

Los anticuerpos monoclonales en la caracterización y vigilancia de los virus de la rabia en América Latina y el Caribe¹

Con el fin de responder a los nuevos requisitos diagnósticos necesarios para caracterizar los virus de la rabia, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) ha creado un consorcio de instituciones con reconocido conocimiento técnico (Consortio de Laboratorios de Referencia para la Rabia) cuyos objetivos consisten en: fortalecer la vigilancia epidemiológica de la rabia en las Américas; optimizar la capacidad de diagnóstico de la enfermedad en la Región; armonizar los métodos y unificar los criterios de interpretación de resultados utilizados en diferentes laboratorios; llevar al máximo la calidad de los métodos y resultados; alentar un nuevo estilo de trabajo basado en la participación de los miembros, y actualizar continuamente los requisitos y capacidades de todos y cada uno de los participantes. Como coordinador del Consorcio, la OPS ha designado al Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA).

Los miembros del Consorcio deberán llevar a cabo actividades diagnósticas en los laboratorios de sus países y, a petición de la OPS, en otros países. Las actividades que han de realizarse se han clasificado en dos categorías. Las de la clase A consisten en la confirmación de la detección de la rabia por métodos convencionales (anticuerpos fluorescentes o aislamiento del virus) y las de la clase B en procedimientos de caracterización de los virus con métodos basados en anticuerpos monoclonales (AcMo) o en la secuenciación de genes. En todos los casos, entre sus responsabilidades se incluirán también el suministro de reactivos biológicos para el diagnóstico, el apoyo a los programas de control de calidad, la recepción y distribución de información entre los miembros del Consorcio y el desarrollo de proyectos de investigación. Las actividades futuras deberán poner énfasis en la acreditación de los laboratorios, la definición de la dinámica y estrategias del Consorcio, la promoción de la utilización de recursos complementarios, el impulso de nuevas investigaciones sobre el empleo de los AcMo y de los métodos de secuenciación de genes y la definición de las fuentes de financiación.

En este contexto, la OPS organizó en octubre de 1999 una consulta técnica sobre el empleo de los AcMo en la caracterización y la vigilancia epidemiológica de los virus de la rabia en América Latina y el Caribe, cuyas principales conclusiones se exponen aquí.

¹ Basado en documentos inéditos de la "PAHO/WHO technical consultation on the use of monoclonal antibodies for rabies virus characterization and epidemiological surveillance in Latin America and the Caribbean", Washington, D.C., 18 a 19 de octubre de 1999.

El virus de la rabia, un virus ARN de cadena negativa, es el prototipo del género *Lyssavirus*, familia *Rhabdoviridae*. El análisis genético de los genes G y N ha permitido identificar al menos siete genotipos de lisavirus: (GT1-mundial) rabia; (GT2-África) murciélago de Lagos; (GT3-África) Mokola; (GT4-África) Duvenhage; (GT5-Europa) lisavirus 1 del murciélago europeo o EBL1; (GT6-Europa) EBL2, y (GT7-Australia) lisavirus del murciélago australiano o ABLV. Por el momento, en América solo se han encontrado aislados GT1 (rabia clásica). En este continente, el virus de la rabia es mantenido en ciclos en las poblaciones de cánidos domésticos, en carnívoros terrestres salvajes y en murciélagos, que actúan como reservorios y vectores de la enfermedad.

Los lisavirus de los siete genotipos se componen de cinco proteínas estructurales derivadas de otros tantos genes estructurales del genoma de ARN: una glucoproteína superficial (G), una proteína de la membrana interna o matriz (M), tres proteínas nucleares —ribonucleoproteína (RNP), nucleoproteína (N) y fosfoproteína (P)— y una ARN-polimerasa dependiente de ARN (L). Las cinco proteínas son producidas a partir de ARN mensajeros monocistrónicos transcritos de los correspondientes genes estructurales.

La proteína G es utilizada por el virus para unirse a las células huésped e inicia las relaciones entre ambos al unirse a los receptores celulares. Se cree que es la determinante del tropismo y de la patogenicidad del virus y que, junto con la proteína M, está implicada en la formación de la envoltura vírica y en la producción de viriones. La proteína G es también una diana de los linfocitos T y de los anticuerpos neutralizantes del virus.

La proteína N encapsula y protege de la degradación al genoma del virus. Tiene dominios funcionales que se unen al ARN, a la proteína P y, posiblemente, a la proteína M. El comportamiento de la proteína N como superantígeno indica que contiene lugares de unión tanto para el receptor de los linfocitos T como para los antígenos de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad.

La proteína P también es multifuncional. Interactúa con la proteína N, evitando su autoagregación, y con el complejo proteína N-ARN, facilitando el inicio de la transcripción del ARN y la elongación de la cadena por la ARN-polimerasa (proteína L). Además interactúa con la proteína L, estabilizándola, y participa en la encapsulación del ARN.

Entre las funciones de la proteína M se encuentran la participación en el ensamblaje del virus y en su salida de la célula, así como la regulación a la baja de la transcripción.

Por último, la proteína L dirige la transcripción y replicación del ARN vírico.

La tasa de mutación de los genomas de los virus ARN es entre mil y un millón de veces mayor que la de los genomas de los virus ADN, hecho debido en gran medida a que las polimerasas de ARN carecen de los mecanismos intrínsecos de “corrección de pruebas” que poseen las polimerasas de ADN. No obstante, y a pesar del gran potencial de mutación aleatoria, los aislados de virus de la rabia presentan en general altos niveles de conservación, lo cual indica la existencia de fuertes presiones selectivas. Algunos genes de los lisavirus, como el G y el P, sufren más mutaciones que otros, como el N y el M. Estas mutaciones de los genes y proteínas de los lisavirus han recibido gran atención por parte de los epidemiólogos moleculares con el fin de interpretar los ciclos de los lisavirus y, en particular, la transmisión y mantenimiento del virus de la rabia (genotipo 1) en diferentes especies salvajes que sirven como reservorios de la enfermedad. Lamentablemente, se sabe muy poco sobre las consecuencias o la importancia de las mutaciones que alteran la estructura primaria de las proteínas víricas. Entre las excepciones se encuentran las variaciones de los epítomos que influyen sobre el reconocimiento de los antígenos por los anticuerpos o por los linfocitos T y las variantes de la proteína G que modifican la patogenicidad del virus en el ratón adulto. Por otro lado, es posible que las proteínas toleren muchas mutaciones sin que su función se vea afectada.

Aunque los métodos serológicos basados en anticuerpos policlonales permiten diferenciar el virus de la rabia de otros serotipos de lisavirus, solo establecen ligeras diferenciaciones entre los subtipos del virus de la rabia clásico. Los métodos que caracterizan los atributos antigénicos y genéticos del virus de la rabia permiten identificar las variantes responsables de epizootias y de casos individuales de rabia tanto en humanos como en animales.

Los AcMo permiten análisis antigénicos comparativos de las variantes del virus de la rabia. Generalmente la reactividad se determina utilizando baterías de AcMo antirribonucleoproteína (anti-RNP) específicos para epítomos de la nucleocápside del virus. La reactividad se visualiza por la tinción inmunofluorescente de las características inclusiones intracitoplásmicas. Las pruebas de microneutralización con AcMo frente a epítomos de la glucoproteína (G) también se han empleado con éxito, pero son más laboriosas, hecho que ha impedido su amplia utilización y ha llevado al desarrollo de una batería de AcMo anti-N que pudiera proporcionar la máxima diferenciación entre los virus de la rabia relevantes desde el punto de vista de la salud pública. Los resultados obtenidos han demostrado que estos AcMo se pueden utilizar para estudiar la prevalencia relativa, la distribución y la transmisión de la

rabia entre diferentes especies salvajes. Además, han contribuido a diferenciar los animales probablemente infectados por “rebasamiento” de los huéspedes reservorios. La caracterización de las variantes de los virus de la rabia también ha sido muy útil para comprender la epidemiología de la rabia humana, sobre todo en situaciones en las que no hay antecedentes de exposición, como puede ocurrir en países donde la rabia canina está controlada.

Los análisis con AcMo proporcionan una resolución de las diferencias entre antígenos víricos suficiente para identificar la distribución geográfica y por especies de muchas variantes de la rabia. Sin embargo, el empleo exclusivo de AcMo no está exento de limitaciones. Así, por ejemplo, la diversidad de las variantes presentes en los murciélagos no se explica fácilmente con los AcMo existentes. Para detectar polimorfismos, el análisis genómico es, evidentemente, más adecuado que el análisis fenotípico con AcMo, entre otros motivos porque hay más mutantes sinónimos que no sinónimos y porque gran parte de los mutantes no sinónimos no son detectados por los AcMo. El análisis genético proporciona una información más detallada sobre la relación evolutiva de los aislados, los cambios espaciales y temporales que se pueden producir y las similitudes entre los aislados. Otra ventaja de los métodos genéticos es que a menudo se pueden aplicar a muestras fijadas en formalina o a muestras degradadas. Dependiendo de los objetivos del análisis y del grado de relación entre las variantes, puede ser preferible analizar secuencias totales o parciales del gen N, altamente conservado, del gen G, de divergencia intermedia, o del gen P y de la región intergénica G-L, altamente divergentes. En general, cuanto más conservado esté el gen, menos sensible será a variaciones menores. El análisis genético se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa y el análisis de los productos de la amplificación se puede efectuar mediante análisis de la secuencia de nucleótidos, bien por digestión con endonucleasas de restricción o bien por secuenciación directa de consenso.

La potencial utilidad de la tipificación antigénica y genética del virus de la rabia es determinada en gran parte por factores relacionados con la recolección y manipulación de las muestras. La tipificación antigénica requiere una adecuada conservación de las muestras por refrigeración o congelación. Debido a la enorme sensibilidad de los procedimientos, la tipificación genética requiere cuidados extremos para evitar la contaminación cruzada de las muestras. Para que los datos resultantes se puedan interpretar correctamente, también es fundamental una identificación exacta de las especies animales de las que proceden las muestras y la anotación de las fechas y lugares de captura.

La aplicación de la tipificación antigénica y genética a la vigilancia de la rabia en América Latina y el Caribe es esencial para mejorar los actuales programas de control de la enfermedad. El reconocimiento de las fuentes de nuevos brotes de rabia canina y la identificación de las especies salvajes que mantienen los ciclos silvestres de transmisión de la rabia posibilitan una mejor utilización de los recursos de salud pública.

El desarrollo de hibridomas productores de AcMo frente a diferentes lisavirus tiene costos considerables, por lo que no se suelen compartir las líneas celulares con otros laboratorios. No obstante, la mayoría de los laboratorios productores están dispuestos a compartir sus AcMo de forma gratuita, siempre que se cumpla una serie de requisitos especificados en los Acuerdos de Transferencia de Materiales. Habitualmente, estos acuerdos definen el uso que el receptor va a hacer de los AcMo, impiden su transferencia a otras instituciones sin el permiso del productor y requieren que este participe en la publicación de los resultados de las investigaciones, o bien que se reconozca el origen del material en todos los informes y publicaciones.

Los AcMo pueden ser obtenidos como sobrenadantes de cultivos tisulares de hibridomas o como líquido ascítico de ratón. El líquido ascítico proporciona mayores concentraciones de AcMo, pero su producción está cada vez más restringida por las leyes sobre el uso de animales de laboratorio y en muchos países está ya prohibida. Para las pruebas rutinarias de identificación de variantes víricas por inmunofluorescencia indirecta, los sobrenadantes de cultivos celulares suelen proporcionar concentraciones suficientes de AcMo.

Las baterías de AcMo proporcionadas por los productores deben tener menos de 20 anticuerpos, una vez que la experiencia de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos de América demostró que el empleo de baterías con muchos anticuerpos requería mucho tiempo y aumentaba el riesgo de error en la realización de las pruebas y en la interpretación de sus resultados. En la actualidad, para las tipificaciones rutinarias se utiliza una batería reducida de ocho AcMo. El productor puede proporcionar una batería de anticuerpos que haya demostrado ser útil en condiciones similares o pedir al laboratorio receptor que le envíe algunos aislados de virus obtenidos en diferentes contextos epidemiológicos para así poder seleccionar una batería de anticuerpos que permita diferenciar el máximo número de variantes.

En la actualidad son los CDC, como Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud para la Investigación y Referencia de la Rabia, quienes proporcionan a las autoridades de

salud pública de los países de América Latina la actual batería de ocho AcMo anti-N. Los requisitos consisten en una carta oficial al Director en la que se declare la naturaleza de la solicitud y se especifique que los reactivos serán utilizados únicamente con fines de investigación, no serán enviados por el receptor a terceros y no serán utilizados con fines comerciales; que la institución receptora asumirá todas las responsabilidades relacionadas con el envío y el uso apropiado de los reactivos, y que toda comunicación científica derivada del uso de los reactivos reconocerá a los CDC como suministradores del material.

En América Latina y el Caribe, los laboratorios de referencia de Argentina, Brasil, Chile, Colombia, México y Venezuela han tipificado antígenicamente más de 800 aislados de virus de la rabia, utilizando en prácticamente todos los casos la batería de ocho AcMo proporcionada por los CDC. La excepción fueron los primeros 11 aislados de Argentina, que fueron tipificados con los AcMo proporcionados por el Instituto Wistar. Las muestras analizadas procedían de estos cinco países y de otros países de la Región, como Belice, El Salvador, Guatemala, Honduras o Paraguay. En Chile se está realizando, además, un análisis de secuenciación y los correspondientes análisis filogenéticos de los virus de la rabia aislados en el país, servicio que también está a disposición de otros países.

El empleo de una misma batería de AcMo tiene la ventaja de permitir comparar los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigadores. La experiencia acumulada en la Región revela que el empleo de esta técnica ha permitido determinar

la distribución geográfica de diferentes variantes antigénicas del virus de la rabia, describir nuevas variantes e identificar variantes conocidas en nuevos huéspedes, información que ha demostrado ser muy útil para la vigilancia epidemiológica de la enfermedad en la Región. No obstante, también se han demostrado algunas limitaciones del análisis antigénico de los aislados víricos con un reducido grupo de AcMo, dado que pequeños errores en la interpretación de una reacción positiva o negativa con uno de los AcMo puede proporcionar un patrón antigénico diferente y esto podría llevar a identificar un reservorio equivocado o un nuevo patrón antigénico también equivocado.

SYNOPSIS

Monoclonal antibodies for rabies virus characterization and epidemiological surveillance in Latin America and the Caribbean

As one of the activities of the Rabies Reference Laboratories Consortium of the Pan American Health Organization, a technical consultation meeting was held in late 1999 where well-known experts from Europe, North America, and South America analyzed the contributions to rabies epidemiological surveillance in Latin America and the Caribbean made by techniques of antigenic typing based on monoclonal antibodies and by techniques of genetic typing based on gene sequencing.
