434

INDEXED

Uso de anticuerpos monoclonales para el diagnóstico rápido de los virus respiratorios: memorándum de una reunión de la OMS[1]

La OMS ha preparado un estuche de diagnóstico con anticuerpos monoclonales (basado en la técnica de inmunofluorescencia) para detectar directamente los antígenos del virus sincitial respiratorio, los virus de la influenza A y B, los virus de la parainfluenza (tipos 1, 2 y 3) y los adenovirus. Durante 1990 y 1991, se invitó a 16 laboratorios de diferentes partes del mundo a ensayar el estuche en el medio clínico. En el presente memorándum se resumen los resultados obtenidos y las discusiones y recomendaciones de los participantes en una Reunión Consultiva para la Vigilancia Mundial de los Virus Respiratorios, celebrada por la OMS en Ginebra del 25 al 27 de marzo de 1992.

Los virus son causas reconocidas de infecciones de las vías respiratorias superiores e inferiores y revisten particular importancia en los lactantes y niños pequeños, a quienes pueden causar enfermedad grave y hasta la muerte. El buen tratamiento del paciente implica usar técnicas sencillas para la rápida identificación de los virus. Hoy en día también se trabaja en la preparación de vacunas capaces de prevenir las infecciones causadas por el virus sincitial respiratorio (VSR), el de mayor prevalencia, y se ha desplegado un esfuerzo similar por encontrar otra contra el virus de la parainfluenza tipo 3, que es la meta siguiente en importancia. La necesidad y eficacia de una vacuna exigen técnicas de vigilancia epidemiológica de amplio alcance y aplicables sin el respaldo completo de un laboratorio. La técnica de inmunofluorescencia (IF) llena esos requisitos, pero no se ha podido utilizar ampliamente por falta de reactivos que produzcan buenos resultados. La introducción de anticuerpos monoclonales ha subsanado esa deficiencia y en 1986 la OMS inició un proyecto para preparar un estuche de diagnóstico con anticuerpos monoclonales que sirviera para transferir la técnica de IF a los laboratorios de salud pública de todo el mundo. Con tal fin, la OMS comenzó a recolectar anticuerpos monoclonales experimentales que pudieran incluirse en un estu-

[1] Este memorándum se basa en el informe de la Reunión Consultiva para la Vigilancia Mundial de los Virus Respiratorios celebrada por la OMS en Ginebra del 25 al 27 de marzo de 1992. Participaron en la reunión los doctores M. Grandien, Laboratorio Nacional de Bacteriología, Estocolmo, Suecia; N. S. Khairullah, Universidad de Malaya, Kuala Lumpur, Malasia; y C. R. Madeley, Royal Victoria Infirmary, Newcastle upon Tyne, Inglaterra. *Secretaría de la OMS*: doctores P. H. Lambert y Y. Pervikov, División de Enfermedades Transmisibles (*Secretario*).

El presente artículo se publicó en su versión original en inglés en el *Bulletin of the World Health Organization*, Vol. 70, No. 6, 1992, con el título "Use of monoclonal antibodies for rapid diagnosis of respiratory viruses: memorandum from a WHO meeting". © Organización Mundial de la Salud.

Las solicitudes de separatas en inglés deben enviarse a Microbiology and Immunology Support Services, Division of Communicable Diseases, World Health Organization, 1211 Ginebra 27, Suiza. Separata No. 5333.

che para la detección directa de antígenos víricos en especímenes clínicos. Entre 1987 y 1988 se escogieron como reactivos potenciales entre un grupo preliminar más numeroso los anticuerpos contra el VSR, los virus de la influenza A y B, los de la parainfluenza (tipo 1, 2 y 3) y los adenovirus. Posteriormente estos fueron evaluados en ocho laboratorios europeos, estadounidenses y asiáticos con experiencia en el uso de técnicas de inmunofluorescencia. Los resultados fueron analizados por un grupo de trabajo previo y notificados en 1988.[2] Se sacó en conclusión que, comparados con los métodos de referencia, los reservorios de anticuerpos monoclonales tenían gran sensibilidad y especificidad para la detección de antígenos víricos en especímenes tomados de pacientes. En general, es lógico que se pierda un poco de sensibilidad con los reservorios de anticuerpos monoclonales, cuando se comparan con los antisueros policlonales de buena calidad, pero esa desventaja queda compensada por la fácil lectura de las preparaciones teñidas con anticuerpos monoclonales. Se evaluaron varios conjugados contra antígenos del ratón antes de incluir en el estuche uno de fabricación comercial.

Estudio actual

Después de la evaluación inicial, se invitó a ensayar el estuche en el medio clínico a varios laboratorios en el mundo que ya diagnosticaban de forma rutinaria las infecciones causadas por virus respiratorios. Estos laboratorios solían emplear antisueros policlonales de fabricación comercial (en ensayos de inmunofluorescencia o inmunoensayos enzimáticos) o la técnica de aislamiento en cultivos celulares. Durante 1990 y 1991, se les pidió que compararan el estuche, hasta donde fuera posible, con sus métodos estándares y se les proporcionó una guía para su uso.

Con objeto de tener informes directos sobre los resultados obtenidos con el estuche, la OPS/OMS organizó en mayo de 1991 en Montevideo, Uruguay, un taller para los laboratorios participantes de América del Sur.

Resultados

Participaron en el presente estudio 16 laboratorios de las seis regiones de la OMS (África, las Américas, el Sudeste de Asia, Europa, el Mediterráneo Oriental y el Pacífico Occidental).[3] En una evaluación preliminar, se analizaron en los laboratorios las diluciones estándares de los reactivos del estuche (los reservorios de anticuerpos monoclonales y el conjugado) empleando células de cultivo infectadas o especímenes clínicos. Dichas diluciones se aplicaron posteriormente a estos últimos. En el cuadro 1 se indican los resultados obtenidos, que son muy variables. En

[2] *WHO Informal Consultation on Monoclonal Antibodies for Respiratory Virus Diagnosis, 23–24 September 1988.* Documento inédito WHO-MIM-MAB-88.1.

[3] No. 1, Departamento de Patología, Hospital General de Singapur, Singapur (Investigador, Ling Ai Ee); No. 2, Departamento de Microbiología Médica, Universidad de Malaya, Kuala Lumpur, Malasia (Dr. N. Khairullah); No. 3, Departamento de Virología, Instituto Nacional de Salud, Departamento de Ciencias Médicas, Bangkok, Tailandia (P. Thatwatsupha); No. 4, Commonwealth Serum Laboratories, Victoria, Australia (R. Shaw); No. 5, Instituto Nacional de Virología, Consejo Indio de Investigaciones Médicas, Pune, India (B. L. Rao); No. 6, Hospital Nacional de Sendai, División de Investigación Clínica, Centro de Investigaciones sobre Virus, Sendai, Japón (Y. Numazaki); No. 7, Departamento de Microbiología, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina (M. Ávila); No. 8, Instituto Carlos Malbrán, Buenos Aires, Argentina (V. Savy); No. 9, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil (S. Takimoto); No. 10, Instituto Evandro Chagas, Belém, Brasil (W. Mello); No. 11, Instituto de Salud Pública, Sección Virología Clínica, Santiago, Chile (M. Vicente); No. 12, Laboratorio Central de Salud Pública, Montevideo, Uruguay (M. H. de Peluffo); No. 13, Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias, Madrid, España (P. P. Brena); No. 14, Laboratorio Central de Virología, Centro Médico Chaim Sheba, Tel-Hashomer, Israel (N. Varsano); No. 15, Central Pasteur del Camerún, Yaoundé, Camerún (D. Pignon); No. 16, Hospital Charles Nicolle, Túnez, Túnez (A. Slim).

CUADRO 1. Diluciones estándares de los reactivos empleadas por cada laboratorio en el estudio

Laboratorio No.[b]	Virus investigado[a]					
	VSR	Inf A	Inf B	Parainf	Adeno	Conjugado antirratón
1	5 000	1 000	10 000	1 000	1 250	150
2	40	40	40	40	40	40–80
3	10	10	10	10	10	5–10
4	NR[c]	200	200	NR	NR	40
5	25	25	25	NR	25	50
6	50	50	50	50	500	20
7	10	20	20	10	10	15[d]
8	80	500	500	80	100	80
9	1 000	40	300	200	100	10[e]
10	600	100	100	400	150	50
11	100	30	30	100	200	60–100
12	40	100	100	40	40	50
13	200	200	300	300	300	30[e]
14	20	20	20	20	20	15
Escala	10–5 000	10–1 000	10–10 000	10–1 000	10–1 250	15–150

[a] VSR = virus sincitial respiratorio; Inf A = virus de la influenza A; Inf B = virus de la influenza B; Parainf = virus de la parainfluenza; Adeno = adenovirus.
[b] Los laboratorios 15 y 16 presentaron datos muy limitados que se han incluido aquí.
[c] NR = No se realizó.
[d] Sin titular.
[e] Conjugado antirratón sigma.

comparación con los resultados notificados por el grupo de trabajo anterior,[4] algunas diluciones estándares fueron mayores o menores de lo previsto. Hasta cierto punto, eso podría indicar diferencias en la calidad de la microscopia por fluorescencia o de los materiales empleados, cuando fueron distintos de los del estuche. Una dilución menor podría dar reacciones inespecíficas indeseables y una mayor podría disminuir la sensibilidad. Las pruebas hechas con preparaciones de cultivos celulares muestran menos reacciones inespecíficas con el uso de colorantes que las efectuadas con especímenes clínicos. Por lo tanto, pueden dar diluciones óptimas excesivamente altas.

Algunos laboratorios, como el 15 y el 16, solamente pudieron realizar ensayos preliminares con pocas muestras. No obstante, determinaron que los reactivos eran satisfactorios. En el cuadro 2 se presentan los resultados comparativos obtenidos por los laboratorios restantes con los anticuerpos monoclonales. En la parte I del cuadro se comparan los resultados obtenidos con anticuerpos monoclonales o antisueros policlonales en ensayos de inmunofluorescencia o de otro tipo. Cada rubro tiene cuatro números, que corresponden a determinado virus y laboratorio. El primero y el cuarto representan el grado de concordancia entre los dos métodos y el segundo y el tercero, el grado de discordancia a favor de un reactivo u otro. Los resultados discordantes exigen una explicación. Es posible que los reactivos policlonales empleados por los laboratorios participantes se hayan fabricado comercialmente en animales o en el saco vitelino de óvulos fecundos. Algunos reactivos preparados de esa forma muestran reacciones inespecíficas y tienen poca sensibilidad.

[4] Véase la nota 2 en la página 216.

CUADRO 2. Comparación de los resultados de la inmunofluorescencia con los obtenidos al usar el estuche a base de anticuerpos monoclonales de la OMS en especímenes clínicos

Laboratorio No.	Virus investigado				
	VSR	Influenza A	Influenza B	Parainfluenza	Adenovirus
Parte I[a]					
2	12/0/0/88[b]	4/0/3/58	1/0/0/64	0/0/8/57	0/0/2/63
3	18/0/1/119	0/0/0/138	0/0/1/137	2/0/4/132	2/0/0/136
7	21/3/9/56	0/0/3/86	4/0/11/74	2/0/3/84	4/1/0/84
9	6/0/2/39	1/1/7/39	0/2/0/41	0/0/0/8	0/0/1/14
11	69/1/0/228	24/1/4/102	34/0/0/344	14/1/10/320	45/0/0/251
12	96/5/1/138	12/1/0/231	NR[c]	6/0/6/240	7/1/5/250
13	50/2?/2?/82[d]	NR	NR	7/0/0/129	2/0/0/134
	44/2?/6/84[e]	NR	NR	NR	NR
14	8/2/2/26[e]	NR	NR	NR	2/1/2/12
Parte II[f]					
1	0/0/0/1[g]	24/0/0/0	14/0/0/0	NR	NR
2	9/0/21/135	7/0/0/58	1/0/0/64	11/0/0/119	1/0/2/121
7	25/5/5/54	1/3/2/83	5/1/10/73	0/0/5/84	3/1/1/84
8	14/1/8/23	NR	NR	4/0/3/7	8/2/2/12
12	49/4/16/110	7/2/4/368	1/9/1/370	0/0/0/68	3/1/0/64
13	12/0/10/44	0/0/0/66	0/0/0/66	4/0/1/61	2/0/0/64
14	8/3/2/125	0/0/0/110	3/2/0/105	4/2/0/124	3/8/1/126

[a] La parte I muestra una comparación entre los resultados obtenidos con la técnica de inmunofluorescencia con anticuerpos policlonales, la prueba comercial de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales o la inmunoabsorción enzimática (ELISA).
[b] Las cuatro cifras representan el número de muestras clasificadas como P^+M^+, P^+M^-, P^-M^+ y P^-M^-, respectivamente (P = anticuerpos policlonales, M = anticuerpos monoclonales).
[c] NR = no se realizó.
[d] Otros anticuerpos monoclonales.
[e] ELISA.
[f] La parte II muestra una comparación de los resultados obtenidos mediante el aislamiento en cultivo celular.
[g] Las cuatro cifras representan el número de muestras clasificadas como C^+M^+, C^+M^-, C^-M^+ y C^-M^-, respectivamente (C = cultivo celular, M = anticuerpos monoclonales).

En la parte II del cuadro 2 se comparan los resultados obtenidos con los anticuerpos monoclonales de la OMS y con los productos aislados de cultivos celulares. Se registraron algunos resultados discordantes, que podrían obedecer a diversas razones. El grado de sensibilidad de los cultivos a determinados virus puede variar; los resultados de la inmunofluorescencia pueden seguir siendo positivos, aun si se emplean especímenes recolectados durante la fase tardía de la infección, que es cuando un anticuerpo de producción local puede inhibir la infectividad del virus; y la infectividad del espécimen puede haberse perdido de paso.

Los resultados presentados en ambas partes del cuadro 2 indican que se obtuvieron más resultados positivos con los anticuerpos monoclonales que con las otras técnicas. En la actualidad, no hay una explicación satisfactoria de las discrepancias observadas pero, con la mayoría de los especímenes, el estuche de anticuerpos monoclonales dio mejores resultados que las demás técnicas investigadas.

Durante el estudio, los anticuerpos monoclonales se aplicaron a un gran número de especímenes clínicos (cuadro 3). Las tasas de positividad fueron similares a las obtenidas en otros estudios, aunque fueron bajas las que corresponden a los virus de la parainfluenza y a los adenovirus.

CUADRO 3. Proporción de resultados positivos obtenidos con especímenes clínicos al usar el estuche a base de anticuerpos monoclonales de la OMS, por laboratorio y tipo de virus

Laboratorio No.	Virus investigado				
	VSR	Influenza A	Influenza B	Parainfluenza	Adenovirus
1	649/2086[a]	46/2167	11/2167	30/2127	24/2118
2	30/165	7/165	1/165	11/165	3/165
3	19/138	0/138	1/138	6/138	2/138
7	30/89	3/89	15/89	5/89	4/89
8	22/46	...	...	7/14	10/24
9	8/47	8/48	0/43	0/8	1/15
11	69/298	28/131	34/378	24/345	45/296
12	65/179	11/381	2/381	0/68	3/68
13	50/136	0/66	0/66	7/136	2/136
14	10/138	0/110	3/110	4/130	4/138
+[b]	6/130	34/130	0/130	10/130	4/130
++[b]	58/696	7/696	10/696	15/696	4/696
Total	1016/4148	144/4121	77/4363	119/4046	106/4013
% de positividad	24,5	3,5	1,8	2,9	2,6

[a] Número de resultados positivos/número de especímenes examinados.
[b] Los resultados se obtuvieron en 1991–1992 con el segundo lote del estuche de la OMS. + = Dr. J. Hang, Folkehelse, Oslo, Noruega; ++ = Dr. B. Marten, Instituto de Investigaciones Médicas, Goroka, Papua Nueva Guinea.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En general, los datos obtenidos hasta la fecha confirman las conclusiones de estudios previos, ya que revelan que el estuche contiene reactivos muy sensibles y específicos. Su uso es aceptable en laboratorios de diagnóstico con personal experto en la técnica de inmunofluorescencia. Además, cuando esta es a base de anticuerpos monoclonales, tiene la ventaja de proporcionar un medio de diagnóstico que se puede aplicar en instituciones donde no se hacen cultivos celulares u otros procedimientos.

Hay dos requisitos básicos para obtener resultados buenos y seguros con la prueba de inmunofluorescencia: la recolección y preparación de especímenes con suficientes células infectadas intactas y la capacidad del observador para distinguir entre las reacciones de inmunofluorescencia específicas de las células víricas y las de tipo inespecífico. Se prefiere la técnica de inmunofluorescencia a otros métodos porque provee información sobre la calidad de los especímenes; sin embargo, la pericia necesaria para reconocer la fluorescencia de origen vírico exige adiestramiento y experiencia. Esta habilidad se adquiere con mayor facilidad y rapidez si los resultados de la fluorescencia se confirman mediante otras técnicas, como el cultivo celular, aunque el estuche proporciona reactivos específicos más fáciles de leer que los antisueros comerciales de antes. Sin embargo, hacen falta medidas de control para garantizar la validez de los datos acopiados de ahora en adelante. Como parte de esas medidas, es necesario instar a los laboratorios participantes a enviar a los laboratorios de referencia, solicitando su confirmación, un duplicado representativo de las laminillas de material clínico sin teñir que hayan dado resultados positivos y negativos. Esta actividad debe ser supervisada por la OMS. La ventaja del método es que la técnica de inmunofluo-

rescencia descrita se puede poner en práctica y someter a control de calidad en laboratorios donde no se pueden hacer cultivos celulares u otros procedimientos.

Los resultados de este estudio son prometedores y en un futuro la técnica descrita se podrá extender a otros laboratorios; sin embargo, primero hay que investigar algunas de las variaciones observadas. Por ejemplo, aunque se usaron los mismos reactivos para un fin idéntico en todos los laboratorios, hubo una gama muy amplia de diluciones estándares. Las razones no están claras y deben analizarse más a fondo para lograr una mayor confiabilidad.

Recomendaciones

Los participantes en la consulta formularon las siguientes recomendaciones:

- Hay que garantizar el suministro continuo de los reactivos del estuche. Antes de ser despachados, los nuevos lotes deben someterse a un control de calidad en laboratorios de referencia con amplia experiencia. La OMS necesitará conservar partes alícuotas de lotes previos para fines de comparación.
- Con objeto de proporcionar datos epidemiológicos que faciliten la preparación de vacunas, se debe agregar al estuche un anticuerpo monoclonal específico contra el virus de la parainfluenza tipo 3.
- En el futuro, también será muy conveniente incluir un anticuerpo monoclonal específico antisarampionoso con miras a emplear el estuche de la forma más eficaz posible en zonas donde todavía es frecuente el sarampión.
- Conviene fomentar una mayor normalización de las técnicas. En el estuche debe darse una gama de diluciones recomendadas para cada reactivo, junto con información sobre la recolección, el transporte y la preparación de los especímenes. Siempre que sea posible, la prueba de epifluorescencia debe realizarse usando filtros de interferencia y el azul de Evans como medio de coloración de contraste. El espécimen preferido sigue siendo un depósito de células extraídas de las secreciones nasofaríngeas (aspirados).
- Debe comprobarse con regularidad la adecuación técnica del microscopio, y el conjugado empleado debe validarse continuamente con células de cultivo infectadas.
- Para promover el control de calidad, es preciso fomentar el intercambio de especímenes (láminillas preparadas, positivas y negativas) e información entre laboratorios. Estas preparaciones pueden teñirse o no y emplearse para fines de enseñanza y adiestramiento y para promover el control de calidad. Además, deberá enviarse periódicamente un duplicado de cada preparación a los laboratorios de referencia para asegurar la buena calidad del diagnóstico.
- Es preciso fomentar el adiestramiento continuado de todos los participantes. Esto es especialmente importante en laboratorios con poca experiencia en el uso de la prueba de inmunofluorescencia.
- Se debe instar a los trabajadores expertos en técnicas de inmunofluorescencia a visitar a sus colegas con menos experiencia para impartirles enseñanzas. Es preciso convocar grupos de discusión intrarregionales que coincidan con estas visitas.

Agradecimiento

El doctor A. Kendal (asignado actualmente a la Oficina Regional de la OMS para Europa en Copenhague, Dinamarca) fue elemento central del proyecto de la OMS para la preparación del estuche con anticuerpos monoclonales de 1987 a 1991, cuando trabajaba en los Centros para el Control de Enfermedades, Atlanta, Georgia, EUA.

ABSTRACT

USE OF MONOCLONAL ANTIBODIES FOR RAPID DIAGNOSIS OF RESPIRATORY VIRUSES: MEMORANDUM FROM A WHO MEETING

A monoclonal antibody diagnostic kit (using immunofluorescence) to detect directly viral antigens of respiratory syncytial virus, influenza virus A, influenza virus B, parainfluenza viruses (types 1, 2, and 3), and adenovirus has been developed by WHO. During 1990 and 1991 a total of 16 laboratories in different parts of the world were invited to test the kit in clinical use. This Memorandum summarizes the results obtained as well as the discussions and recommendations made by participants at a WHO Consultation on Global Surveillance of Respiratory Viruses, held in Geneva on 25–27 March 1992.

Corrección

En el artículo de Stüsser R, et al. "Riesgo de bajo peso al nacer en el Área Plaza de La Habana" (*Bol Of Sanit Panam.* 1993;114:229-241), deben introducirse las correcciones que se indican a continuación. En el resumen, el primer factor del perfil de riesgo multifactorial debe ser "riesgo de retraso del crecimiento intrauterino", en lugar de "retraso del crecimiento intrauterino". Todos los cuadros deben hacer referencia al Área Plaza de La Habana. En el cuadro 3, el factor de riesgo "orden de nacimiento" debe ser "índice de hacinamiento". En la página 234, primer párrafo, línea 10, donde dice "Los coeficientes de regresión", debe decir "Los coeficientes de regresión estandarizados". En el cuadro 5, el RR_a correspondiente a < 37 semanas de edad gestacional o no, debe ser 4,60, en lugar de -4,60. En la página 238, párrafo 3, línea 4, donde dice "de 2 555 embarazos no complicados", debe decir "de 2 555 embarazos sencillos o no múltiples". En la página 238, párrafo 6, tres últimas líneas, donde dice "o modelos log-lineales, para describir el perfil multifactorial de riesgo de estas enfermedades", debe decir, después de un punto y seguido, "Si el estudio se hubiera diseñado con los casos de RCIU y PP-T, es decir, con dos variables dependientes, se podría haber utilizado el análisis multivariante de la varianza". En las secciones de Resultados y Discusión (páginas 234-238), cuando se menciona el factor de riesgo "menos de 11 controles prenatales", debe tenerse en cuenta que de este grupo de controles prenatales se excluyeron las visitas realizadas sobre el terreno por los médicos y las enfermeras de familia.