

MÉTODOS NUEVOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE POLIOVIRUS: MEMORÁNDUM DE UNA REUNIÓN DE LA OMS¹

El diagnóstico de la poliomielitis mediante técnicas de laboratorio forma parte importante de la iniciativa de la OMS para la erradicación mundial de esta enfermedad. Durante el año pasado, se han desarrollado métodos nuevos de detección de poliovirus en muestras clínicas para diferenciación intratípica, análisis de la neurovirulencia de los poliovirus y detección de anticuerpos contra poliovirus. El progreso de las técnicas de laboratorio para detectar anticuerpos contra poliovirus y caracterizar los aislados ha estimulado la creación de métodos nuevos para el diagnóstico de poliovirus usando técnicas de laboratorio.

MÉTODOS NUEVOS DE DETECCIÓN DE POLIOVIRUS

A continuación se describen nuevos métodos de detección de poliovirus en muestras clínicas, con y sin el cultivo del virus.

Técnica de inmunofluorescencia indirecta

Se ha comprobado que se puede usar en condiciones sobre el terreno y con resultados confiables una técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para identificar y tipificar con rapidez aislados de poliovirus en cultivos celulares de muestras de heces. Si bien la técnica requiere la inoculación inicial de la muestra (o muestras) en un cultivo celular, se puede usar cuando se manifiesta el efecto citopatogénico (ECP), y se obtienen resultados en el lapso de unas horas. En consecuencia, es mucho más rápida que la prueba estándar de neutralización del virus. Tiene la ventaja adicional de que detecta con más facilidad y, en ciertos casos, con más sensibilidad la presencia de poliovirus en mezclas de estos o de poliovirus y enterovirus, y no es afectada por el fenómeno de "penetración" (*breakthrough*), que puede llevar a la identificación errónea de aislados cuando se usa la técnica de neutralización. Cuando se haya perfeccionado, probablemente se podrá usar la misma técnica para distinguir entre los aislados de poliovirus salvajes y los de poliovirus relacionados con la vacuna. Aunque no se ha estudiado cabalmente el empleo de la IFI para la detec-

¹ Publicado en el *Bulletin of the World Health Organization*, Vol. 70, No. 1, 1992, con el título "New approaches to poliovirus diagnosis using laboratory techniques: Memorandum from a WHO meeting". © Organización Mundial de la Salud, 1992.

Este memorándum se basa en el informe de una reunión de la OMS sobre Métodos Nuevos para el Diagnóstico de Poliovirus con Técnicas de Laboratorio, celebrada en Ginebra del 6 al 7 de junio de 1991. Participaron en la reunión: R. Crainic, París, Francia; D. Hazlett, Fajara, Gambia; T. Jacob John, Vellore, India; O. Kew, Atlanta, GA, Estados Unidos de América; H. Kopecka, París, Francia; S. Lemon (*Presidente*), Chapel Hill, NC, Estados Unidos de América; I. Levenbook, Bethesda, MD, Estados Unidos de América; A. van Loon, Bilthoven, Países Bajos; P. Minor, Potters Bars, Inglaterra; M. Pallansch, Atlanta, GA, Estados Unidos de América; V. Racaniello, Nueva York, Estados Unidos de América; R. Rüger, Penzberg, Alemania; Y. Svitkin, Moscú, Rusia; Zhang Li-Bi, Beijing, China, y K. Chumakov, Bethesda, MD, Estados Unidos de América. *Secretaría de la OMS*: Y. Ghendon (*Secretario*), V. Gratchev, D. Magrath, J. Milstein, S. Robertson y R. Scott

ción *directa* de poliovirus en muestras clínicas sin un paso de aislamiento en cultivo celular, tal vez sea posible hacerlo en algunos casos. Si bien en la actualidad la IFI requiere el empleo de sistemas de cultivo celular y un microscopio de inmunofluorescencia, el mismo instrumento y técnicas similares pueden usarse para identificar otros virus, como los vinculados con las infecciones respiratorias agudas. En síntesis, la técnica de IFI es un instrumento útil para la detección, determinación del tipo y, quizás, caracterización de poliovirus en muestras de heces y muestras del medio, sobre todo en las situaciones en las que la prevalencia de enterovirus endémicos distintos de los poliovirus es elevada.

Reacción en cadena de la polimerasa

Se ha usado la transcripción inversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) para la detección sensible y la identificación de poliovirus sobre la base de las características de la secuencia de nucleótidos de sus genomas ARN. La sensibilidad y la selectividad de la RCP simplificará el establecimiento de dos sistemas paralelos de vigilancia de la circulación de poliovirus. El primero se concentra en la caracterización de los virus asociados con casos de parálisis flácida aguda. El segundo estaría destinado a detectar la transmisión silente de poliovirus salvajes mediante el muestreo en la comunidad o el medio.

Se han diseñado pares de cebadores (*primer pairs*) que permiten identificar cada cepa de poliovirus de vacuna Sabin, usando la RCP, y sobre la base de las movilidades electroforéticas de los productos amplificados del ADNc (Sabin 1, 97 pares bases (pb); Sabin 2, 71 pb; Sabin 3, 53 pb). Se pueden detectar con rapidez las muestras que contienen mezclas de cepas de vacuna y determinar su composición mediante la RCP. Es posible detectar sin demora los virus presentes en 1 µl de líquido sobrenadante del cultivo celular infectado. Fue posible la detección directa y la identificación específica de los virus de las cepas de vacuna Sabin en aproximadamente 70% de las muestras de heces

analizadas. El perfeccionamiento de los métodos podría aumentar considerablemente la sensibilidad en muestras clínicas no procesadas.

También se han obtenido pares de cebadores de la RCP que permiten amplificar específicamente el genotipo de secuencias de poliovirus salvajes. La amplificación selectiva de las secuencias de poliovirus salvajes puede producirse en reacciones que contienen grandes excesos estequiométricos (de hasta 10^6 veces) del ARN derivado de cepas de vacuna Sabin.

Los estudios preliminares con muestras de aguas cloacales mostraron que las cepas derivadas de la vacuna Sabin que están generalmente presentes en las aguas negras podían ser detectadas con rapidez mediante la RCP. También se pudieron identificar pequeñas cantidades de poliovirus salvajes agregados a las muestras de aguas cloacales antes de su procesamiento. Las muestras cloacales obtenidas en zonas del Brasil, en las que dos años antes se habían producido los últimos casos asociados con poliovirus salvajes, dieron resultados negativos en la RCP usando cebadores específicos (*specific primers*) para los poliovirus salvajes antes autóctonos. En la actualidad, se evalúa la capacidad de la RCP de detectar la transmisión silente de poliovirus salvajes mediante el muestreo en zonas de Colombia en las que recientemente (1991) aparecieron casos asociados con esos poliovirus. Se someterán a las pruebas muestras de aguas cloacales y muestras combinadas de heces.

La RCP se usa ahora ordinariamente en la Región de las Américas para identificar aislados de cultivos celulares procedentes de presuntos casos de poliomiélitis. La clasificación de los aislados mediante la RCP ha concordado mucho con el análisis paralelo usando la hibridación con sondas y, en el caso de los virus salvajes, la determinación de secuencias genómicas parciales. Están bien establecidas las ventajas de la RCP (velocidad, especificidad y sensibilidad) cuando se trata de aislados clínicos. Es preciso evaluar

mejor la viabilidad de los métodos de RCP para detectar el virus en muestras clínicas originales o muestras del medio.

La RCP semianidada (*semi-nested*) usando tres cebadores diferentes ampliamente reactivos se ha empleado para buscar secuencias de enterovirus (poliovíricos) directamente en diversas muestras no procesadas (heces, aguas cloacales, aguas de superficie). Este método permitió detectar en la muestra original cantidades muy pequeñas de los virus representativos.

RCP con captura de antígeno (*antigen-capture*) (RCP/CA)

El método de la RCP/CA combina un método sencillo de inmutafinidad para purificar los virus presentes en muestras con la RCP tradicional para detectar virus con un grado muy alto de sensibilidad. La RCP/CA, originalmente creada para el virus de la hepatitis A (VHA), se realiza en tubos para RCP revestidos previamente con anticuerpos monoclonales específicos contra el virus. En esos tubos se incuban suspensiones fecales diluidas y después se lavan cuidadosamente para eliminar los materiales contaminantes no fijados presentes en la suspensión. Se agrega solución amortiguadora (de base) RTaq a los tubos, que luego se calientan brevemente a 95 °C para desnaturar los virus fijados y liberar el ARN vírico. Se realiza entonces en el mismo recipiente de reacción la síntesis de ADNc de primera cadena y la subsiguiente amplificación en la RCP del ácido nucleico vírico. La RCP/CA ofrece varias ventajas con respecto a la RCP tradicional, como la simplicidad técnica del procedimiento, el cual comporta menos manipulaciones de la muestra y, por lo tanto, menos riesgos de contaminación cruzada. El paso de captura del antígeno (*antigen-capture step*) da como resultado una purificación considerable de la muestra antes de la RCP. De este modo, antes de la RCP se eliminan eficazmente sustancias presentes en los extractos fecales o las muestras del medio que pueden tener un efecto inhibitor en las enzimas usadas en la RCP. La purificación de la muestra

previa a la RCP también enriquece el ácido nucleico ensayado derivado de los virus, lo cual reduce la frecuencia y la cantidad de productos estocásticos de la RCP que se originan en el cebado aleatorio (*random priming*) de ácidos nucleicos de moldes no víricos (*template acids*). Por último, la RCP/CA detecta con un grado relativamente alto de especificidad el ácido nucleico asociado con el antígeno. En el contexto de la detección y caracterización de poliovirus, el paso de captura de inmunodeficiencia incluido en la RCP/CA puede entonces ofrecer un segundo nivel de discriminación entre los serotipos víricos o, incluso, diferenciar en potencia las cepas de virus salvajes de las relacionadas con la vacuna. Si bien la sensibilidad de la RCP/CA es comparable a la de métodos técnicamente más complicados, en los que se aísla el ARN vírico con métodos tradicionales, es probable que se pueda intensificar la sensibilidad de la RCP/CA mediante el empleo de materiales alternativos para la captura en fase sólida (*solid-phase capture*). Por consiguiente, puede ser útil considerar la obtención de tubos de poliestireno para la RCP u otros soportes de fase sólida (por ejemplo, glóbulos) para sustituir los tubos de polipropileno usados en la actualidad.

En varios laboratorios se ha utilizado la RCP/CA para detectar el virus de la hepatitis A en muestras de heces humanas, pero hasta el momento se ha acumulado muy poca experiencia en cuanto a su aplicación en la detección de poliovirus. No obstante, en este contexto es atractivo considerar el método, porque podría permitir combinar instrumentos inmunológicos y de biología molecular existentes para detectar y caracterizar poliovirus. Además, el método es técnicamente sencillo, lo cual debe facilitar su transferencia futura a otros laboratorios.

Recomendaciones

1. La OMS debe apoyar los estudios colaborativos orientados a perfeccionar la tecnología de la RCP para detectar poliovirus en muestras clínicas y del medio. Esos

estudios han de incluir la aplicación de la RCP/CA para la detección de poliovirus. Una estrategia útil podría ser un procedimiento en dos pasos, en el cual se tamizarían primero todas las muestras para detectar la presencia de poliovirus mediante pruebas específicas para el tipo, usando anticuerpos de captura específicos para el tipo y cebadores de la RCP muy reactivos, capaces de detectar todos los poliovirus. Las muestras positivas en esta valoración se someterían a nuevas pruebas con un método de RCP, usando cebadores de oligonucleótidos específicos para el genotipo, capaces de diferenciar las cepas de poliovirus salvajes de las cepas de vacuna.

2. La OMS ha de apoyar los estudios colaborativos para determinar los métodos óptimos de transporte, recolección y procesamiento seguros de muestras del medio (aguas cloacales) o de la comunidad (muestras combinadas de heces de personas en alto riesgo), con el fin de detectar la transmisión silente de poliovirus salvajes.

3. Se recomienda que varios laboratorios evalúen más a fondo la técnica de IFI en diversas condiciones para determinar su aplicabilidad general.

NUEVOS MÉTODOS PARA LA DIFERENCIACIÓN INTRATÍPICA

El objetivo de la diferenciación intratípica de cepas de poliovirus es determinar si los aislados de muestras obtenidas en el terreno son virus derivados de la vacuna o virus salvajes. Esto es importante para la evaluación de pacientes paráliticos y para la vigilancia epidemiológica.

Se han desarrollado varios métodos para la diferenciación intratípica, que incluyen los que se describen a continuación.

Pruebas con anticuerpos policlonales

Se han desarrollado pruebas de neutralización o de inmunosorción ligada a la enzima (ELISA) que usan antisueros policlo-

nales absorbidos de forma cruzada. Mediante la absorción cruzada con la cepa heteróloga, se ha logrado que antisueros de conejo específicos para el tipo, producidos contra virus semejantes a los de la vacuna Sabin (SS) y virus salvajes (NSS), sean específicos para la cepa. Durante muchos años se han usado con éxito estos antisueros en una prueba de neutralización y en una ELISA para la diferenciación intratípica de cepas de poliovirus. El sistema de la ELISA indirecta en "sandwich" utiliza anticuerpos (bovinos) específicos para el tipo de poliovirus para la captura de virus, y sueros anticonejo marcados con peroxidasa de rábano (PR) para la detección de anticuerpos ligados, anti-SS o anti-NSS. Con cualquiera de los dos métodos se obtienen resultados bien definidos en aproximadamente 95% de los aislados. El empleo de un método bien establecido es una ventaja de la técnica; las pruebas son fáciles de realizar y se pueden obtener resultados dentro de las 24 horas cuando se usa la ELISA. Sin embargo, la producción de los antisueros plantea algunos problemas y es preciso efectuar muy cuidadosamente la absorción.

Grupos de anticuerpos monoclonales

Se han producido grupos de anticuerpos monoclonales para cada uno de los tres serotipos. El grupo para cada tipo incluye seis anticuerpos con distintos grados de especificidad para la cepa. En la actualidad se recomienda que se usen estos grupos en pruebas de neutralización basadas en mediciones del índice de neutralización, en las que se exponen cantidades variables de virus a una cantidad fija de anticuerpo. La identificación de cepas como semejantes a las de la vacuna Sabin o de tipo salvaje concuerda ampliamente con la obtenida mediante el empleo de sueros policlonales absorbidos. En la prueba se aplica un método bien establecido. Se han encontrado ciertas dificultades con respecto a la estabilidad, reconstitución y especificidad de estos anticuerpos monoclonales.

Hibridación con sondas

Se han construido plásmidos que generan ribosondas que permiten identificar poliovirus derivados de las cepas Sabin mediante la hibridación en soporte sólido [por ej., papel de nitrocelulosa o de filtro] (*blot hybridization*). Se han desarrollado dos ribosondas independientes para cepa Sabin, y una ribosonda de reacción amplia que detecta la presencia de ARN de poliovirus (o enterovirus) y proporciona una reacción control positiva. También se han elaborado varias ribosondas específicas para el genotipo, que permiten la identificación positiva de virus salvajes de secuencia conocida. El empleo de estas ribosondas requiere la amplificación previa del ARN vírico, ya sea mediante la propagación en cultivo celular o con una amplificación enzimática *in vitro* del ADNc antes de la hibridación en soporte sólido. No obstante, la tecnología de las sondas es de fácil aplicación cuando está adaptada a sistemas de detección no isotópicos sensibles.

Un problema operativo en las pruebas tradicionales con sondas es la necesidad de isótopos radiactivos. Las desventajas de estas sondas radiactivas son su breve vida media, los riesgos de radiación y los costos de eliminación de los desechos radiactivos. Se han creado métodos de marcaje no radiactivo de sensibilidades comparables a las de las sondas radiactivas (es decir, sensibilidades para valores menores de un picogramo sin la amplificación previa del ADNc). Por ejemplo, un sistema que aplica la digoxigenina como grupo de modificación en la secuencia de la sonda muestra un efecto de fondo extremadamente bajo en las pruebas de hibridación. Las sondas marcadas con digoxigenina son estables y reutilizables, y se pueden detectar mediante sistemas indicadores de colorimetría, luminiscencia o fluorescencia.

Se pueden aplicar las sondas marcadas no radiactivas a la hibridación en soporte sólido (Southern, Northern, *dot blot*), la hibridación en solución y la hibridación *in situ*. Se han desarrollado varios métodos enzimáticos y químicos para introducir grupos de modificación no radiactivos en los ácidos

nucleicos (polinucleótidos u oligonucleótidos, ARN o ADN). Se dispone de varios sistemas de detección. Las sondas no radiactivas se pueden preparar en laboratorios centrales y enviar a otros laboratorios de la red. Para las pruebas de soporte sólido (*blotting*), hibridación y detección solo es necesario un equipo técnico mínimo. La aplicación de sistemas de marcaje no radiactivo se puede combinar fácilmente con métodos de amplificación como la RCP, para mejorar la sensibilidad y la especificidad. En consecuencia, el empleo de métodos no radiactivos al marcar las sondas facilitará considerablemente la demostración de la tecnología de sondas en varios laboratorios.

Amplificación enzimática de genes *in vitro*

Como se describió anteriormente, la RCP se ha utilizado para la detección sensible de poliovirus derivados de cepas Sabin y de algunas cepas de poliovirus salvajes con genotipos bien conocidos. Se han diseñado pares de cebadores que permiten identificar cada tipo Sabin según las movi- lidades electroforéticas del producto amplificado. También se han preparado pares de cebadores para genotipos de poliovirus salvajes específicos, de tal modo que se pueden amplificar selectivamente sus secuencias en presencia de un exceso de genomas del virus de la vacuna. El método es relativamente fácil y da resultados en un día. No obstante, un problema importante de este método es el requisito de generar pares de cebadores nuevos y de validarlos para cada genotipo de tipo salvaje.

Polimorfismo de la longitud de segmentos de restricción (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP)

Utilizando ARN vírico extraído del sobrenadante de un cultivo celular, se efectúa la transcripción inversa del segmento

genómico del poliovirus y se amplifica mediante la RCP, como se describió anteriormente. El análisis del RFLP del ADN de doble cadena resultante se realiza mediante la digestión con endonucleasas específicas, seguida de la separación electroforética de fragmentos de ADN de longitudes diferentes. Se pueden entonces comparar con rapidez y con un alto grado de especificidad los patrones de RFLP obtenidos con segmentos genómicos equivalentes de distintas cepas víricas. La prueba del RFLP-1 examina una secuencia de 480 nucleótidos entre los residuos 2401 y 2880 (P1/Mahoney), una región que codifica la mitad N terminal de la proteína VP1 de la cápside, que incluye el sitio antigénico 1. Se usan cebadores genéricos (*generic primers*) capaces de amplificar en la RCP todas las cepas de poliovirus. Para el análisis del RFLP, se utilizan las endonucleasas HaeIII, DdeI y HpaII por su

capacidad de generar perfiles bien definidos de los fragmentos para las cepas representativas de poliovirus de secuencia conocida en la región genómica: P1/Mahoney, P2/Lansing, P3/Finland/23127/84 y las tres cepas de la vacuna Sabin. Estas últimas cepas y los virus relacionados se pueden identificar por sus perfiles de RFLP-1 específicos para las cepas Sabin (uno para cada serotipo), que son distintos de los perfiles de las cepas salvajes homotípicas.

En el cuadro 1 se sintetizan los requisitos técnicos, las ventajas y las desventajas de los diferentes métodos. Hay que señalar que, sobre todo en los países donde no existen casos de poliomielitis, se prefieren los métodos más decantados hacia la detección de cepas de virus salvajes.

CUADRO 1. Métodos para la diferenciación intratípica de poliovirus

Método	Requisitos técnicos	Ventajas	Desventajas
Antisueros policlonales de adsorción cruzada (neutralización, ELISA)	Instalaciones para el cultivo celular, equipo para la ELISA	Método estandarizado, fácil, rápido (ELISA)	Estandarización deficiente, resultados indeterminados en casi 5% de las cepas
Grupos de anticuerpos monoclonales (neutralización)	Instalaciones para el cultivo celular	Método estandarizado, resultados con interpretación bien definida	En la actualidad se usan grandes cantidades de anticuerpos monoclonales
Hibridación con sondas	Sondas marcadas, equipo para la hibridación	Sencillo, rápido, fácil de estandarizar, factible con sondas no radiactivas	Tal vez no se puedan resolver con rapidez las mezclas de tipos; requiere el aislamiento de los virus previo a la hibridación
Amplificación enzimática de genes <i>in vitro</i> (RCP)	Cebadores, equipo para la RCP, electroforesis	Es posible la amplificación específica para la cepa a partir de una sola muestra, rapidez, fácil interpretación, potencial de aplicación en muestras clínicas	Contaminación cruzada de las muestras; se requieren cebadores específicos para cada genotipo
Polimorfismo de la longitud de segmentos por la restricción	Cebadores, equipo para la RCP, enzimas de restricción, electroforesis	Rapidez, interpretación bien definida, fácil detección de mezclas, identificación de genotipos salvajes	Costoso, contaminación cruzada de las muestras

Recomendaciones

1. Aunque varios laboratorios tienen experiencia con uno de los métodos antes mencionados, pocos han trabajado con más de uno. Es preciso iniciar un estudio colaborativo que incluya a laboratorios con amplia experiencia, con el fin de conocer la capacidad relativa de cada uno de los métodos antes mencionados para identificar correctamente cepas de poliovirus.

2. A nivel de los Laboratorios Regionales de Referencia es preciso efectuar un estudio colaborativo para determinar si es posible limitar el número de anticuerpos monoclonales necesarios para la diferenciación intratípica y optimar este método.

3. Se recomienda que, de acuerdo con los resultados de los estudios colaborativos mencionados, se revise el *Manual for virological investigation of poliomyelitis* [Manual para la investigación virológica de la poliomielitis]² en relación con los procedimientos siguientes:

☐ el procedimiento recomendado para la tipificación, ya que esta es esencial para la diferenciación intratípica correcta;

☐ el método recomendado para la diferenciación intratípica; después de completar los estudios colaborativos mencionados, se debe tomar una decisión sobre el método que se usará.

NUEVOS MÉTODOS PARA DETECTAR ANTICUERPOS CONTRA LOS POLIOVIRUS

La prueba de neutralización de poliovirus es un método sensible y específico para la determinación de los anticuerpos resultantes de la infección por virus de la vacuna o salvajes. Sin embargo, a causa de las considerables dificultades para interpretar los resultados y de las limitaciones de recursos y

tiempo, en la actualidad la serología no forma parte de las actividades de erradicación de los poliovirus. Aun así, los resultados presentados en esta reunión indican que se ha logrado un progreso importante en la obtención de métodos alternativos basados en la técnica ELISA para medir los anticuerpos contra los poliovirus. Estos métodos nuevos podrían en definitiva resultar útiles para la erradicación mundial de la poliomielitis.

En tres laboratorios diferentes, se han desarrollado pruebas ELISA con captura específica para el isotipo (*isotype-specific capture tests*), destinadas a detectar anticuerpos IgM o IgA específicos para cada uno de los tres tipos de poliovirus. Aunque los detalles de los tres procedimientos varían ligeramente, las estrategias generales son similares. En resumen, la especificidad de clase de los anticuerpos se determina por los anticuerpos anti-mu o anti-alfa de captura que revisten un soporte de fase sólida. Se agregan los sueros que se ensayarán, seguidos del serotipo específico de poliovirus como antígeno. Los anticuerpos detectores son anticuerpos monoclonales específicos para cada uno de los tres serotipos. Se añade entonces el sistema generador de señales para determinar la medida en que se han unido los anticuerpos detectores. Los métodos son técnicamente fáciles de realizar, no requieren un equipo amplio y pueden dar resultados en menos de dos días.

Los resultados notificados han mostrado una correlación elevada en casos clínicos entre la presencia de IgM específica para los virus y los virus aislados en el paciente. Se observó una reacción cruzada muy escasa con otras infecciones por enterovirus y la frecuencia de respuestas a serotipos múltiples fue baja. Hubo también una correlación alta entre las respuestas de IgM e IgA de los vacunados y la seroconversión en la prueba de neutralización de anticuerpos. También se presentaron datos que indicaban que la ELISA para la IgM era más sensible que el aislamiento de virus en el diagnóstico de la parálisis flácida aguda asociada con poliovirus.

² Documento inédito de la OMS, WHO/EPI/CDS/Polio/90.1, 1990.

Por el contrario, la correlación entre los resultados de la ELISA con captura (*capture ELISA*) para la IgG específica para los virus y el título de anticuerpos neutralizantes fue baja. No obstante, tal vez otras configuraciones de la prueba proporcionen una mejor medición de la IgG. Los resultados de una ELISA de enlace competitivo indican que este método puede ser muy promisorio. Además, usando sueros adsorbidos, la prueba de enlace competitivo (*competitive binding assay*) también pudo diferenciar específicamente entre la respuesta a la vacuna oral y la respuesta a la vacuna inactivada, si bien se redujo notablemente la sensibilidad.

Como resultado de estos informes y su análisis posterior, queda claro que la serología basada en la ELISA tiene un gran potencial para contribuir al esfuerzo de erradicación en tres áreas principales: 1) el diagnóstico específico del virus de la parálisis flácida aguda causada por poliovirus; 2) la medición de la respuesta inmunológica a la vacuna, y 3) la determinación de la prevalencia de anticuerpos contra los poliovirus.

En el caso del diagnóstico específico de los virus, la ELISA con captura de IgM (*capture IgM ELISA*) y, posiblemente, la ELISA de IgA, han resultado promisorias para determinar con rapidez la infección reciente por poliovirus. Es necesario realizar un estudio colaborativo al menos en tres laboratorios para evaluar la correlación entre la respuesta de IgM e IgA y la infección por poliovirus. Esto requerirá identificar sueros de casos y controles apropiados, someter a pruebas los sueros y analizar los resultados (véase el anexo). Sin embargo, para distinguir entre la infección causada por virus salvajes y la infección provocada por la vacuna serán necesarios otros estudios destinados a desarrollar pruebas sencillas y rápidas.

Entre los vacunados, es importante evaluar la respuesta de anticuerpos específicos de clase y su correlación con los anticuerpos neutralizantes. Es preciso diseñar un estudio colaborativo similar al descrito anteriormente para evaluar la función de estas pruebas en este contexto. Como ya se han identificado los sueros y los métodos se-

rán idénticos, esta evaluación requerirá solo un pequeño esfuerzo adicional.

Si bien tanto en los casos clínicos como en los vacunados es posible valorar la respuesta de anticuerpos a una infección reciente por los virus midiendo los anticuerpos IgA e IgM, probablemente el estado inmunológico de toda una población solo se pueda medir determinando la respuesta de IgG. Hubo consenso en que la configuración de la ELISA con captura (*capture ELISA configuration*) era inapropiada para este propósito. Es preciso continuar perfeccionando esa prueba para medir los títulos de anticuerpos IgG, que tienen una elevada correlación cuantitativa con los anticuerpos neutralizantes.

Aunque no está relacionado directamente con la prueba ELISA, el empleo de papel de filtro para recolectar muestras de suero constituirá una parte importante de la aplicación rutinaria de la serología. El pequeño volumen de los sueros que requiere la prueba ELISA explica la alta viabilidad de este método de recolección de muestras. A pesar de que se ha descrito el empleo de papel de filtro en la recolección para otras pruebas de la IgM, hay que comprobar su utilidad en estas pruebas.

Recomendaciones

1. Se debe llevar a cabo un estudio colaborativo para evaluar la correlación entre los anticuerpos IgM o IgA detectados mediante la ELISA con captura de anticuerpos y la infección reciente por poliovirus, con el fin de determinar la utilidad de esas pruebas en el diagnóstico específico para los virus de la parálisis flácida aguda. Es preciso identificar sueros apropiados en un lapso de tres meses y completar el estudio en un año.

2. Hay que realizar un estudio colaborativo para analizar la correlación entre los anticuerpos IgM o IgA detectados mediante la ELISA con captura de anticuerpos y la respuesta de anticuerpos neutralizantes a las vacunas, para determinar si esas pruebas serán útiles al evaluar la respuesta a las va-

cunas. Se han identificado los sueros apropiados y el estudio se completará en un año.

3. Es necesario evaluar los resultados de los estudios anteriores con vistas a formular recomendaciones específicas respecto a la modificación o la continuación de las políticas actuales de los programas en cuanto al empleo de la serología en las actividades de erradicación de los poliovirus.

4. La OMS debe apoyar el desarrollo de pruebas para medir los títulos de anticuerpos IgG, cuyos resultados se correlacionan con los de las pruebas de anticuerpos neutralizantes.

5. Es preciso evaluar el empleo de papel de filtro en la recolección de sueros para las pruebas ELISA de poliovirus.

6. Se recomienda que la OMS apoye y coordine una evaluación clínica prospectiva de la sensibilidad y la especificidad de estos procedimientos serológicos más nuevos para el diagnóstico específico de los virus en casos de parálisis flácida aguda. Este estudio debe incluir la recolección de sueros seriados y muestras fecales de casos clínicos de poliomiелitis bien caracterizados y confirmados.

NUEVOS MÉTODOS PARA ANALIZAR LA NEUROVIRULENCIA DE LOS POLIOVIRUS

En los últimos años, se han desarrollado varios métodos nuevos para analizar la neurovirulencia de los poliovirus. Estos métodos ofrecen ventajas bien definidas con respecto a la prueba de la neurovirulencia en el mono: son más rápidos, cuestan menos y son potencialmente más confiables.

El ratón transgénico

Uno de estos nuevos métodos es el modelo del ratón transgénico para la poliomiелitis. Se han obtenido ratones transgénicos que expresan el receptor de la célula humana para el poliovirus (RPV). Los ratones

transgénicos con RPV son sensibles a la infección por poliovirus y contraen poliomiелitis después de la inoculación con cualquiera de los tres serotipos de poliovirus salvajes. Los ratones son sensibles después de la inoculación por las vías intracerebral, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y (con una dosis de inoculación más alta) oral. En los ratones transgénicos con RPV no se produce la enfermedad clínica después de la inoculación con cualquiera de los tres serotipos de las cepas de la vacuna Sabin. En consecuencia, estos ratones podrían ser usados en las pruebas para determinar la neurovirulencia de los poliovirus.

Segmentación por enzimas de restricción en la RCP para la determinación de mutantes (*mutant assay by PCR restriction-enzyme cleavage, MAPREC*)

La segunda prueba, la MAPREC, examina directamente *loci* genómicos que son importantes para el fenotipo de atenuación. En esta prueba, se usa la RCP para amplificar una región del genoma vírico y, mediante la segmentación por enzimas de restricción de los productos amplificados, se detectan las diferencias importantes en la secuencia. Por ejemplo, la MAPREC se ha usado para determinar el porcentaje de C en el nucleótido 472 en las cepas del tipo 3, una de las posiciones que controlan el fenotipo de atenuación. El examen de más de 70 lotes de vacuna y de otras cepas víricas del tipo 3 ha indicado que la proporción de virus con C en la posición 472 tiene una alta correlación con los resultados de la prueba de la neurovirulencia en el mono. Todos los lotes de vacuna que no superaron la prueba en el mono contenían > 1% de C en 472, mientras que los lotes que pasaron la prueba contenían < 1% de C en 472. Las mutaciones en otras posiciones genómicas no se correlacionaron con los resultados de la prueba de neurovirulencia en el mono. Por consiguiente, la MAPREC es una prueba rápida, barata y confiable, que parece muy

promisoria para determinar el potencial de neurovirulencia de los poliovirus. No obstante, es preciso desarrollar y evaluar procedimientos de la prueba MAPREC específicos para las cepas de los tipos 1 y 2 de la vacuna.

Prueba de la traducción *in vitro*

El tercer método es una prueba de la traducción *in vitro*. Se traduce el ARN vírico en sistemas exentos de células y se cuantifica el producto de la traducción. En esta prueba, las eficiencias de la traducción del ARN de las cepas Sabin son considerablemente inferiores a las observadas en el caso de las cepas de tipo salvaje. Se han representado las diferencias en la traducción en las posiciones de la región no traducida 5' que controla el fenotipo de atenuación. Por lo tanto, esta prueba emplea una correlación entre la eficiencia en la traducción y la neurovirulencia para evaluar la atenuación de una cepa particular.

Estas tres pruebas podrían complementar o, quizá, incluso sustituir a la prueba de la neurovirulencia en el mono. No obstante, es necesario realizar otros estudios en varios laboratorios antes de que se puedan tomar otras decisiones sobre el empleo de estas pruebas.

Recomendaciones

1. Los ratones transgénicos con RPV.

Es necesario comparar la sensibilidad y la variabilidad de una prueba de neurovirulencia en el ratón transgénico con la prueba en el mono. Como primer paso, se recomienda determinar la neurovirulencia de cepas de tipo 3 en una o más líneas de ratones transgénicos con RPV. Se deben someter a las pruebas tres cepas: una cepa atenuada (P3/Sabin), una virulenta (P3/Leon) y una de neurovirulencia intermedia (por ejemplo, la ATCC VR-1004 u otra similar). Se realizará la inoculación intracerebral de los ratones y se cuantificarán los signos clínicos y las lesiones en el encéfalo y la médula espinal. Las áreas examinadas del encéfalo y la médula espinal deben ser las que son patognomónicas de la poliomielitis. Estos estudios se efectuarán en colaboración en

varios laboratorios diferentes. Cada laboratorio ha de determinar la cantidad de virus inoculados y el tiempo de incubación, pero, como punto de partida, se pueden usar los valores publicados (véase Ren et al. *Cell*. 1990;63:353–362). También se debe realizar la prueba mediante la inoculación intramuscular, que parece ser tan eficiente como la intracerebral y puede ser más fácil de realizar. La meta de estos estudios será comparar directamente y utilizando los mismos virus los resultados de las pruebas de la neurovirulencia en el ratón con pruebas en monos. Si los resultados indican que la prueba en el ratón es tan sensible y reproducible como la prueba en el mono, se justificarían estudios adicionales, usando primero aislados de poliovirus de tipo 3 relacionados con la vacuna y luego los serotipos 1 y 2 del poliovirus.

2. MAPREC. Se han obtenido bastantes datos que indican la existencia de una excelente correlación entre la proporción de C en la base 472 del genoma del tipo 3 y la prueba de la neurovirulencia en el mono. Por consiguiente, los participantes en esta reunión instan a efectuar estudios similares usando las cepas de poliovirus de los tipos 1 y 2. Para ambos serotipos, es preciso examinar inicialmente tres cepas: una cepa virulenta (por ejemplo, P2/MEF1 o P1/Mahoney), una atenuada (por ejemplo, P1/Sabin o P2/Sabin) y cepas de virulencia intermedia. Se usará la MAPREC para determinar el nucleótido en posiciones que están relacionadas con el fenotipo de atenuación de esas cepas. Los resultados del análisis de la MAPREC se compararán con los de las pruebas de la neurovirulencia en el mono establecidas por la OMS, como se hizo con las cepas de tipo 3.

3. Prueba de la traducción *in vitro*.

Es preciso examinar más a fondo la correlación entre la menor eficiencia en la traducción *in vitro* y la atenuación impartida por mutaciones en la región no traducida 5', y compararla con los resultados de las pruebas de la neurovirulencia en el mono. Inicialmente, hay que examinar tres cepas de poliovirus de tipo 3 con neurovirulencia elevada;

baja e intermedia. Se debe determinar la eficiencia en la traducción *in vitro* de los genomas de esos virus y la exactitud y variabilidad de la traducción. Hay que efectuar pruebas paralelas de la neurovirulencia en el mono usando las mismas cepas víricas. Si los resultados preliminares sugieren que la prueba de traducción *in vitro* es una buena indicación de la atenuación, se debe fomentar el examen de aislados de tipo 3 relacionados con la vacuna, así como de aislados representativos de los otros dos serotipos, usando la traducción *in vitro* y la prueba de la neurovirulencia en el mono.

Sería muy productivo realizar estudios paralelos de estos tres procedimientos nuevos de prueba, usando cepas víricas idénticas de tal modo que se puedan comparar directamente los resultados de las distintas pruebas. Esto se puede lograr más efectivamente en un solo laboratorio, pero también se podría efectuar mediante la colaboración eficaz entre distintos laboratorios.

ANEXO 1

Información que se proporcionará con las muestras de suero que se someterán a pruebas en los estudios prospectivos y retrospectivos colaborativos relacionados

con los procedimientos serológicos nuevos para el diagnóstico de infecciones por poliovirus.

Identificación retrospectiva de casos (100 sueros)

1. Diagnóstico clínico: parálisis flácida aguda (PFA).
2. Antecedentes de vacunación, tipo de vacuna y fecha (indicar cartilla o historia clínica).
3. Resultados de laboratorio sobre el aislamiento, identificación, caracterización del virus y de la serología (si se ha efectuado).
4. Fecha de inicio.
5. Fecha de los sueros (0-4 semanas después de la fecha de inicio).
6. Volumen de la muestra de suero (0,2 ml o más).
7. Edad, sexo, país.

Controles (100 sueros)

1. La misma información indicada para los casos.
2. Diagnóstico clínico: síndrome de Guillain-Barré (SGV).

Otras parálisis flácidas agudas sin aislados de poliovirus.

SUMMARY

NEW APPROACHES TO POLIOVIRUS DIAGNOSIS USING LABORATORY TECHNIQUES: MEMORANDUM FROM A WHO MEETING

Laboratory diagnosis of poliomyelitis is an important part of the WHO initiative for global eradication of poliomyelitis.

During the last year, new methods have been developed for the detection of poliovirus in clinical specimens, for intratypic differentiation, for the analysis of poliovirus neurovirulence, and for the detection of poliovirus antibodies. Progress in laboratory techniques for detection of poliovirus antibodies and for characterization of poliovirus isolates has suggested several new approaches to poliovirus diagnosis using laboratory techniques.