patógenas y que cuando se excitan con luz ultravioleta emiten colores que revelan su presencia.

2. Diagnóstico basado en el estudio de la respuesta inmune

La aplicación de la respuesta inmune al diagnóstico de individuos enfermos se inició a finales del siglo XIX, con la reacción de Wasserman para el diagnóstico de la sífilis. Tal vez el desarrollo de mayor interés en los últimos años esté representado por la prueba ELISA, descrita en 1971 por Engvall y Perlmann, que puede definirse como una reacción inmuno-enzimática, en la que un antígeno se fija a una superficie y sobre él se aplica un anticuerpo conocido, ligado a una enzima. Si el anticuerpo se corresponde con el antígeno, la enzima permanece en el soporte y al añadir su sustrato produce color, que se mide. Posee numerosas aplicaciones en el diagnóstico, la determinación de antígenos en alimentos (alérgenos, por ejemplo), en toxicología, etc. Existen numerosas variantes, tanto para detectar antígenos como anticuerpos y su eficacia depende de la disponibilidad de buenos reactivos.

Una variante denominada «inmuno-PCR», une al poder de amplificación de la PCR la versatilidad del ELISA permitiendo mejorar la capacidad de detección entre 100 y 10.000 veces. Los avances derivados de la nanotecnología están haciendo de esta técnica un método de elección para el diagnóstico, en particular allí donde se precisa un análisis ultrasensible de proteínas, antígenos, anticuerpos o citoquinas. Se ha propuesto como un método conveniente para la detección de bacterias y virus incultivables y en el caso de infecciones latentes, en el seguimiento de enfermedades autoinmunes y después de programas de vacunación, en el hombre. Se ha utilizado en infecciones por rota-

virus, norovirus, hantavirus, influenza, *S. aureus*, estreptococos, etc., y en priones, aunque en la mayor parte de los casos, experimentalmente. Es una técnica de grandes perspectivas en la que todavía se necesitan más estudios para profundizar en su conocimiento. En relación con la Sanidad Animal apenas se han publicado datos, aunque tendría interés en enfermedades producidas por agentes de difícil cultivo o incultivables y en la identificación de reservorios, en especial en zoonosis.

Por último, en lo que a diagnóstico se refiere, la citometría de flujo mide las características de dispersión de la luz y la fluorescencia, después de hacer pasar una fuente luminosa sobre una suspensión celular. Está considerada en la actualidad uno de los métodos de análisis celular más relevantes. En infecciones, mide las características físicas y químicas de bacterias en suspensión en microsegundos, permitiendo obtener información sobre la pureza de una población en pocos minutos. Se aplica en estudios de patogénesis, analizando parámetros que se influyen en la infección o en la respuesta, particularmente en subpoblaciones de linfocitos. En Sanidad Animal, las descripciones son todavía escasas, por ejemplo, se ha aplicado a la detección de micoplasmas en leche, en estudios de patogénesis (*M. gallisepticum*, *B. melitensis* y *B. ovis*), en infecciones latentes por *Chlamydophila pecorum* y *Ch. abortus*, o de la respuesta a la vacunación (Glässer o tularemia). En infecciones por virus, se ha utilizado en infecciones por circovirus y en PRRS.

II. EXPRESIÓN GÉNICA Y PATOGÉNESIS

En el curso de la infección, los agentes patógenos deben lograr acceder, persistir y multiplicarse dentro del hospedador, para lo cual necesitan disponer de factores que rompe el equilibrio fisiológico de éste último, le producen daño y a ellos les permite evadir el sistema inmune y adquirir los nutrientes necesarios. La patogénesis busca comprender de qué forma interactúan los patógenos con sus hospedadores para causar enfermedad, conociendo qué genes se requieren y cómo cambia su expresión durante la infección.

Los estudios de genómica comparada entre cepas virulentas y no virulentas de la misma especie proporcionan una información valiosa

sobre los mecanismos de adquisición y evolución de la virulencia. Los «microarrays» de ADN han facilitado la identificación de determinantes de virulencia, genes de la susceptibilidad y los que se activan o se reprimen durante la infección. En estos estudios es crítica la disponibilidad de mutantes isogénicos y las correspondientes pruebas de virulencia. La PCR de análisis de genoma completo permite también analizar y comparar genes de cepas secuenciadas con los de otros aislados de la misma especie o de cepas estrechamente relacionadas.

La Transcriptómica estudia y compara el conjunto de genes que se están expresando en un momento dado y que constituyen el fenotipo molecular. A fin de obtener una perspectiva global de la expresión deben cuantificarse todos los transcritos simultáneamente, lo que requiere de un formato de ensayo que sea a la vez selectivo y sensible y que se pueda realizar por muestreo directo de secuencias de una fuente de poblaciones de ARN, de librerías de ADNc o mediante «microarrays». Los primeros estudios de expresión génica a gran escala implicaron el muestreo de secuencias marcadas de librerías de ADNc. En 1995 Veculescu *et al.*, propusieron una técnica de análisis seriado de la expresión génica que implica la generación de secuencias marcadas muy cortas (de 9 a 14 nucleótidos) denominadas «SAGE tags» (etiquetas de análisis seriado de expresión de genes) que se unen en largos concatámeros que primero se clonan y, después, se secuencian. En los últimos años han proliferado las aplicaciones del método en Sanidad Animal, por ejemplo, en el estudio del virus del PRRS sobre los macrófagos alveolares porcinos o en la infección por el virus de la diarrea vírica, sobre células endoteliales.

Para analizar las mezclas complejas de proteínas se puede utilizar la separación por electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida y la identificación por espectrometría de masas, incluyendo MALDI-TOF. También se puede utilizar una tecnología multidimensional que separa los péptidos por cromatografía líquida e identifica también por MALDI-TOF.

Algunos autores consideran que los «arrays» forman parte de la proteómica; en cualquier caso, se utilizan en ella para comparar niveles de transcritos y proteínas y para identificar las interacciones proteína-proteína. Los «arrays» de proteínas son mucho más complejos que los

«microarrays» de ácido nucleicos y pueden construirse inmovilizando las moléculas de prueba que incluyen anticuerpos, péptidos o aptámeros. Su uso para analizar las bacterias patógenas promete avances muy importantes, pero todavía no existe ningún ejemplo de un análisis global de expresión de la proteína de un patógeno en crecimiento en su hospedador natural o en un modelo. Los «microarrays» han revolucionado el análisis de la expresión de genes de la totalidad del genoma de células y microorganismos y han abierto una vía del máximo interés para el estudio de la patogenia de las enfermedades. Este tipo de pruebas que permiten el análisis simultáneo de centenares o miles de marcadores en una única muestra, serán una exigencia en la atención de pacientes humanos o de animales de alto valor o en el caso de zoonosis emergentes, en las que tiene un interés extraordinario la identificación de biomarcadores. En cualquier caso será necesario un estándar global de estas tecnologías, dada su variabilidad.

III. EPIDEMIOLOGÍA

La transmisión de los agentes de enfermedades entre animales y su control, es una cuestión clave en la epidemiología, igual que lo es definir y prevenir los tipos de contacto que llevan a la primera transmisión. Para su estudio se impone el uso del método epidemiológico, asentado en bases científicas, evitando su uso indebido como barrera artificial al comercio. Las medidas sanitarias se apoyan en la vigilancia y el análisis de riesgo y en una y otro, la aportación de nuevas tecnologías, principalmente moleculares, sobre todos los elementos que concurren en la aparición de las enfermedades, es inexcusable. En la vigilancia, tanto la capacidad de detección como la disponibilidad de métodos capaces de diferenciar con rapidez y rigor entre aislados, es esencial. En los últimos años, los avances derivados del conocimiento del genoma microbiano, han proporcionado la base para el desarrollo del concepto de Epidemiología Molecular, que ha incorporado técnicas epigenéticas y ómicas, que permiten profundizar en la dinámica de las enfermedades. Por otra parte, el análisis filogenético de las secuencias genómicas amplificadas brinda información inédita sobre los agentes patógenos y su evolución, y resulta muy útil para llevar a cabo estudios de caracterización genotípica y epidemiología. La evidencia de que a

lo largo de la evolución se han producido intercambios genómicos por transferencia horizontal de genes, fragmentos e islas genómicas y de patogenicidad, está permitiendo redefinir el concepto actual del mundo microbiano, así como su clasificación y sistemática. La tipificación permite reconocer brotes, detectar fuentes de infección o reconocer cepas virulentas, siendo la base de la Vigilancia Epidemiológica; sobre sus resultados se adoptan decisiones, se modifican criterios o se suspenden medidas acordadas sobre datos poco sólidos.

En la actualidad se dispone de una amplia variedad de métodos para la detección, identificación y caracterización microbiana, basados en el estudio de marcadores genéticos, comparando la composición de los ácidos nucleicos de dos o más microorganismos de prueba, lo que permite reconocer la posible relación entre aislados y lo contrario, independientemente de su pertenencia a la misma especie, género o familia. Los métodos disponibles pueden incluir el análisis de plásmidos o de fragmentos de restricción y detección de secuencias específicas, macrorrestricción, amplificación de secuencias por PCR, secuenciación, el perfil de hibridación de múltiples secuencias, etc. Opciones como el estudio de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción o la electroforesis en gel, de campo pulsante, igual que la PCR y una gran variedad de métodos derivados, se utilizan con este propósito. En cualquier caso, la eficacia de un marcador molecular se relaciona con la tipabilidad, reproducibilidad, estabilidad y poder discriminatorio.

IV. VACUNAS

La vacunación ha sido durante muchos años un instrumento poderoso (a veces el único) en la lucha contra las enfermedades infecciosas. En Sanidad Animal ha representado un valiosísimo papel en el desarrollo de la ganadería moderna, permitiendo el control de enfermedades por bacterias y, sobre todo, por virus, sobre los que los antibióticos carecen de efecto. El campo de la vacunación frente a enfermedades parasitarias está, en la actualidad, en pleno auge, con un interés extraordinario, sobre todo en el caso de protozoos, pero también en otros grupos de parásitos. El mundo de los animales salvajes no es ajeno a estos éxitos

como lo prueba por ejemplo el caso de la vacunación de zorros frente a la rabia en Europa.

Las vacunas veterinarias suponen aproximadamente el 23% del mercado global de la industria de Sanidad Animal, con una tendencia creciente, debido a los nuevos avances tecnológicos, a la descripción de resistencias antibióticas y a la emergencia y reemergencia de enfermedades y a nuevos desarrollos en enfermedades crónicas y alergias. Aparte de la mejora en salud y productividad en los animales, las vacunas veterinarias poseen un impacto significativo en términos de Salud Pública, toda vez que su uso reduce el de fármacos y hormonas y el de los correspondientes residuos en la cadena alimentaria, aspecto este, de gran interés actual. Las vacunas también contribuyen al bienestar animal y su uso está favorecido por todas las organizaciones internacionales.

La primera innovación importante en la Vacunología moderna se inició con las vacunas recombinantes aplicando métodos moleculares para la obtención de antígenos, pero el conocimiento del genoma condujo a una segunda revolución. Así pues, desde esta perspectiva el genoma microbiano constituye un gran reservorio de genes que codifican para antígenos potenciales, que pueden ser seleccionados como candidatos vacunales. Descubrir los genes que se relacionan con factores de virulencia, es un proceso complejo al que han contribuido metodologías aportadas por la Genómica Funcional, como la tecnología IVET, mutagénesis marcada, secuenciación genómica y análisis *in silico*, «microarrays» de ADN y proteómica. La estrategia habitual cuando se investigan genes de virulencia, consiste en comparar las secuencias anotadas, con las presentes en bases de datos utilizando programas (como el BLAST, por ejemplo), que identifican coincidencias con genes conocidos.

La Vacunología reversa parte de la base de que proteínas potencialmente expuestas en la superficie microbiana, pueden ser identificadas a partir del genoma, localizando genes que puedan codificar proteínas de interés, potenciales candidatos vacunales, mediante un análisis predictivo, que informa acerca de si la proteína expresada es una proteína de membrana o proteína secretada. Finalizada la selección de los genes candidatos, se procede a su amplificación, se clonan, expresan y purifican como proteínas recombinantes, mediante alguno de los vectores

habituales, que serán utilizados en la inmunización en modelos, evaluando finalmente su capacidad de inducir una respuesta inmune protectora en el hospedador natural. En enfermedades víricas, principalmente en virus ARN, la vacunología reversa ha permitido introducir mutaciones marcadas, inserciones y deleciones en el genoma, logrando la atenuación del virus. La vacunología reversa se utilizó, por ejemplo, para la obtención de un virus influenza aviar H5N3, que induce protección completa frente al H5N1, igual que en vacunas frente a la fiebre aftosa, peste porcina clásica o enfermedad de Newcastle y, más recientemente, en lengua azul.

Una vacuna de subunidades puede definirse como la formulada a base de subunidades antigénicas, en la que pueden estar incluidas moléculas como lipopolisacáridos, proteínas, polisacáridos, mezclas de polisacáridos y proteínas, fracciones, toxoides, extractos ribosómicos, etc., obtenidos por síntesis química o de preparados naturales o modificados, y purificados o semipurificados. Representan la primera innovación importante en el campo de la Vacunología. En Sanidad Animal, un ejemplo clásico es la vacuna frente a *E. coli* K99, en la diarrea de los terneros, basada en fimbrias, o más recientemente la vacuna frente al circovirus porcino tipo 2, que incluye una proteína expresada en baculovirus. Las subunidades vacunales son seguras y se basan en productos bien caracterizados, lo que supone ventajas, pero pueden ser caras de producir y requieren el uso de adyuvantes. La producción de las subunidades se puede llevar a cabo por metodología convencional o mediante tecnología de ADN recombinante; en cualquier caso la identificación de las proteínas o los epítomos protectores, es crítica, llevándose a cabo mediante genómica o proteómica, produciéndose así antígenos vacunales independientes o epítomos de fusión, antes incluso que el patógeno sea cultivado en el laboratorio. En la actualidad, la tecnología recombinante y las estrategias de subunidades, están revolucionando la Vacunología Veterinaria.

La introducción de las Vacunas de ADN es todavía reciente, pues hasta los años noventa no se comprobó que la inyección de secuencias de ADN en animales desencadenaba una respuesta inmune frente a la proteína codificada en ella. El descubrimiento incorporaba ventajas relativas a la seguridad, la posibilidad de vacunar frente a diferentes

antígenos en una sola inoculación, bajo costo e independencia de la cadena de frío. Estas vacunas se basan en el uso de plásmidos, que son capaces de inducir una respuesta inmune específica después de su inoculación en el animal. El plásmido incluye el gen que codifica para el antígeno de interés, bajo el control transcripcional de un promotor y una secuencia señal de poliadenilación, que proporciona estabilidad y aumenta la eficacia de la traducción. En la inmunización, el plásmido purificado es captado por los miocitos en los que persiste extracromosómicamente. Posteriormente los componentes del plásmido inician la transcripción y expresión de proteínas en el citoplasma, proporcionando la célula las modificaciones post-traduccionales necesarias para que el antígeno mantenga su estructura terciaria, resultando al final en la presentación al sistema inmune de una forma de la proteína conveniente para ser procesada. Las vacunas de ADN son fáciles de manipular, producir y purificar; también son muy estables, manteniendo su actividad largo tiempo. Recientemente se han llevado a cabo distintos desarrollos en animales de compañía, productores de alimentos y peces, además de programas para animales salvajes y en todos representan, cuanto menos, una alternativa de interés. Actualmente se trabaja en vacunas de ADN frente a la fiebre aftosa, Aujeszky, peste porcina clásica, rabia, moquillo, tuberculosis, brucelosis, necrosis hematopoyética infecciosa, encefalitis del Nilo occidental, etc.

Para resolver la baja inmunogenicidad y el desconocimiento de la concentración de la proteína expresada, se evalúan diferentes estrategias utilizando adyuvantes y optimizando el plásmido para incrementar la expresión génica, con promotores más potentes o incorporando elementos reguladores o potenciadores de la transcripción.

La capacidad para identificar y seleccionar determinados genes a partir de un patógeno cuando no se propone su atenuación, ha permitido el desarrollo de vacunas marcadas que combinadas con métodos de diagnóstico adecuados permiten diferenciar los animales vacunados de los infectados. Tales vacunas, denominadas DIVA y los métodos de diagnóstico correspondiente poseen un espléndido futuro y han sido desarrolladas frente a varios procesos como la rinotraqueitis infecciosa bovina, peste porcina, aftosa, arteritis vírica equina o gripe aviar. Frente a la enfermedad de Aujeszky, se produjo una de las primeras vacunas de

este tipo autorizadas por la UE, consistente en un virus atenuado (por delección del gen de la timidinaquinasa) en el que, además, se suprimió el gen de la glicoproteína E, que no resulta esencial para la replicación, pero que juega un papel importante en la difusión intercelular. Esta modificación se aprovechó para desarrollar una vacuna que permite diferenciar, animales vacunados de infectados, mediante una prueba ELISA de bloqueo de glicoproteína E.

V. ADYUVANTES

La inmunidad innata no solo se aplica en las barreras físicas, químicas y celulares, sino que está íntimamente relacionada con la inmunidad adaptativa. La respuesta innata conduce a una rápida explosión de citoquinas inflamatorias y a la activación de macrófagos y células dendríticas. Para diferenciar los agentes patógenos de la microbiota comensal y los componentes de células y tejidos propios, la inmunidad innata utiliza receptores que detectan moléculas de los patógenos, que incluyen los «patrones moleculares asociados al patógeno» y los asociados al daño. La incorporación de los primeros a las vacunas experimentales, induce una respuesta adaptativa fuerte y duradera. El mecanismo implicado se conoció cuando se identificaron algunos de los «receptores de reconocimiento de los patrones» que incluyen receptores no fagocíticos [como los receptores Toll-like (TLRs) y los NOD (dominios de oligomerización unidos a nucleótidos)] y fagocíticos (receptores de manosa y de β -glucano). Pudo concluirse así, que la activación del sistema de inmunidad innata condiciona el sitio inflamado para el comienzo de la respuesta adaptativa y todo el sistema de señalización implica un complejo de proteínas transmembrana que pueden considerarse potenciales dianas utilizables como adyuvantes.

El término «adyuvante» fue utilizado por primera vez por Ramón en 1926, para referir una sustancia que utilizada en combinación con un antígeno inducía una respuesta inmune mayor en los caballos inmunizados frente a la toxina diftérica. En los últimos años se han incorporado numerosas sustancias de origen natural o sintético, que tratan de responder a las necesidades impuestas por las nuevas corrientes de diseño de vacunas. Los adyuvantes representan hoy, también, un

importante punto de desafío de la Sanidad Animal y la Salud Pública, para obtener vacunas cada vez más eficaces y seguras.

Entre los adyuvantes clásicos se incluyen las sales de aluminio, emulsiones, liposomas y virosomas, mientras que en los modernos, se incluyen agonistas-TLR, saponinas y complejos inmunoestimulantes. Muchos de los ligandos naturales o sintéticos (esto es, agonistas) de la mayoría de los TLRs identificados hasta la fecha, son compuestos potencialmente utilizables como adyuvantes. El MPL (monofosforil lípido A) es un agonista del TLR-4 utilizado en vacunas humanas, que estimula la expresión de moléculas coestimuladoras y la liberación de citoquinas, mejorando cualitativa y cuantitativamente las respuestas humoral y celular. El poli I:C (ácido poliinosínico: ácido policitidílico) es un agonista del TLR-3 y ha sido utilizado con éxito en vacunas experimentales frente al virus de la gripe. El CpG (citosina-fosfato-guanina) del ADN, un agonista del TLR-9 induce TNF- α , IL-1,6 e IFN- α , γ y se está utilizando en vacunas experimentales frente a *S. Typhimurium*, *T. gondii* y *Leishmania major*. Las imidazoquinolinas, mimetizan el ligando natural de los TLR-7 y TLR-8 y aumentan la respuesta de células T con incremento de la actividad protectora. Aunque no hemos encontrado referencias del uso de agonistas de los TLR en vacunas destinadas a los animales, es justo señalar que la mayor parte de los estudios se están llevando a cabo en modelos animales.

Los adyuvantes más potentes para vacunas de mucosas son las toxinas colérica (CT) y la termolábil de *E. coli* (LT), que inducen respuestas de IgA-s e IgG en el suero, pero además, exaltan la respuesta de anticuerpos a nivel de mucosa y en el suero frente a otros antígenos co-administrados, lo que genera una respuesta de memoria de larga duración; dada su toxicidad se han manipulado genéticamente para reducirla. En los animales se han utilizado principalmente mutantes LT, con destino al cerdo, bovino, gatos y conejos, prácticamente en todos los casos por vía intranasal y con diferentes antígenos [*E. rhusiopathiae*, *B. bronchiseptica*, *E. coli* (intimina), proteínas de rotavirus, fimbrias de *E. coli*, proteínas del virus de la inmunodeficiencia felina o hemaglutinina del virus influenza, etc]. Mutantes de CT se han utilizado intranasalmente en el cerdo con antígenos fimbriales (F18) de *E. coli*. También permiten la vacunación epidérmica y la inmunización oral. Varias citoquinas y

quimioquinas como la IL-1, 5, 6, 12, 15, RANTES, linfotoxina y otras, han sido estudiadas para vacunas de ADN. En Sanidad Animal este uso se ha reducido hasta la fecha a la incorporación de IL-1 en vacunas frente a estreptococos para conejos.

COMENTARIOS FINALES

La Sanidad Animal mantiene en la actualidad, grandes compromisos con la ganadería, con las poblaciones de animales de compañía y salvajes y, por extensión con el ser humano. Proporcionando salud a los primeros, hace lo propio con el hombre, en particular cuando se refiere a las enfermedades compartidas, las zoonosis, pero no solo, pues muchos agentes de interés exclusivo por los animales repercuten indirectamente en Salud Pública al ser causa de pobreza, especialmente en países en desarrollo o subdesarrollados.

En los últimos cincuenta años, profundizar en el conocimiento de los agentes etiológicos de las enfermedades infecciosas, microorganismos y parásitos, ha sido un objetivo de atención preferente para la Sanidad Animal. Después de identificar las causas se profundizó en su conocimiento. Los últimos años han sido de un intenso trabajo por conocer los factores de virulencia y su base genética, que ha permitido descifrar muchas de las claves de la patogénesis de las infecciones, a la vez que ha posibilitado obtener información útil para el diagnóstico y para su vigilancia y control. A través de la Inmunología, Epidemiología y Patología, se ha conocido el comportamiento del hospedador afectado por un patógeno para el desarrollo de la respuesta innata y adquirida. Son tantos los conocimientos acumulados en estos últimos años que resulta muy difícil seleccionar los más destacados. Atención especial han recibido las enfermedades nuevas, emergentes y las reemergentes. Cuestiones como las que tienen que ver con la susceptibilidad y resistencia, el desarrollo de antimicrobianos y la generación de resistencias a estos últimos, el estudio de la respuesta inmune humoral y celular, nuevas vacunas y adyuvantes, etc., han sido objeto de gran atención e interés científico y práctico. Los avances producidos en las técnicas y métodos derivados de la Biología Molecular y la Biotecnología, han generado grandes desarrollos en multitud

de campos aplicados produciendo avances significativos en la lucha contra las enfermedades.

Mucho ha sido el camino recorrido y mucho más es el que queda por recorrer. Los desafíos planteados a la Sanidad Animal, que no solo afectan a los animales, sino también a su proyección humana, se están respondiendo con dignidad y solvencia y la Sanidad Animal es hoy una ciencia reconocida, con personalidad propia, en la que participan profesiones múltiples, pero en las que el veterinario ejerce el papel principal y de coordinación insustituible, y así debe ser. Para ello, las Facultades de Veterinaria, laboratorios de diagnóstico animal, centros de investigación públicos y privados e instituciones de todo tipo relacionadas con la actividad veterinaria, como la que nos ocupa, deben propiciar el ambiente adecuado para lograr el mejor dominio y formación en tecnologías derivadas de la Biotecnología, tarea en la que los centros docentes y sus cuadros directivos, poseen una responsabilidad particular. La Sanidad animal no solo debe perseverar en la línea marcada en los años recientes, sino que debe profundizar cada vez más en lograr esclarecer las claves de la enfermedad, desde todos los puntos de vista, con el fin de controlar su presentación y difusión y, sobre todo, anticiparse a ella mediante la disponibilidad de procedimientos capaces de asentar una vigilancia permanente.

HE DICHO.