

DESARROLLO NACIONAL

Llamas: diagnóstico eficaz del Rotavirus



Investigadores argentinos diseñaron un método innovador para detectar la principal causa de la diarrea neonatal, que afecta a niños menores de cinco años. Basado en nanoanticuerpos VHH, se presenta como una opción rápida y confiable, surgida de la articulación pública entre el INTA y el Instituto Malbrán.

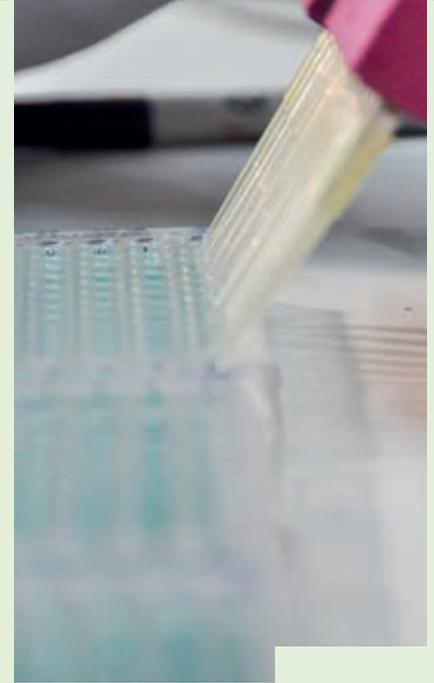
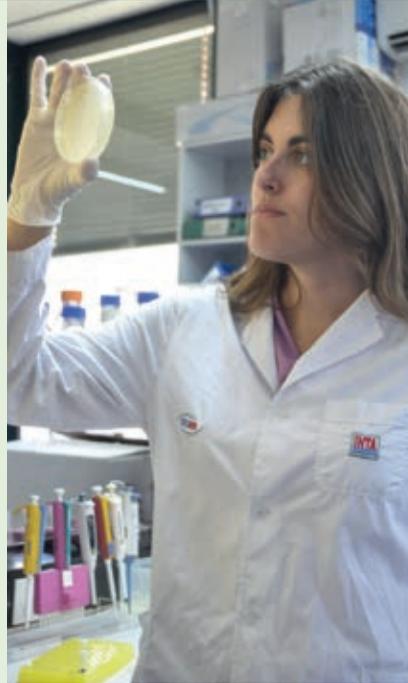
Por Camila Pía Gandía

Habitante ancestral del continente sudamericano, es un símbolo de la cultura andina y su sistema inmunológico abraza respuestas para la salud humana. La llama atesora en su genética proteínas grandiosas que permitieron, gracias al uso de técnicas en biología molecular, seleccionar **nanoanticuerpos** útiles para detectar y combatir la infección por Rotavirus (RV) en niños.

Con la propiedad de neutralizar al agente causal de la diarrea —en niños y en bovinos—, los nanoanticuerpos de esta especie de camélidos dieron lugar al desarrollo de Rotadial, el **primer kit de diagnóstico basado en la tecnología VHH**. El test es capaz de detectar el RV que afecta a los humanos y también a los animales. Celina Vega, investigadora de la plataforma

técnico-organizativa para el desarrollo de proyectos tecnológicos del INTA (INCUINTA), destacó que “no sólo reemplaza importaciones y pone en valor desarrollos del sector público, sino que complementa las políticas sanitarias vigentes en el Calendario Nacional de Vacunación”.

Las enfermedades diarreicas graves son la **segunda causa de muer-**



te entre los niños pequeños. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los Rotavirus son los agentes infecciosos más comunes. Por año afectan a 110 millones de infantes, de los cuales 2 millones requieren hospitalización y se calcula que las muertes por esta causa superan los **500.000 casos**. Si bien son tratables, el rápido diagnóstico tiene un rol estratégico para el manejo clínico del paciente pediátrico, su evolución satisfactoria y el control de brotes epidémicos.

Juan Stupka, referente de la Red Nacional de Vigilancia de Gastroenteritis Virales, aseguró que los decesos por RV “ocurren principalmente en países en desarrollo, debido a la dificultad en el acceso a los servicios de salud y representan el 10 por ciento de las muertes prevenibles en la infancia”. En tanto, “se estima que, en la Argentina, Rotavirus produce entre 80.000 y 100.000 consultas médicas por año y es responsable del **40 por ciento de las internaciones** por diarrea aguda en los menores de 5 años”, manifestó.

En cuanto a la detección, Vega explicó que, antes de este desarrollo, “se realizaba generalmente mediante el uso de **kits importados**”. Tratándose de productos originados en el mercado externo, su valor, disponibilidad y tiempos de espera para su compra

eran muchas veces factores limitantes. “Esto impactaba directamente en el **sub-diagnóstico** de los casos de diarrea aguda infantil”, expresó.

Rápido, confiable y a medida

Rotadial, el kit para el diagnóstico de RV A fue reconocido como caso líder en innovación en el mercado nacional e internacional.

Rotadial es un test ELISA –del inglés Enzyme-Linked Immunosorbent Assay– **que utiliza VHH**. De acuerdo con la investigadora, “este inmunoensayo se basa en la capacidad de esos nanoanticuerpos para reconocer RV A en muestras clínicas, **con 99 por ciento de especificidad y sensibilidad diagnósticas**”. Cuando lo identifican, se le unen con alta afinidad y “esta interacción se evidencia luego a través de una reacción colorimétrica, que puede ser detectada a simple vista y cuantificada a través de un lector de densidad óptica”, comentó.

En presencia del virus emite un color intenso característico, mientras que en su ausencia permanece incoloro. “El proceso **demora tan sólo dos horas**, desde que se toma la muestra hasta conocer el resultado de la misma, y es llevado a cabo a temperatura ambiente, lo que conduce a un diagnóstico rápido y confiable”, dijo.

En el diseño tuvieron en cuenta algunos **aspectos técnicos novedosos**. Como estos anticuerpos son muy resistentes, el kit se puede usar a temperatura ambiente, no necesita agitación ni calor y lectura visual directa. Además, generalmente estos dispositivos se comercializan con unas pipetas costosas que, en este caso, fueron reemplazadas con un sistema de go-teo que lo hace más económico y facilita su utilización. Estas características permiten que se realice en cualquier punto del país, de manera sencilla y que no requiera de un equipamiento específico.

“Ha sido validado contra paneles de muestras de referencia caracterizadas

ROTADIAL, EL KIT PARA EL DIAGNÓSTICO DE ROTAVIRUS A FUE RECONOCIDO COMO CASO LÍDER EN INNOVACIÓN EN EL MERCADO NACIONAL E INTERNACIONAL.

**“TRABAJAMOS CON EL IDEAL DE RESOLVER UNA PROBLEMÁTICA QUE AFECTA FUNDAMENTALMENTE A NIÑOS EN SITUACIÓN DE RIESGO”.
(CELINA VEGA).**

CARACTERÍSTICAS EXTRAORDINARIAS

En el año 2005, los especialistas del INTA iniciaron la línea de investigación en la tecnología VHH. Se trata de los fragmentos correspondientes a la porción variable de los anticuerpos de camélidos, que constituyen las moléculas más pequeñas existentes en la naturaleza, con la capacidad de reconocer a un agente infeccioso y neutralizarlo. Mientras los estudios realizados hasta este momento se centraban en atacar la parte externa del virus, los VHH obtenidos se unían a una proteína interna.

La capa superficial del virus, contra la cual suelen generarse las vacunas, cambia constantemente y de especie a especie. Por ejemplo, las cepas de Rotavirus A detectadas hasta el momento poseen 35 variantes en su capa externa, por lo que para lograr vacunas efectivas se desarrollan formulaciones multivalentes que inducen anticuerpos contra los serotipos más comunes que afectan a humanos. Estas vacunas son muy costosas y no incluyen algunos de los serotipos detectados en Sudamérica, África y Asia.

Por su pequeñez y capacidad de escabullirse, los VHH reconocen la parte interna del virus. A esta característica extraordinaria se suma que, a diferencia de otras moléculas –que expuestas a altas temperaturas o a cambios en el pH, suelen modificar su estructura–, los VHH mantienen sus propiedades funcionales en pH extremos y resisten altas temperaturas.

por el Instituto Malbrán, lo que garantiza su valor diagnóstico de las cepas de Rotavirus circulantes en nuestro país, algo que no puede decirse de los kits importados”, expresó Vega. La tecnología VHH usada en este ensayo demostró ser **capaz de reconocer con alta especificidad todas las cepas que se analizaron**, “lo cual es una característica diferencial única”, consideró.

Entre sus principales ventajas sobre los métodos que se utilizan actualmente, Stupka resaltó que “es un equipo nacional de alta calidad realizado con insumos innovadores que **permitiría el reemplazo de la importación**”. Teniendo certeza en la detección, también se disminuirían los costos de

tratamiento y el uso indebido de antibióticos, que no deben indicarse en caso de diarreas virales.

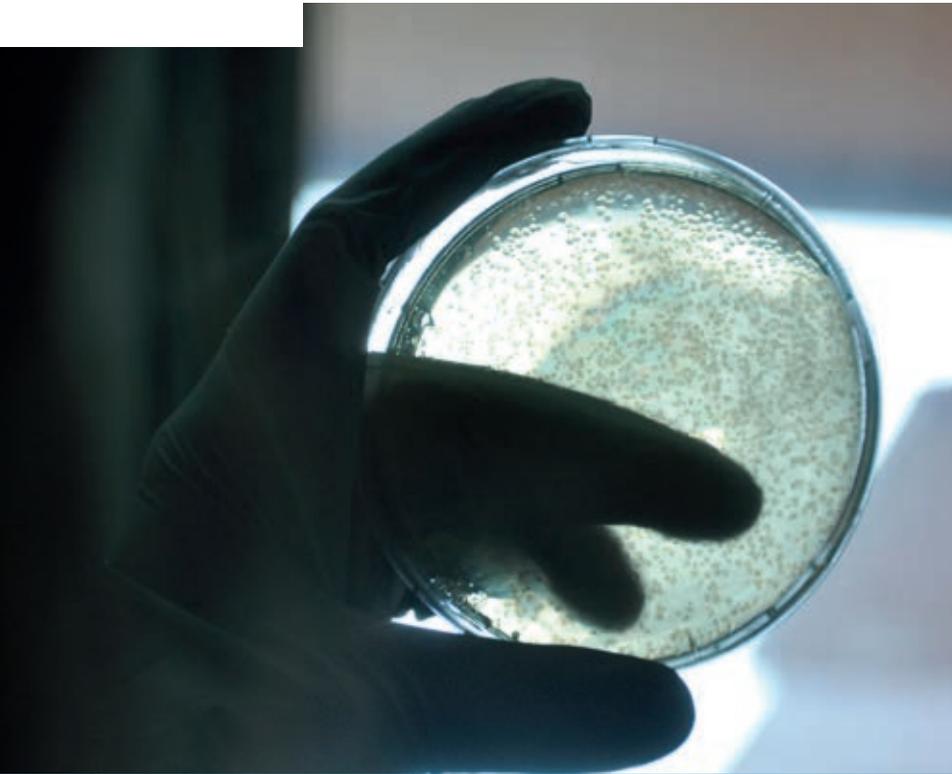
Además de diagnosticar la presencia del **agente infeccioso**, el test tiene la finalidad de consolidar el esfuerzo del Estado en la cobertura contra el RV, que fue incluida el 1º de enero de 2015 en el Calendario Nacional de Vacunación. En este sentido, contempla lo que sugiere la OMS: que cuando se aplican estrategias de vacunación masiva se cuente con un **plan de vigilancia complementario**.

Al respecto, Vega comentó: “Trabajamos con el ideal de resolver una problemática que afecta fundamentalmente a niños en situación de riesgo, donde el acceso a un rápido diagnósti-

co tendrá impacto directo en el manejo clínico satisfactorio del cuadro”.

Actualmente, existen en el mercado dos vacunas licenciadas para la prevención, compuestas por el virus atenuado, altamente eficaces para la reducción de la diarrea y la mortalidad. Sin embargo, presentan algunas limitaciones: por un lado, una vez que ocurre la infección, no hay tratamiento alguno; por el otro, en pacientes inmunocomprometidos su eficacia no está comprobada. Por lo tanto, “el rápido diagnóstico y manejo clínico del paciente pediátrico garantizan, no sólo la evolución satisfactoria del caso, sino también el control de brotes”, señaló.

Para Stupka, “resulta fundamental conocer la epidemiología y la carga



“ES UN EQUIPO NACIONAL DE ALTA CALIDAD REALIZADO CON INSUMOS INNOVADORES QUE PERMITIRÍA EL REEMPLAZO DE LA IMPORTACIÓN” (JUAN STUPKA).

de esta enfermedad para el diseño de estrategias e intervenciones en salud, con el propósito de prevenir y controlar las enfermedades que tienen un alto impacto en la población”.

En esa línea, explicó que el kit “no expresa cómo cambia el virus, pero al integrarlo a la vigilancia y mediante el envío de las cepas detectadas al Laboratorio Nacional de Referencia, permite este monitoreo o vigilancia molecular con un alto impacto a nivel país” y manifestó que “garantiza tener los medios para vigilar la circulación del virus y si la vacunación generó un impacto positivo en la salud”.

Como caso líder en el **mercado nacional e internacional** recibió el Premio Innovar 2016 en la categoría Producto Innovador y parte del reconocimiento fue también la distinción por la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI). Al respecto, Andrés Wigdorovitz, director de INCUINTA, sostuvo que es un reconocimiento a 10 años de estudio: “Hay mucho trabajo de investigación y la distinción es la visualización de un largo camino”.

Resultado de la vinculación

Este producto, totalmente **desarrollado en la Argentina**, fue realizado entre

dos instituciones públicas: el INTA y la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS). En el primer caso, por un equipo de investigadores del Instituto de Virología e INCUINTA del Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA). Por el otro lado, especialistas del Laboratorio de Gastroenteritis Virales del Instituto Malbrán.

El trabajo se inició, hace más de 10 años, cuando los investigadores del organismo tecnológico agropecuario trabajaban en un equipo de detección para la diarrea en vacas y, como resultado, obtuvieron el “primer nanoanticuerpo contra Rotavirus, mientras pensaban en el diagnóstico para terneros”, aseguró Wigdorovitz.

Esa herramienta, sumada a la demanda del Malbrán, dio lugar al desarrollo del **kit específico para salud humana**. “Fue realizada por un equipo de investigadores en una institución pública y contó con la participación de INCUINTA, donde se maduran los desarrollos”, destacó.

En la base del test de diagnóstico están los nanoanticuerpos VHH desarrollados por Lorena Garaicoechea, del Laboratorio de Virus Diarreico del INTA Castelar, en el contexto de su tesis doctoral y en colaboración con científicos del Laboratorio Europeo

de Biología Molecular (EMBL, por sus siglas en inglés). Por su capacidad innovadora, fueron patentados en más de 30 países, conjuntamente por el INTA y la empresa Algenex de España. **(Ver recuadro: Características extraordinarias)**

Viviana Parreño, responsable del Laboratorio de Virus Entéricos del Instituto de Virología y referente del proyecto INCUINTA, indicó que “tuvieron la novedosa propiedad de neutralizar a todos los Rotavirus, independientemente del serotipo y de la especie de origen”.

Para producirlos se inmuniza una llama y, cuando alcanza su máxima defensa contra el agente infeccioso, se le extrae sangre, se seleccionan los linfocitos circulantes y de allí el ARN –ácido ribonucleico– mensajero, que contiene los anticuerpos que elabora el camélido. Con el material se arma una biblioteca de genes que se emplea para seleccionar los VHH que están dirigidos contra la proteína o antígeno de interés, en este caso VP6 de Rotavirus.

“Al principio nos pareció que tenía mucho potencial, por lo que hacían en otros laboratorios del mundo, pero **jamás imaginamos que nosotros, desde Argentina, íbamos a llegar tan lejos**”, aseguró.

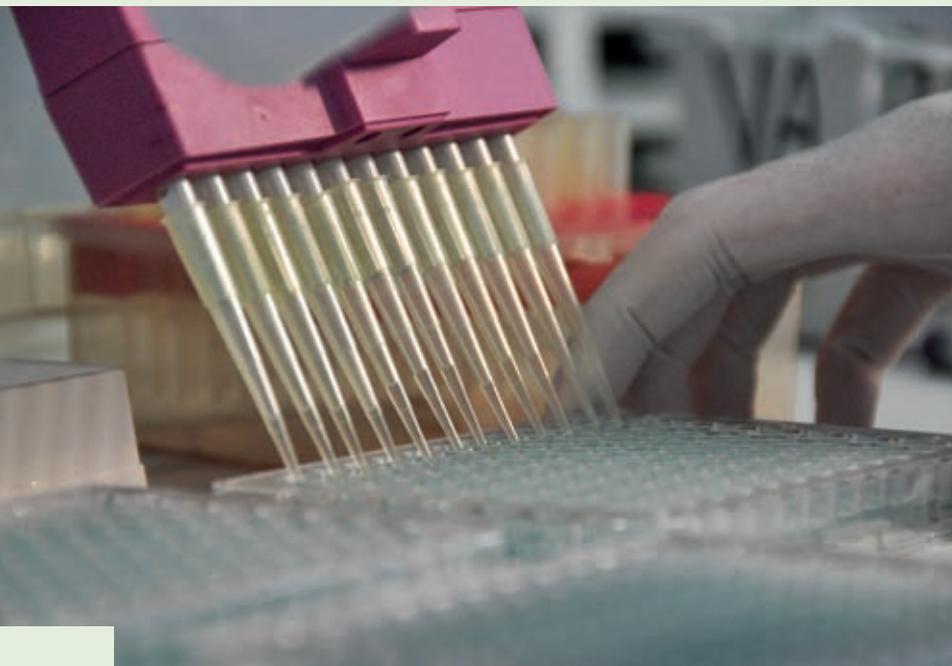
ESTE PRODUCTO, TOTALMENTE DESARROLLADO EN LA ARGENTINA, FUE REALIZADO ENTRE DOS INSTITUCIONES PÚBLICAS: EL INTA Y LA ANLIS.

RESGUARDO MUNDIAL

La complejidad de esta investigación radicó inicialmente en el hecho de transferir y desarrollar la tecnología VHH contra Rotavirus A. Posteriormente, el conocimiento de que los nanoanticuerpos generados y caracterizados presentaban cualidades únicas fomentó su protección mediante una patente.

Por otro lado, el resguardo del desarrollo por parte de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI), asegura al INTA la exclusividad sobre el mismo en más de 15 países donde la patente fue reivindicada.

El grupo de trabajo desarrolla nanoanticuerpos VHH contra otros patógenos de importancia. Al respecto, Parreño resaltó que “es una de las principales líneas de INCUINTA y promete dar origen a nuevas patentes y productos para la salud pública y sanidad animal”.



primer Elisa basado en nanoanticuerpos VHH para detectar Rotavirus A en humanos del mundo”.

Del estudio también participaron Marina Bok, Gustavo Asenzo, Matías Aduriz y Juan Degiuseppe. A partir de los resultados obtenidos, el grupo de investigación de INCUINTA siguió con el desarrollo de VHH contra otros agentes infecciosos: norovirus –agente causal de diarrea por alimentos en humanos de todas las edades–, influenza H1N1 y otros agentes virales de interés veterinario, como el de la diarrea viral bovina y de la arteritis viral equina. Además, desarrollan nanoanticuerpos contra anticuerpos IgG de humanos, bovinos, ratones, cobayos e IgY aviar.

En paralelo al kit, y en el marco de la investigación en VHH iniciada en el año 2005, el grupo dirigido por Parreño está desarrollando un alimento funcional y un biofármaco para prevenir y tratar las diarreas por Rotavirus A en el contexto de un proyecto FONARSEC con tres empresas nacionales.

Más información:

Viviana Parreño
parreno.viviana@inta.gov.ar
 Juan Stupka
jstupka@anlis.gov.ar

Para el financiamiento del desarrollo, pidieron un PICT Start Up al Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCYT) del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación. Con esa subvención sumada a 300.000 pesos destinados por el Ministerio de Salud de la Nación, el primer lote de reactivos

Rotadial –de 500.000 determinaciones– fue entregado a la ANLIS.

Al respecto, Parreño resaltó: “Si el desempeño del kit es óptimo es estos ensayos multicéntricos, de lo cual estamos convencidos, el siguiente paso será presentar el registro al ente regulador de la producción de estos equipos en salud humana –ANMAT– y sería el