

60  
24

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



## DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO POR MEDIO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A  
GUILLERMO ALBERTO GONZALEZ ORTEGA

MEXICO, D. F.

1991

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE.

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	2
CAPITULO I	
Breve Reseña Histórica	3
CAPITULO II	
Anticuerpos Monoclonales	9
2.1.    Generalidades	9
2.2.    Técnicas para la obtención de anticuerpos monoclonales	11
2.2.1.  Inmunización de animales	13
2.2.2.  Selección de mielomas	14
2.2.3.  Mantenimiento de células de mielomas	16
2.2.4.  Procedimientos experimentales	16
2.2.5.  Preparación de células de mielomas	16
2.2.6.  Células de mielomas	17
2.2.7.  Fusión de células	18
2.2.8.  Aislamiento de clonas	19
2.2.9.  Selección de clonas	19
2.2.10.  Clonación	20
2.2.11.  Selección de clonas positivas	22
2.3.    Mejoras al procedimiento tradicional para la obtención de anticuerpos monoclonales	23

### CAPITULO III

Diagnóstico de algunas enfermedades por medio de anticuerpos monoclonales	27
3.1 Tracto genito-urinario	27
3.2 Sistema digestivo	60
3.3 Sistema nervioso	86
3.4 Sistema respiratorio	102
3.5 Enfermedades sistémicas	116

### CAPITULO IV

Discusión	128
-----------	-----

CONCLUSIONES	149
--------------	-----

BIBLIOGRAFIA	151
--------------	-----

## INTRODUCCION

Por lo general para acreditar a un determinado microorganismo como el causante de una enfermedad, se requiere de aislarlo y efectuar su secuencial identificación a través de varios subcultivos, lo cual retrasa el diagnóstico correspondiente; sin embargo, con el empleo de los anticuerpos monoclonales basta partir del primoaislamiento y en ocasiones directamente de la muestra con lo que se ahorra tiempo y se incrementan las posibilidades de que el paciente se recupere.

Para recurrir al uso de anticuerpos monoclonales como método diagnóstico se requiere conocer la estructura antigénica de los microorganismos aislados más frecuentemente ya que es posible producir un anticuerpo monoclonal dirigido a una macromolécula propia del microorganismo en estudio para demostrar su existencia.

De lo anterior se deduce que los anticuerpos monoclonales descritos en el presente trabajo son sumamente específicos y permiten identificar a los microorganismos con una alta confiabilidad, ahorrando tiempo, recursos humanos y económicos, aunque todavía se considera que la producción de anticuerpos monoclonales es costosa y requiere de más investigación para elevar aún más su exactitud y precisión.

## OBJETIVOS

- Evaluar el empleo de los anticuerpos monoclonales como herramienta diagnóstica, con base en el análisis de la literatura más relevante.

- Analizar y destacar las ventajas y desventajas de las distintas metodologías que incluyen el empleo de los anticuerpos monoclonales.

## CAPITULO I

### BREVE RESEÑA HISTORICA

A través de la historia, una de las necesidades más apremiantes del género humano ha sido la de controlar las enfermedades. Para hacerlo, se requieren metodologías cada vez más precisas que faciliten el diagnóstico.

Existe una cooperación entre diversas disciplinas como: la Microbiología, la Inmunología, la Bioquímica, la Medicina, la Zoología y la Patología (5), pero una de las áreas más socorridas en el estudio clínico es la Microbiología, es decir, la ciencia encargada de estudiar organismos tan pequeños que no pueden observarse a simple vista, ni con lupa, y que actualmente cuenta con diversas formas de diagnóstico, entre las cuales se encuentran las que conocemos como ensayos inmunológicos (5,22). Es por esto que el objetivo fundamental de este trabajo, es el de dar a conocer los estudios realizados con diferentes microorganismos patógenos empleando anticuerpos monoclonales.

Por ensayo inmunológico se entiende aquél en el cual un antígeno interacciona con su respectivo anticuerpo, reacción que además puede ser evaluada de distinta forma; por ejemplo con algún revelador (5).

Desde finales del siglo XIX se establecieron los primeros ensayos inmunológicos para diagnóstico microbiológico.

La primera reacción antígeno-anticuerpo con fines

diagnósticos fue la reacción de aglutinación bacteriana propuesta por Max Grüber y Herbert Durham (5). Desde entonces han surgido otras técnicas que hasta la fecha se usan con fines de diagnóstico. A ello se debe que actualmente haya paneles completos de exámenes inmunológicos para diferenciar entre unos y otros agentes causales de enfermedades. Por ejemplo, para diagnosticar enteropatógenos tales como Salmonella typhi, a partir del primoaislamiento se realizan pruebas bioquímicas, inmunológicas (pruebas de aglutinación), enzimáticas, etc, además de que, aún sin el primoaislamiento, se puede aglutinar con el suero del paciente y un antígeno preparado previamente, prueba a la cual se le conoce como prueba de Widal.

Así, se puede afirmar que al incrementar la especificidad de las técnicas de diagnóstico, se incrementa también la confiabilidad en metodologías y consecuentemente en el diagnóstico del agente o agentes causales de un padecimiento. Por lo tanto, se considera vital incrementar la especificidad en las técnicas de diagnóstico.

Asimismo, se debe tomar en cuenta que en un género cualesquiera, existen especies patógenas y no patógenas, y se podría dar lugar a confusiones si se usan metodologías convencionales para el diagnóstico de una especie patógena entre varias no patógenas (7,22). Si, por otro lado, se considera que los anticuerpos monoclonales incrementan contundentemente la especificidad de las reacciones en las que están involucrados, esto los convierte en una herramienta muy útil para demostrar



la presencia de un antígeno evitando las confusiones originadas por metodologías convencionales como técnicas de aglutinación, de precipitación, etc (80). Los anticuerpos monoclonales se dirigen a proteínas, a polisacáridos o, en general, a macromoléculas exclusivas de las especies patógenas (5, 80). El problema de la antigenicidad cruzada que es como se conoce a esas reacciones entre antígenos compartidos, prevalece cuando la macromolécula a la que está dirigida la línea celular de diagnóstico está presente en todo un género o en más géneros.

En un modesto empeño por hacer una breve reseña para ubicarnos en la historia de la inmunología y la evolución de metodologías y ciencias que ayudan para un mejor desempeño del área clínica, se puede señalar que:

La Inmunología como ciencia en evolución tiene sólo 150 años, durante este tiempo y junto a las ciencias más íntimamente relacionadas con ella, se ha desarrollado gradual y desigualmente; en consecuencia, su evolución se ha hecho patente en tan sólo el último siglo (5).

Así, se puede decir que el primer concepto de la Inmunología que surgió fue el de la inmunidad. Cabe señalar además, que en sus albores, la Inmunología se dedicaba casi exclusivamente a prevenir enfermedades infecciosas por vacunación e inmunización (5,91). En la década de los 80, Inmunología e inmunidad eran sinónimos, lo cual ya no es aceptable. Actualmente sabemos que la inmunidad está relacionada con la

salud y la Inmunología a estudiar conceptos y mecanismos relacionados con el tema, mismos que guardan una íntima relación con disciplinas como Virología, Genética, Inmunología, Serología, etc.(5,22).

Aún cuando cada una de ellas es un tema apasionante, el que se tratará es el de la Serología, que estudia los componentes humorales del cuerpo humano. En este campo, la primera reacción serológica descrita fue la aglutinación bacteriana, que consiste en que las bacterias forman cúmulos por acción de sueros inmunes específicos, originalmente descrito por Grüber y Durham en 1896. En ella se demuestra, entre muchas otras acciones, que el vibrión del cólera se aglutina con suero anticólera, y que el bacilo de la tifoidea se aglutina con el suero contra la tifoidea, pero no viceversa (5,22,28,91).

El mismo año, Vidal describió la prueba de aglutinación como auxiliar diagnóstico para la fiebre tifoidea (5).

Al emplear eritrocitos como antígeno, la prueba se amplió a la hemaglutinación, para identificar grupos sanguíneos y en la transfusión sanguínea.

La segunda prueba serológica descrita fue la precipitación; Kraus observó que los filtrados de cultivos bacterianos o los extractos de bacterias precipitaban por acción de sus sueros antibacterianos. También estableció la especificidad serológica de la reacción entre los bacilos de la peste, la fiebre tifoidea y el cólera (5,7,28).

Las pruebas serológicas pueden efectuarse en geles

según enunciaron Ouchterlony, Elek y Oudin durante 1946-1948; estas pruebas de inmunodifusión diferían en su plan físico pero se fundaban en un hecho: "Los antígenos y sus sueros difunden a partir de pozos horadados en agar hasta alcanzar concentraciones adecuadas para la precipitación" (5).

Diversas modificaciones han mejorado las pruebas de inmunodifusión, la primera de ellas conocida como inmuno-electroforesis, fue presentada por Grabar y William en 1953. En ella, la inmunodifusión se efectúa precedida de la separación de los antígenos de una mezcla por electroforesis, lo cual facilita la enumeración de los precipitados que se forman para posteriormente realizar su identificación.

Otra modificación fue la inmunodifusión radial o cuantitativa descrita por Mancini en 1965. En esta técnica el antígeno difunde en forma radial desde un pozo perforado en un gel que contiene anticuerpos, la zona de precipitado que se forma es medida exacta de la cantidad de antígeno añadido (91).

Otras variantes importantes son la Contraimmunoelectroforesis (CIEF) y la técnica de Laurell.

Una aportación trascendente fue aquella de Bordet sobre la Alexina luego llamada "complemento". Sustancia sérica, termolábil e intensamente bactericida en presencia de anticuerpos. Bordet, también descubrió que la cantidad de complemento no aumentaba durante la inmunización. Estudió además, el mecanismo de las reacciones serológicas y la coaglutinación in vitro.

En 1942, Coons descubrió el método del anticuerpo fluorescente en el cual, se une al anticuerpo un agente fluoresceinado por medio de un enlace covalente.

En 1945, Coombs y colaboradores en Cambridge, publicaron su primer trabajo sobre antiglobulina, hoy conocida como prueba de Coombs, útil para identificar anticuerpos incompletos o monovalentes y que se emplea para impedir transfusiones de sangre incompatible, para descubrir la incompatibilidad de Rh y para diagnosticar e impedir la eritroblastosis fetal.

En 1956, Rosaly Yalow y Solomon Berson fundamentaron las teorías y métodos que actualmente se usan como métodos de radioinmunovaloración, que al emplear marcadores radioactivos, amplían notablemente la sensibilidad de las pruebas serológicas, que además se destacan por su gran especificidad.

Asimismo, en 1975 Kohler y Milstein crearon una metodología, con la cual se logran generar líneas celulares inmortales al fusionar células productoras de anticuerpos dirigidos en contra de un determinado antígeno y células de mieloma, creando así un nuevo concepto "el hibridoma", por medio del cual se producen anticuerpos de una sola línea celular (5, 28,80). A partir de su creación, los métodos de diagnóstico se han hecho más específicos y su utilización es, todavía a la fecha, uno de los recursos más efectivos con que se cuenta para la identificación de los diferentes microorganismos.

## CAPITULO II

### ANTICUERPOS MONOCLONALES

#### 2.1 GENERALIDADES

Existen dos poblaciones de linfocitos, los T y los B. Los primeros derivan del timo (inmunidad celular), son responsables del rechazo de injertos y de la defensa del organismo contra infecciones por diferentes microorganismos patógenos (hongos, poxvirus, bacterias, patógenos intracelulares, etc.). Los segundos se denominan así porque se desarrollan en la bolsa de Fabricio en el caso de las aves, mientras que en los humanos se desarrollan en la médula ósea y en el tejido linfoide (ganglios linfáticos) (5,7,25,80).

Los linfocitos B y su progenie, las células plasmáticas, son los responsables de las funciones de la inmunidad humoral (5,22).

Las células plasmáticas representan el estado terminal de la diferenciación de los linfocitos B. Estas células están encargadas de producir inmunoglobulinas (o anticuerpos) y secretarlos hacia el espacio extracelular (22).

Cada célula plasmática secreta un tipo específico de inmunoglobulinas. El estudio de las etapas de diferenciación de las células plasmáticas y de la síntesis de anticuerpos homogéneos, se ha facilitado considerablemente por la existencia de tumores derivados de células plasmáticas (5,80). En el hombre, la neoplasia conocida como "mieloma múltiple"

es una enfermedad maligna proliferativa de células plasmáticas, el estudio de las proteínas secretadas por estas células, ha servido para aclarar la estructura de los anticuerpos. Por otro lado, en la especie murina donde es posible inducir y tras plantar este tipo de tumor, conocido comúnmente como mieloma o plasmacitoma, es en donde mayores avances se han realizado en cuanto al estudio de la estructura de los anticuerpos y de los genes que los codifican. Estos mielomas por lo general provienen de una célula, por lo que se consideran monoclonales y son relativamente fáciles de inducir en ratones por medio de inyecciones intraperitoneales de aceites, plásticos o ceras (30).

A manera de definición, se puede decir que los anticuerpos monoclonales son moléculas sintetizadas a partir de la fusión de células de mieloma y células de bazo de un animal inmunizado, clonadas y, que tienen la facultad de producirse ilimitadamente y la alta especificidad de los anticuerpos sintetizados por células plasmáticas (22).

Los llamados anticuerpos monoclonales surgieron en 1975 en el laboratorio de Cesar Milstein en Cambridge, Inglaterra, cuando se realizaban estudios sobre la genética de las inmunoglobulinas, utilizando técnicas de fusión y clonaje celular (5,22,91).

Para generar híbridos celulares productores de anticuerpos específicos, Kohler y Milstein utilizaron células de mieloma y células de bazo de un ratón inmune a eritrocitos de carnero, logrando obtener un 10% de híbridos productores de

anticuerpos anti-eritrocitos de carnero y así, que una parte de la respuesta anti-eritrocito de carnero del ratón inmune, quedara inmortalizada a través de la hibridización con las células de mieloma (80). Las implicaciones de esta observación fueron inmensas y abrieron un panorama totalmente nuevo en la Inmunología, con la posibilidad de obtener anticuerpos monoclonales monoespecíficos en contra de cualquier sustancia capaz de inducir una respuesta inmune en el ratón. Actualmente se han producido una enorme gama de anticuerpos monoclonales dirigidos a una pluralidad sorprendente de antígenos, como se ilustrará en la presente revisión.

## 2.2 TÉCNICAS PARA LA OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

La creación de técnicas para la producción de anticuerpos monoclonales por parte de Kohler y Milstein (29,33,80), ha revolucionado el criterio serológico para el análisis de los antígenos presentes en la membrana de las células. Con esta técnica, las células productoras de inmunoglobulinas de bazo pueden inmortalizarse, por fusión con una línea de células de mieloma, puesto que son células productoras de un solo tipo de anticuerpos y que secretan, por tanto, un anticuerpo homogéneo de alta especificidad. Estas células inmortalizadas que producen el anticuerpo buscado pueden segregarse en clones, es decir líneas celulares seleccionadas y obtenerse así el anticuerpo deseado en cantidades ilimitadas.

La técnica de producción de anticuerpos monoclonales se basa en el siguiente procedimiento: inmunizar un animal de acuerdo a un esquema de inmunización preestablecido, es decir por un tiempo definido y con concentraciones de antígeno predefinidas; sacrificar al animal, separar el bazo y obtener las células esplénicas, que se mezclan en un medio de polietilenglicol con una línea de células de mieloma carentes de la enzima hipoxantina guanina fosfo-ribosil transferasa (HPGRT neg.). De este modo se fusionan ambas líneas celulares, las células de mieloma aportan la capacidad de crecimiento ininterrumpido y las células esplénicas (HPGRT pos.) inmunizadas confieren la capacidad de producir una inmunoglobulina específica, dirigida en contra del inmunógeno de que se trate; las células de mieloma no fusionadas se eliminan por cultivo en un medio que contenga aminopterina, hipoxantina y timidina (HAT) ya que las células generalmente tienen dos vías para sintetizar bases púricas y pirimídicas, la aminopterina bloquea una y obliga a las células a seguir la otra vía que sólo podrán seguir si son HPGRT pos.

Las células de mieloma no fusionadas no cuentan con la enzima y morirán por no poder sintetizar las bases púricas y pirimídicas necesarias, mientras que los esplenocitos también morirán, éstos por no ser inmortales, aunque sí cuentan con la enzima, de manera que sólo quedarán en el medio los híbridos HPGRT pos. inmortales.

Por otro lado, las clonas obtenidas se pueden conservar indefinidamente en cultivos o proliferar como un



tumor de ascitis in vivo.

A continuación se describe en detalle el procedimiento general para obtener anticuerpos monoclonales (22,29,33,80, 91).

#### 2.2.1. Inmunización de animales

Algunos antígenos son inmunodominantes y dan respuestas inmunes fuertes aún cuando están presentes sólo en cantidades pequeñas. Sin embargo, la capacidad de respuesta de los animales individuales hacia los varios componentes de una mezcla es más bien variable e involucra la supresión de los mismos, así como su inducción. Es altamente recomendable intentar más de un esquema de inmunización usando varios animales (29,33).

El esquema de inmunización que se describe a continuación ha tenido éxito en muchos casos, aún cuando no se dispone de mucha información.

Esquema de inmunización.- Si el antígeno es una proteína soluble, se disuelve en solución salina de 1 a 5 mg/ml con un volumen igual de adyuvante completo de Freund. Se inyecta un total de 0.3 a 0.6 ml de la suspensión, en ratas y ratones; las inyecciones pueden ser subcutáneas en por lo menos 3 ó 4 sitios y se pueden repetir en intervalos de 3 a 5 semanas. Aproximadamente 10 días después de cada inyección se toma una gota de sangre para muestrear la presencia y la concentración de anti-

cuerpos específicos. Después de un mes de reposo se inyecta de 0.2 a 0.4 ml de la solución proteica (antígeno) sin adyuvante de Freund y 3 ó 4 días más tarde se sacrifican los animales y se utilizan las células del bazo.

### 2.2.2 Selección de Mielomas

Para seleccionar el mieloma más adecuado existen varias consideraciones que deben tomarse en cuenta antes de elegirlo. Tal es el caso de la especie, salvo que existan razones específicas en contra, el mieloma debe ser de la misma especie que el animal inmunizado para facilitar el desarrollo de tumores cuando se hayan derivado los mielomas híbridos.

Sin embargo, la consideración más importante es la respuesta inmune relativa de cada animal al antígeno en cuestión. Si cada animal responde bien luego de la inmunización se recomienda fusionar las células plasmáticas originales del animal; pero si la respuesta de cada animal es marginalmente diferente se deberán tomar en consideración otros parámetros tales como:

1. El análisis diferencial del sistema rata o ratón.
2. La composición de las cadenas del mieloma; y
3. La pérdida de cromosomas en los anticuerpos derivados de tumores.

Los mielomas híbridos expresan codominantemente las cadenas de inmunoglobulinas de ambas células originales. Si una línea de mieloma expresa ambas cadenas (pesadas y ligeras)

de una inmunoglobulina, el híbrido expresará cuatro cadenas.

Por conveniencia, éstas se han designado como sigue: G y K son las cadenas pesadas y ligeras aportadas por el mieloma original; H y L son las cadenas respectivas (sin tomar en cuenta la clase o el tipo) aportadas por las células originales de bazo. La co-expresión de cadenas de ambas células originales "Padres" dentro de una sola célula, conlleva a la secreción de especies moleculares mezcladas. Así, además de los tipos originales LHHL y KGK, los híbridos expresarán moléculas de inmunoglobulinas del tipo LHHK, KGGL, LGGL, y KHHK, (sin tener en cuenta ni la clase ni el tipo de cadena). Además, las moléculas mezcladas que contienen ambas cadenas pesadas originales del tipo LHGK, KHGL y todas las posibles combinaciones que pueden llevarse a cabo dependen de la clase de las cadenas pesadas. Aunque no se han investigado minuciosamente todas las posibles clases de cadenas, la regla general parece ser que las cadenas pesadas de diferentes subclases, pero no de diferentes clases, pueden asociarse para formar moléculas mezcladas.

Los mielomas híbridos del tipo HLGK (es decir que expresan las 4 cadenas de inmunoglobulinas) provocan con mayor frecuencia la mutación de clonas que ya no expresan más una de las cadenas, lo cual no es un evento al azar. Por lo tanto se prefiere utilizar diferentes células de mieloma que han perdido su capacidad de sintetizar cadenas de inmunoglobulinas.

### 2.2.3. Mantenimiento de Células de Mieloma.

Cualquiera que sea el mieloma elegido, el factor más importante para una derivación exitosa de híbridos es la forma en la cual se mantiene el cultivo de mieloma antes de la fusión, la meta es un desarrollo logarítmico por tanto tiempo como sea posible, aunque ciertamente no menos de una semana antes de la fusión. Se sugiere el uso de cultivos en agitación, contrario a los cultivos estacionarios en suspensión, lo cual podría ser un requisito esencial cuando se utilizan líneas celulares de rata Y3, que tienden a pegarse a las paredes del recipiente de cultivo. Algunos investigadores aconsejan el uso de tripsina u otras enzimas para despejar las células de las paredes.

### 2.2.4. Procedimientos experimentales.

Se ha descrito un esquema de procedimientos generales involucrados en la derivación de anticuerpos monoclonales, en el cual se pueden identificar un cierto número de etapas separadas bien definidas. Sin embargo, se desea enfatizar que de ningún modo este es un protocolo rígido, sino que se pueden hacer variaciones a casi a todas las etapas; aunque esas variaciones podrían afectar a otras etapas, por lo cual se debe considerar cuidadosamente el diseño experimental (29,33).

### 2.2.5. Preparación de células madre para fusión.

Para preparar las células madre se sacrifica al

animal colocándolo en una cámara de CO<sub>2</sub> de 1 a 2 min; se le sumerge en alcohol al 70%; se coloca en un gabinete estéril y se extrae el bazo en condiciones estériles, mismo que se coloca en una caja de Petri que contiene aproximadamente 5 ml de suero fetal bovino en un medio modificado de Dulbecco (FCS-DMM) al 2.5% en hielo y se lava suavemente; luego se transfiere el bazo al fondo de un tubo de 10 ml, se corta en 3 ó 4 piezas; se agregan 5 ml de FCS-DMM al 2.5%; se maceran las piezas del bazo suavemente, para hacer una suspensión de células; se sedimenta el tejido conectivo por unos 3 minutos aproximadamente; luego, se transfiere la suspensión de células al fondo de un tubo de plástico de 10 ml; se llena el tubo con FCS-DMM al 2.5% y se centrifuga a temperatura ambiente por unos 7 a 10 min a 400g (durante este intervalo se recomienda empezar la preparación de las células de mieloma como se describe más adelante). Se resuspende el sedimento en unos 10 ml de medio fresco y se centrifuga bajo las condiciones anteriormente citadas; se repite el paso anterior y se cuentan las células. Esta suspensión puede usarse como una capa alimentadora de células para desarrollar células fusionadas (29,33).

La viabilidad de las células se determina examinándolas con microscopio de contraste de fase o con azul de tripán y debe ser mayor al 80%.

#### 2.2.6. Células de mieloma.

Una cantidad suficiente de células de mieloma de un

cultivo en desarrollo logarítmico se sedimentan por centrifugación a temperatura ambiente durante 10 min a 400 g. El sedimento se resuspende en 10 ml de FCS-DMM al 2.5% y se cuentan las células.

#### 2.2.7. Fusión de células

La fusión de células en suspensión consiste en preparar las células madre como se describió en la página 16, inciso (2.2.5); posteriormente se mezclan  $10^8$  células de bazo y,  $10^7$  células de mieloma (ratón) o  $6 \times 10^7$  células de mieloma (rata); se centrifugan a temperatura ambiente a 400 g aproximadamente durante 8 minutos; se elimina el sobrenadante con vacío usando una pipeta Pasteur, (es esencial eliminar todo el sobrenadante para evitar la dilución del polietilenglicol (PEG)). El sedimento obtenido se resuspende golpeando suavemente el fondo del tubo, se coloca el tubo en un baño de agua a 40°C y ahí se mantiene durante la fusión, para lo cual, se agregan 0.8 ml de PEG al 50% precalentado a 40°C, resuspendiendo las células continuamente con una pipeta Pasteur; se continúa resuspendiendo y agitando las células en el PEG por un intervalo comprendido entre 1.5 y 2 minutos más. Para entonces la aglutinación de células debe ser evidente; con la misma pipeta se agrega 1 ml de DMM, que se toma de otro tubo que contiene 10 ml de DMM a 37°C, agitando continuamente por un tiempo aproximado de 1 minuto, esta etapa se repite tres veces, sólo que en la última se agrega el medio en 30 segundos. Posteriormente, se agrega el volumen

restante de los 10 ml de DMM que se encuentra en el tubo, durante un período de 10 minutos, agitando continuamente; se adiciona gota a gota, entre 12 y 13 ml de DMM precalentado. Se centrifuga nuevamente en las condiciones anteriormente descritas y se desecha el sobrenadante, se suspende el sedimento golpeando suavemente el fondo del tubo y se resuspende en 49 ml de FCS/DMM al 20%.

#### 2.2.8. Aislamiento de Clonas.

A continuación se aíslan las clonas de células híbridas por dilución limitante.

Se distribuye la suspensión fusionada en dos placas de 40 pozos (estos pueden contener una capa alimentadora celular de fibroblastos); se agrega 1 ml adicional de FCS-DMM al 20%, en caso de no usar la capa alimentadora celular de fibroblastos (feeder cell) que son células que pueden metabolizar pero no pueden duplicarse y que facilitan enormemente el crecimiento de los híbridos; entonces se agregan 10 células de bazo por ml (preparadas como se indicó en el apartado 2.2.5) y se incuban durante toda la noche a 37°C en una cámara con atmósfera de CO controlada; se elimina 1 ml de medio de cultivo de cada recipiente con una pipeta Pasteur, sin resuspender el sedimento de células que está en el fondo de los pozos (33).

#### 2.2.9 Selección de Clonas.

En virtud de que no todas las clonas generan los

anticuerpos deseados se seleccionan aquellas que sean de interés, existen dos formas generales para detectar la presencia de híbridos que secretan anticuerpos, la primera en base a la determinación de anticuerpos en los sobrenadantes de cultivo en desarrollo y la segunda, que detecta directamente la presencia de anticuerpos en el microambiente de células aisladas o clonas de células desarrolladas en un medio semisólido (Técnica de Jerne).

De entre los primeros los más usados son los ensayos de unión indirecta, los ensayos inmunoenzimáticos, pruebas de hemaglutinación o ensayos de fijación de complemento y los ensayos de neutralización de la actividad biológica del antígeno, la forma más sencilla es agregar sobrenadante de cultivo individual a un antígeno preparado, biológicamente activo, después de un cierto tiempo de incubación, si se presenta una disminución de la actividad biológica se considera como una evidencia de anticuerpos inhibidores. (29,33).

#### 2.2.10 Clonación.

Al tener varias clonas en un solo cultivo se presenta competencia para crecer en el medio de cultivo y, segregación de cromosomas lo cual puede atentar a la estabilidad de la expresión, por lo tanto es recomendable clonar tan pronto como sea posible.

Además se recomienda que si se tienen sólo unos cuantos cultivos positivos es útil subdividirlos por dilución



limitante, de preferencia usando una capa alimentadora de células y al mismo tiempo clonar.

La clonación de células híbridas se puede llevar a cabo por al menos los siguientes procedimientos: clonación en soportes semisólidos y clonación por dilución limitante.

Las células se pueden clonar por desarrollo en agar suave generalmente usando dos capas: una capa inferior, que es firme y tiene 0.5% (w/v) de agar en medio de cultivo, se deja gelificar; se agrega una segunda capa de agar suave (0.3% de agar) que contiene las células que serán clonadas. Si se usa una capa alimentadora de células éstas deben prepararse con anterioridad y el medio de cultivo debe eliminarse precisamente antes de la adición de la capa de agar inferior.

Para clonar en agar generalmente se requiere de recultivar en un medio líquido antes de evaluar la producción de anticuerpos. A diferencia, la clonación por dilución limitante permite examinar directamente los sobrenadantes.

Se recomienda la clonación por dilución limitante, ya que la eficiencia de este método es en ocasiones del 100% (especialmente en caso de aislamientos de híbridos nuevos), y aún cuando la eficiencia es menor puede mejorarse por la adición de capas alimentadoras de células.

Las colonias microscópicas, se hacen visibles al observar la superficie inferior de la placa 1 a 2 semanas después de comenzar la clonación, el grupo donde la mitad de los pozos muestren desarrollo pueden contener clonas únicas.

Las clonas deben ser analizadas tan pronto como sean visibles aunque sobrevivirán y crecerán todavía después de este momento y hasta por varios días más. En la primer clonación sólo se monitorean los pozos con crecimiento que pueden ser activos, sin embargo, se recomienda una segunda clonación dado que una sola no garantiza la monoclonalidad.

Además se han descrito otras técnicas como la clonación usando células activadas con fluorescencia (Parks y col 1979), con la cual es posible seleccionar células que se unen al antígeno con alta especificidad. Esta técnica también conocida como FACS se ha innovado usando microesferas hidrofílicas de alta fluorescencia que pueden unirse al antígeno para detectar células secretoras de anticuerpos que poseen pequeñas cantidades de inmunoglobulina de membrana (33).

#### 2.2.11 Selección de Clonas Positivas.

Las clonas en desarrollo en soportes semisólidos se identifican por métodos directos tales como adsorber el antígeno a microesferas fluorescentes.

Cuando las células se desarrollan en soportes semisólidos de agarosa, el anticuerpo secretado por la célula es ligeramente difuso, así se detecta in situ. Otros métodos consisten en adsorber el anticuerpo secretado en filtros de nitrocelulosa revestidos con antígeno o antiinmunoglobulina. Otros métodos incluyen la incorporación de antígenos marcados.

En caso de no ser posible la determinación directa

de clonas positivas, se sugiere tomarlas al azar en número representativo, si ninguna es positiva es muy posible que exista una gran cantidad de clonas negativas compitiendo con las positivas, entonces se recomienda detectar clonas positivas por métodos directos recubriendo eritrocitos con anticuerpos antiinmunoglobulina previamente purificados por cromatografía de afinidad o usando proteína A (29,33).

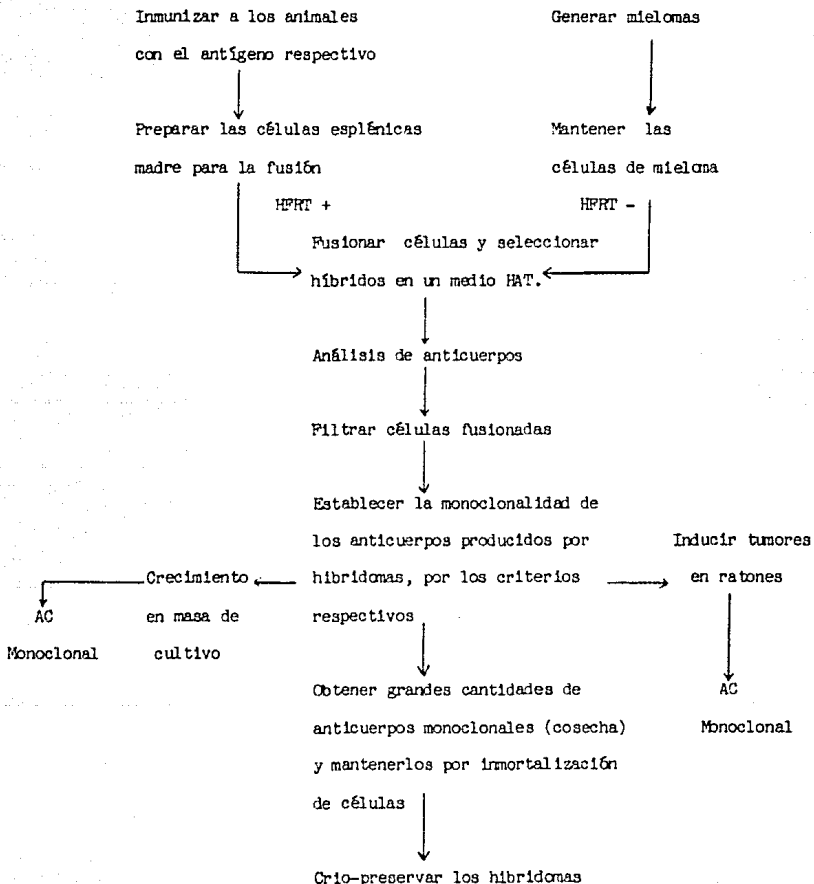
### 2.3 MEJORAS AL PROCEDIMIENTO TRADICIONAL PARA LA OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Se han efectuado varios cambios al procedimiento original (29,33), sin embargo, no todos han resultado ser críticos para mejorar la especificidad y la sensibilidad de los anticuerpos monoclonales. De entre las variaciones más relevantes se encuentran las siguientes:

1. El polietilenglicol se utiliza en esta técnica para fusionar las líneas de células, una productora de anticuerpos y otra con una alteración de médula ósea para producir hibridomas en los animales de prueba. Una de las modificaciones a los procedimientos antes descritos es la adición de dimetilsulfóxido al polietilenglicol.

Por otro lado se sabe que el polietilenglicol puede dañar las células. Por lo tanto, es muy importante usar este producto en una proporción y tiempo óptimos. Una modificación adicional al procedimiento antes descrito se refiere a la optimización en tiempo de uso del polietilenglicol y a los

PROCEDIMIENTOS PARA LA OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES (91)



cambios en su concentración.

2. Asimismo se puede incluir al procedimiento tradicional, la centrifugación de los tubos, para favorecer la cuantitividad de las reacciones.

3. También ha sido importante la variación de la proporción de células de bazo/células de mieloma para optimizar la fusión de estas líneas celulares y crear así el hibridoma, lo cual es un paso de extrema importancia para generar anticuerpos monoclonales.

4. A diferencia de lo que se señaló en la descripción de la técnica, en el apartado (2.2), no es indispensable fraccionar las células después de la fusión. Sin embargo, en algunos procedimientos alternativos, en lugar de fraccionar se prefiere aumentar el número de microcultivos en placa para clonar directamente sobre agar semisólido. Tanto el fraccionamiento, como la clonación directa, son en sí variaciones al procedimiento original, en el cual simplemente se clonaban las células.

5. Para asegurar un buen desarrollo de células es posible adicionar capas alimentadoras de células, que es una más de las modificaciones mas relevantes al procedimiento original.

Para la fusión misma, la célula alimentadora más simple, aunque no necesariamente la mejor, es aquella célula que se usó para la fusión.

Otros investigadores han recomendado el uso de otras

células normales, tales como timocitos y macrófagos. Es objetable y a veces menos conveniente. Una buena alternativa como célula alimentadora es usar los fibroblastos irradiados, aunque con todas las células que se han usado se han obtenido resultados aceptables, que pueden obtenerse de la mayoría de muestras de cultivos de tejidos y donadores.

6. Aunque no se considera como una mejora, sí se toma como una alternativa la utilización de células de ganglios linfáticos en lugar de las células de bazo, que generalmente se utilizan en estos procedimientos.

### CAPITULO III

## DIAGNOSTICO DE ALGUNAS ENFERMEDADES POR MEDIO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

### 3.1 TRACTO GENITO-URINARIO

La incidencia de la gonorrea se encuentra en niveles inaceptablemente altos (119), sobre todo en países subdesarrollados, lo cual indica la necesidad de mejorar el diagnóstico, el control y el tratamiento de esta enfermedad.

La identificación rápida de N. gonorrhoeae puede hacerse por varios métodos. Algunos incluyen la utilización de carbohidratos por medio de enzimas preformadas o bien sintetizadas durante el crecimiento de Neisseria, con procedimientos radiométricos, cromogénicos e inmunológicos, entre los que se incluyen la coagulación con anticuerpos policlonales, con anticuerpos monoclonales murinos, o con anticuerpos policlonales marcados con fluoresceína, que permiten toda una identificación rápida y precisa de Neisseria gonorrhoeae.

Virji y Heckels (105) citan que el pili tiene un papel muy importante en la patogénesis de la gonorrea, interviene en la adhesión de los gonococos a las células epiteliales e interfiere con la fagocitosis de los leucocitos polimorfonucleares. Recientemente, se ha demostrado que el pili de los gonococos de una cepa dada puede variar antigénicamente. Diferentes variantes de la cepa P9 producen uno de los pilis alfa, beta, gama o delta con subunidades de 19.5, 20.5, 21, y

18.5 Kd respectivamente mismos que se han aislado. Estos pili son antigénicamente distintos y muestran diferencias en su capacidad para pegarse a varias células epiteliales.

También, se ha observado que los anticuerpos específicos al pili son protectores. Sin embargo, las variaciones antigénicas se producen en el desafío con gonococos que producen pili con subunidades de peso molecular diferente. Se ha demostrado que el pili de variantes de cepas P9 contiene varios sitios antigénicos distintos y que al menos uno de estos sitios lo comparten todos los pili P9 y parecen tener más de un epítipo específico al tipo (106). En base a estas observaciones se sugiere que la región variable del pili contiene un mosaico de epítopes que contribuye a la especificidad del pili.

Según Meyer y col (62), los mecanismos genéticos que controlan la variación del pili aún se desconocen, aunque parecen involucrar un rearrreglo de cromosomas. Un modelo para explicar la variación del pili, involucraría un número limitado de genes ampliamente distribuidos entre las cepas de los gonococos, cada una de ellas capaz de regular la producción de un pili correspondiente a los siguientes alfa, beta, gama ó delta de la cepa P9. Sin embargo, Brinton y col (9) consideran que la realidad es bastante más compleja, ya que los epítopes presentes en el pili muestran reactividad cruzada con pilis enteramente diferentes que provienen de otras cepas, además de que los pilis con epítopes en común, tienen subunidades con pesos moleculares muy diferentes.



Estas observaciones sugieren que la especificidad del pili está determinada por una combinación particular de un enorme número de posibles epítopes, algunos de los cuales pueden estar compartidos al azar entre otras cepas. Seis de los ocho anticuerpos con especificidad al tipo P9 no reaccionaron con ninguna de las cepas examinadas.

Fletcher y col (23) produjeron anticuerpos monoclonales, que reaccionaban contra la proteína I de la membrana externa de Neisseria gonorrhoeae cepa P9. La proteína mayor (PI) es abundante, al parecer no cambia antigénicamente y es esencial para la viabilidad de la bacteria y juega un papel muy importante en el mantenimiento de la estructura y función de la membrana externa.

Cabe señalar que los gonococos se clasificaron en función de sus resultados con los patrones de inmunofluorescencia en 3 grupos: A, B y C; posteriormente, por coaglutinación se dividieron en WI, WII y WIII. A últimas fechas se investigaron tratando las cepas con enzimas y se encontró que las del subgrupo WI expresan una proteína que se conoce como (PIA) y que las de los subgrupos WII y WIII están muy relacionadas y expresan la proteína (PIB).

Las dos proteínas son muy diferentes en su estructura primaria y organización en la membrana externa. Aún entre serovariedades que tienen PIA hay una homología limitada entre ellos.

La mayor parte de la PIA está dentro de la membrana,

por eso resiste ataques enzimáticos y sólo una porción terminal está expuesta en la superficie, a diferencia de la PIB en la cual ambas regiones terminales se localizan en la membrana y una porción central se expone en la superficie y, por lo tanto, es susceptible a ataques enzimáticos.

Las diferencias entre las dos clases de PI se reflejan en su reactividad con anticuerpos monoclonales. En este estudio, ningún anticuerpo monoclonal obtenido por inmunización con membrana externa que contenía PIB (sensible a proteasa) reaccionó con cepas que expresaban PIA (resistente a proteasa), cuatro anticuerpos monoclonales reaccionaron con epítopes presentes en un número limitado de cepas PIB; un anticuerpo monoclonal denominado SM24 resultó ser de interés especial ya que reaccionó con todas las cepas PIB indicando así la presencia de un epítopo altamente conservado en esta proteína.

También se investigó la proximidad de los epítopes reconocidos por radioinmunoensayos. Estudios similares con anticuerpos monoclonales frente al pili de gonococos, han revelado la existencia de epítopes variables y otros conservados que están en dominios diferentes.

Usando el modelo del epítopo conservado reconocido por el anticuerpo monoclonal SM24, se ve que sería el más superficialmente expuesto y se ubica dentro de la región variable que contiene otros epítopes que determinan la especificidad de la PIB al serotipo. Otra posibilidad es que la unión de un anticuerpo podría inducir cambios conformacionales que afectan

la unión de un segundo anticuerpo hasta una distancia determinada. La reactividad del SM24 con la PIB de la cepa P9, sin que ésta se haya sometido a tratamiento enzimático, demuestra que no reacciona el anticuerpo ni con el fragmento de 15 ni con el de 22 Kd, que se generan cuando se somete la PIB a ataques enzimáticos. Asimismo, el sitio primario del tratamiento también primario con tripsina, produjo un fragmento reactivo que tampoco reaccionó, aunque se esperaba que en éste se encontrara el epítoto conservado.

Así, la posición del epítoto con el que reacciona el SM24, se localiza dentro de una región expuesta en la superficie de la PIB en el sitio de ataque de la quimi tripsina o cerca de éste.

La importancia de conocer tanto la disposición como al determinante conservado en la proteína mayor de superficie, radica en el poder tener o conocer un blanco potencial para una vacuna.

Posteriormente, Virji y col (107) encontraron que la virulencia de la variante P9-17 para células epiteliales en cultivo de tejido, disminuía en presencia de tres de los cuatro anticuerpos que reconocen epítotos específicos de tipo. De manera similar, la virulencia del P9-17 se redujo en presencia de un anticuerpo, que reaccionó con un epítoto presente o conservado en varias cepas. Todos los anticuerpos específicos de tipo fueron opsónicos para variantes P9, aunque sólo dos de ellos mediaban la lisis dependiente de complemento.

Los resultados, según los autores, indican que los anticuerpos contra determinantes antigénicos cercanos entre sí, que se encuentran en la proteína I, varían en sus actividades biológicas y que los epítopes que se conservan reconocidos, los identifica el anticuerpo SM24, por lo cual esos epítopes son un blanco potencialmente efectivo en la superficie del gonococo para la inmunoprofilaxis.

En este estudio, los anticuerpos generados parecen haber sido efectivos a tres niveles, produciendo inmunidad en las mucosas para poder prevenir invasiones iniciales de células epiteliales, generando defensas bactericidas mediadas por complemento y presentando fagocitosis que puede ser activada por estos anticuerpos.

La observación más importante, según el autor, fue que un anticuerpo monoclonal que produce reacciones cruzadas, es efectivo con los tres mecanismos protectores estudiados, ya que reconoce más del 40% de los aislamientos clínicos; al parecer, el antígeno peptídico de la proteína IB del gonococo podría ser un buen candidato para una vacuna multicomponente que necesariamente debería incluir también un componente común contra la proteína IA, aunque se requiere seguir estudiando para conocer el papel de los anticuerpos monoclonales con antigenicidad cruzada contra la proteína IA.

Carlson y col (13) reportan que aunque no pudieron encontrar ningún microorganismo que produjera reacciones cruzadas con el examen Phadebact GC D'INI, dicen estar conscientes de

que otros laboratorios han encontrado una especificidad inferior al 100% con esta prueba, aunque Neisseria saprofitas, produjeron reacciones consistentemente negativas.

El reactivo OMNI consiste de reactivo control y un reactivo de prueba que incluye anticuerpos monoclonales 1A y 1B unidos a especies no viables de estafilococos. Por lo tanto, el reactivo es una mezcla de anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos a diferentes epítopes de una proteína de la membrana específica del gonococo, la proteína I (PI).

Se enfatiza y se centra la importancia del examen en la concentración del antígeno y el pH de la solución salina usada para preparar la suspensión de bacterias, que según se puntualiza son de extrema importancia para asegurar la especificidad y la sensibilidad del método.

La reacción se lleva a cabo a un pH óptimo de 7.4, puesto que a pH ácido N. gonorrhoeae podría causar reactividad cruzada con otras especies de este género y, por lo tanto, falsos positivos. También se citan otros parámetros que se deben considerar, como la concentración de microorganismos, para no alterar la especificidad de la prueba.

Concluyen que la prueba Phadebact con anticuerpos monoclonales también llamada GC OMNI tiene una sensibilidad del 98.4% y una especificidad del 100%; que es útil para identificar N. gonorrhoeae comparando esta prueba con las técnicas confirmativas convencionales para estandarizar tanto la técnica como su interpretación.

Laughon y col (53) evaluaron un reactivo con anticuerpos monoclonales fluorescentes para confirmar la presencia de N. gonorrhoeae a partir de aislamientos obtenidos de pacientes con enfermedades transmitidas sexualmente en 4 ciudades. Este estudio se realizó en paralelo con la prueba confirmativa clásica de producción de ácido a partir de azúcares.

El reactivo con anticuerpos fluorescentes resultó ser rápido y específico; además de que la prueba se practicó directamente desde un primer aislamiento, requiere sólo de 1 hora y es útil para evitar subcultivos de la muestra.

Ninguna cepa de bacterias o levaduras contaminantes desarrollando en el medio de Thayer Martin Modificado (MTM) reaccionó con el anticuerpo monoclonal fluorescente; además, no se encontró reactividad cruzada con otras especies del género Neisseria, por lo cual al anticuerpo monoclonal se le atribuye una especificidad del 100%.

Esta técnica de anticuerpos monoclonales fluorescentes puede ser una alternativa al empleo del método de producción de ácido a partir de carbohidratos.

Se incluyó una observación por microscopía a inmersión para observar los diplococos típicos de forma arriñonada, la microscopía aumentó el nivel de confianza, sobre el de los sustratos cromogénicos a los que pueden degradar enzimas de bacterias contaminantes que podrían afectar la lectura.

Aunque este estudio evaluó principalmente el uso del anticuerpo monoclonal fluorescente para confirmar el aislamiento

to de un agente causante de una enfermedad transmitida sexualmente por medio del cultivo, sirvió también para ver la especificidad del anticuerpo monoclonal ante muestras obtenidas en sitios que no contienen moco (sangre, líquido sinovial, líquido cefalo-raquídeo, etc.) o en niños que requerían evaluación.

No obstante las ventajas mencionadas, el reactivo de anticuerpos monoclonales fluorescentes es caro, en 1987, un frasco de 3 ml costaba 275.00 US Dlls.

Asimismo, en un trabajo realizado por Welch y Cartwright (113) se reporta la evaluación de un anticuerpo monoclonal fluorescente para identificar Neisseria gonorrhoeae en cultivos, comparándose con las pruebas de utilización de azúcares y otros métodos convencionales.

En base a dichos métodos convencionales se realizó un monitoreo de las capacidades de estas metodologías para identificar cultivos puros y contaminados de N. gonorrhoeae, en comparación con el que emplea anticuerpos monoclonales, que fue claramente superior a los convencionales pues mostró una especificidad del 97 y 96% para cultivos puros y contaminados con otras bacterias, respectivamente.

Los autores sugieren que la alta especificidad observada puede deberse parcialmente al reconocimiento de epítopes únicos en los antígenos PIA y PIB de las proteínas de la membrana externa mayor, que se encuentran sólo en N. gonorrhoeae.

Además, según se cita, son pocas las casas comerciales que ofrecen el anticuerpo monoclonal para identificar a

este microorganismo. Concluyen que el anticuerpo monoclonal en cuestión y su aplicación, son en sí un método rápido para identificar a N. gonorrhoeae (30 minutos). Otra ventaja de este método es que no se observa reactividad cruzada aparente con otras especies de este género inclusive Branhamella catarrhalis. En vista de lo anterior se concluye que esta metodología y el reactivo empleado, son apropiados para la determinación de gonococos en muestras clínicas.

Dillon y col (17) evaluaron los problemas tradicionalmente asociados a los exámenes confirmativos basados en la degradación de carbohidratos, que se resolvieron con el desarrollo de nuevas técnicas basadas en la presencia de enzimas sintetizadas por Neisseria gonorrhoeae para degradar carbohidratos o para usar sustratos cromogénicos.

Mencionan que entre 8 metodologías evaluadas en su estudio, el mejor fue el Syva Microtrak, que se vale de anticuerpos monoclonales fluorescentes y que resultó ser el más específico y sensible aunque involucra altos costos por el requerimiento de un microscopio de fluorescencia.

Además, citan que no se produjeron reacciones cruzadas con otros microorganismos. Encontraron sólo un aislamiento de meningococo que produjo un resultado falso-positivo, lo cual, asumen que era de esperarse dado que puede haber evolución de cepas que incluyen epítopes nuevos. Sin embargo, el reactivo que actualmente se usa tiene una mejora respecto al



antiguo que utilizaba anticuerpos policlonales, mientras que el actual se basa en el empleo de una mezcla de anticuerpos monoclonales dirigidos a la proteína I de N. gonorrhoeae.

Con el reactivo original se producían reacciones cruzadas con N. lactamica, misma que aún es un problema, aunque cada vez menos grave; algunas cepas de N. cinerea y otras de B. catarrhalis también produjeron reacciones que podrían considerarse positivas.

Como se mencionó, hasta la fecha N. cinerea produce reacciones típicas, inclusive con la mezcla de anticuerpos monoclonales, por lo cual puede confundirse con N. gonorrhoeae.

Se ha sugerido que para diferenciar entre una y otra Neisseria se deben monitorear con reactivos serológicos específicos a la especie patógena, determinar su susceptibilidad a colistin o por el desarrollo en Agar Soya Tripticase o Agar Mueller Hinton a una temperatura entre 22 y 25°C. En este trabajo también se confirmó que ninguna cepa N. cinerea fue resistente al colistin y que todas las cepas desarrollaron en ambos medios de cultivo a 25°C. N. cinerea no produce reacciones cruzadas con el Syva Microtrak.

Finalmente, el autor concluye que es conveniente incluir toda una batería de pruebas para evitar errores en la identificación de N. gonorrhoeae, sobre todo en aquellos casos en que cualquier grado de error es marginalmente inaceptable (casos de niños víctimas de abuso sexual).

Anand y col (2) en su confirmación serológica de

procedimientos de coagulación basados en anticuerpos monoclonales para identificar Neisseria gonorrhoeae, comparan un examen conocido como PMGOT que emplea un reactivo con una mezcla de anticuerpos monoclonales murinos, dirigidos contra las proteínas PIA y PIB usadas para revestir células de Staphylococcus aureus que coaglutina los serogrupos W1 y W11/W111, respectivamente. Con otros equipos, también basados en coagulación como es el Gono-gen (GG), se utiliza igualmente una mezcla de anticuerpos monoclonales preparados contra los antígenos de la proteína I de la membrana externa purificada de N. gonorrhoeae y es un examen de coagulación.

Los autores encontraron que las sensibilidades del reactivo PMGOT y del GG fueron de 99.2 y 98.7%, respectivamente, las especificidades de 91.5 y 100%, respectivamente. Se observaron reacciones falsas-positivas con N. lactamica y N. meningitidis al usar el reactivo PMGOT, por lo cual se modificó la técnica sustituyendo la solución salina por caldo Todd Hewitt para preparar la suspensión del microorganismo, mejorándose así la sensibilidad y especificidad del reactivo PMGOT a un 99.3 y 100%, respectivamente.

Las ventajas del PMGOT con respecto al GG obtenidas con esta mejora son: un costo menor y mayor facilidad para leer la prueba. Se confirmó la sensibilidad obtenida por otros autores (13,17), quienes observaron que ambos reactivos presentan problemas para identificar ciertos aislamientos de N. gonorrhoeae, aunque no fueron los mismos en uno y otro caso.

Explican que esto es lógico, pues en las pruebas comparadas se usan anticuerpos monoclonales dirigidos a epítopes específicos que pueden no encontrarse en todas las cepas de N. gonorrhoeae aisladas de diferentes zonas geográficas.

Así, Anand y col (2) concluyen que la sensibilidad obtenida varía con respecto a la que se cita en otros estudios (13), aunque es similar a la obtenida por Dillon (17). Sugiere además, que las reacciones falsas-positivas con N. lactamica y N. meningitidis fueron consistentes en cultivos primarios.

Finalmente, se concluye que en vista de que existen aislamientos que ocasionalmente podrían no ser identificados por las pruebas con anticuerpos monoclonales, el personal de laboratorio debe ser en extremo suspicaz cuando aisle colonias con morfología típica de N. gonorrhoeae para examinarlas además con métodos alternativos, sobre todo si las pruebas con anticuerpos monoclonales resultan negativas.

Rajasekariah y col (74) en su reporte sobre la determinación directa de Neisseria gonorrhoeae con anticuerpos monoclonales serotificadores, produjeron un nuevo reactivo que involucra a 14 anticuerpos monoclonales inmunofluorescentes dirigidos contra la proteína de la membrana externa mayor de la bacteria (PI), empleados para identificar diferentes serovariedades de distintas cepas entre las que se encuentran cepas W1 y W11/111.

Se encontró que este reactivo tiene un importante potencial para reconocer las diferentes serovariedades de las

cepas patógenas de N. gonorrhoeae. También quedó claro que existe una gran diversidad de serovariedades entre los aislamientos de gonococos, especialmente en cepas del grupo W11/111. Además, se considera que la bacteria puede variar la estructura antigénica de las proteínas de su membrana externa, lo que aunado al estado dinámico, resultado de factores intrínsecos del mismo microorganismo, así como los factores ambientales a los que se somete al hospedador, conllevan a la aparición de nuevas serovariedades.

Otro factor que complica el diagnóstico es la variabilidad de la distribución de las serovariedades en diferentes regiones geográficas.

Los resultados en este reporte sugieren que es necesario seguir evaluando la configuración antigénica de las cepas infectantes de gonococos más frecuentes, para mantener la sensibilidad de las pruebas, e igualmente seleccionar y seguir evaluando los métodos de diagnóstico con anticuerpos monoclonales.

Ridderhof y col (77) compararon un anticuerpo monoclonal fluorescente y una sonda de ADN para identificar Neisseria gonorrhoeae en primoaislamientos, encontrando que el primero tuvo una sensibilidad del 94% y una especificidad del 100%, es decir suficiente para identificar N. gonorrhoeae, en primoaislamiento de muestras genitales, mientras que la sonda de ADN tuvo una sensibilidad del 95% y una especificidad inadecuada (65%) para ser considerada una prueba confirmativa.

Esta diferencia en los resultados de dos pruebas que generalmente se usan como pruebas confirmativas, se debió a que las muestras de bacterias diferentes a N. gonorrhoeae fueron negativas con el anticuerpo monoclonal fluorescente (100% específico). Sin embargo, con la sonda de ADN, resultaron positivas 14 muestras que no corresponden a N. gonorrhoeae. En vista de la baja especificidad de la sonda de ADN para examinar rutinariamente cultivos del primo-aislamiento, sospechosos de ser N. gonorrhoeae, este producto ya se retiró del mercado y se conservó el examen con anticuerpos monoclonales fluorescentes, al que se le llama Syva test.

El Syva test ha resultado de buenas características (sensibilidad y especificidad) empero ya se han encontrado y documentado resultados falsos negativos, sobre todo en ciertas áreas geográficas, por lo cual se recomienda complementar con cultivos subsecuentes para identificar bien a la bacteria.

Saunders y col (92) generaron líneas de hibridomas que producían anticuerpos monoclonales para identificar antígenos de Treponema pallidum, algunos de los cuales reconocieron antígenos de género en T. pallidum (Nichols), T. pallidum cepa 14 (recientemente establecida) y T. phagedenis biotipo Reiter. Los anticuerpos monoclonales se evaluaron y caracterizaron mediante ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA), que pueden alterar los antígenos de conejos tratados con cortisona.

Por su parte Strugnell y col (95) encontraron que es posible que los antígenos del hospedero reaccionen con los de

T. pallidum e induzcan una respuesta autoinmune en él. Estos fenómenos se detectan particularmente cuando hay daño celular aparente en los tejidos del hospedero, o cuando los antígenos de éste se pegan a la superficie de la bacteria, transportándose así.

En la mayor parte del estudio (32), se obtuvo una buena correlación entre los resultados de ELISA y los de RIA, sin embargo, varias clonas mostraron mayor reactividad con RIA que con ELISA. Algunos anticuerpos monoclonales mostraron reactividad en contra de T. phagedenis biotipo Reiter por RIA; no obstante que con ELISA se tuvo una actividad mínima, esto no es poco común, ya que como se sabe, ambas cepas comparten algunos determinantes antigénicos, tal como lo describieron Robertson y col (78), quienes utilizaron métodos ligeramente diferentes para desarrollar anticuerpos monoclonales e identificar a T. pallidum encontrando reacciones cruzadas con T. phagedenis biotipo Reiter. Lo anterior indica que los anticuerpos detectan antígenos comunes en más de una cepa de T. pallidum, pero no detectan antígenos que son únicos para la cepa Nichols y que es posible utilizar anticuerpos monoclonales para identificar y purificar componentes de superficie específicos de T. pallidum.

Hansen y Loftus (38) aislaron hibridomas que secretaban anticuerpos monoclonales dirigidos contra Haemophilus ducreyi. Solamente dos de estos anticuerpos monoclonales reconocieron a todas las cepas de H. ducreyi de un grupo de 12 probadas a la fecha, y fueron capaces de determinar la presencia

de este microorganismo en lesiones de piel producidas en animales experimentales.

Los autores utilizaron un sistema de radioinmunoensayo para evaluar estos anticuerpos monoclonales y emplearlos para el diagnóstico potencial. Los dos anticuerpos monoclonales determinaron rápidamente la presencia de H. ducreyi en el material de la lesión; sin embargo, no reaccionaron con T. pallidum purificado ni con tejido testicular de conejos con orquitis inducida por T. pallidum. Además, uno de los dos anticuerpos monoclonales no discriminó cepas de H. influenzae de H. parainfluenzae, que pueden ser parte de la flora genital normal en humanos.

Los autores enfatizan que la técnica usada para la detección de H. ducreyi en este estudio, no representa una única modalidad del uso de anticuerpos monoclonales en pruebas de diagnóstico, sino que debe ser posible usarlos para desarrollar técnicas de inmunofluorescencia, tanto directas como indirectas o preferiblemente técnicas más simples, tan precisas como la coaglutinación. Finalmente, concluyen que con la introducción de anticuerpos monoclonales específicos de H. ducreyi simultáneamente, se incrementa la sensibilidad del método.

Schwartzman y Krug (93) demostraron la utilidad de los anticuerpos monoclonales específicos frente a la beta-tubulina para identificar microtúbulos de flagelo de Trichomonas vaginalis, encontrando lo que parece ser una reacción cruzada entre la beta-tubulina del flagelo de T. vaginalis y la de

mamíferos, y reportan una serie de anticuerpos monoclonales que anteriormente mostraron especificidad frente a la beta-tubulina de mamíferos, en la cual los autores dicen haber demostrado la determinación de microtúbulos subpeliculares y flagelares de Leishmania donovani y Toxoplasma gondii, mencionando que no todos reaccionan con microtúbulos de poblaciones de T. vaginalis. Cuando se fijó T. vaginalis con formaldehído al 2% antes de la extracción de la membrana, se obtuvo un patrón reticular de fluorescencia en el citoplasma, acentuado a lo largo de los márgenes lateral y anterior del área nuclear, pero el mismo núcleo aparece como un área clara, ningún anticuerpo tiñó al flagelo, aún cuando el flagelo anterior estaba claramente presente como se demostró por la microscopía de contraste.

Se procedió a la extracción de la membrana del parásito, disolviéndola y conservando el citoesqueleto; sin embargo aún bajo estas condiciones, no fue posible detectar el flagelo con anticuerpos monoclonales, ni el citoesqueleto axial, sin detectar el patrón fluorescente citoplásmico, pero sí se observaron, el axostilo, el filamento parabasal, la costa, el flagelo recurrente y cuatro flagelos anteriores.

Los autores sugieren que la tubulina de T. vaginalis muestra epítopes que varían con respecto a los de la tubulina de T. gondii y L. donovani como se reconoció con esta serie de anticuerpos monoclonales. Sólo dos anticuerpos identificaron el citoesqueleto axial y el flagelo, a diferencia de sus



descubrimientos anteriores con L. donovani y T. gondii en que los 7 anticuerpos monoclonales que usaron parecen haber reconocido las mismas poblaciones de microtúbulos por inmunofluorescencia y por inmunotransferencia. La correlación morfológica de las estructuras citoplásmicas específicas determinadas por los 5 anticuerpos que no reconocieron los microtúbulos axiales, no está clara.

El patrón reticular podría no corresponder a los microtúbulos en vista de los hallazgos de la inmuno-electrotransferencia de los 5 anticuerpos que tiñeron el citoplasma. Parece ser que en L. donovani la subunidad puede reconocerse como en T. vaginalis, el epítotope reconocido por los anticuerpos que tiñeron el citoplasma podría ser otra proteína citoplásmica. Las pruebas de inmunofluorescencia e inmunotransferencia sugieren que el epítotope puede estar localizado en una proteína asociada al microtúbulo, lo cual explicaría la diferencia en la distribución de la tinción fluorescente.

En vista de que ya se había demostrado la especificidad de estos anticuerpos por la tubulina de mamíferos en otros experimentos, es posible que los epítopes relacionados con la tubulina en otros componentes del citoesqueleto se reconozcan en T. vaginalis.

Finalmente, los autores concluyen que el citoesqueleto de T. vaginalis es antigénicamente distinto del observado en L. donovani y T. gondii.

Fohn y col (24), en su reporte sobre la producción y

caracterización de anticuerpos monoclonales dirigidos a Mobiluncus sp. -que son bacilos curvos, móviles, asociados con vaginosis bacteriana-, una vez producidos se caracterizaron por ensayos inmunoenzimáticos y por inmunofluorescencia indirecta.

Con el empleo de anticuerpos monoclonales identificaron aislamientos clínicos de M. curtisii y M. mulieris de 25 pacientes con vaginosis bacteriana. La sensibilidad y especificidad de la mezcla de anticuerpos fue de 100% para M. curtisii; 8 de 9 (89%) de aislamientos de M. mulieris y un aislamiento de M. curtisii reaccionaron con anticuerpos dirigidos a M. mulieris (94%), por lo cual, se sugiere que comparten algunos determinantes antigénicos.

Sin embargo, los autores consideran que en vista del número relativamente bajo de muestras, se debe examinar un número mayor, sobre todo provenientes de otras regiones geográficas, para estudiar su comportamiento y determinar la sensibilidad y especificidad de la mezcla de anticuerpos monoclonales en otras áreas.

Por otro lado, los autores señalan que los estudios de hibridización de ADN han demostrado una homología mínima entre M. curtisii y M. mulieris, (9 a 25%) mientras que hay un grado de homología mucho mayor (75%) entre M. curtisii subespecie curtisii y M. curtisii subespecie holmesii.

El perfil protéico no fue capaz de diferenciar las subespecies de M. curtisii; pero se definió un epítoto común a las 2 subespecies con 3 anticuerpos monoclonales. El epítoto

en M. curtisii puede ser desnaturalizado y por ello no reaccionar en inmunotransferencia.

M. mulieris es morfológica, bioquímica, antigénica y genéticamente distinto de M. curtisii, ya que 4 anticuerpos monoclonales fueron específicos para estas especies y se unieron a una molécula de 93 Kd y, en menor grado, a otra molécula de 87 Kd.

La molécula de 93 Kd parece estar presente en las 2 especies, aunque se desconoce el peso molecular de M. curtisii subespecie holmessi.

En conclusión, los anticuerpos monoclonales identificaron especies y subespecies, así como antígenos compartidos de Mobiluncus. Su utilidad potencial incluye la identificación directa del microorganismo en muestras de vagina para determinar la frecuencia verdadera de Mobiluncus sp. Además, se requiere caracterizar los antígenos de Mobiluncus para elucidar su papel en la patogenicidad.

Stamm y col (88) efectuaron una comparación de dos métodos para identificar inclusiones de Chlamydia trachomatis en un cultivo en monocapa de células Mc Coy; por un lado, la tinción de yodo convencional y, por otro, la tinción con anticuerpos monoclonales fluorescentes dirigidos contra el antígeno proteico de la membrana externa mayor, específica de C. trachomatis. Los autores reportan que con el métodos de tinción inmunofluorescente se determinaron 8 veces más inclusiones por monocapa es decir, que es un método más sensible, y también

más rápido que los métodos convencionales, ya que con él se identificaron prácticamente todas las muestras positivas en el primer aislamiento y al eliminar el segundo paso, se disminuyó el tiempo en aproximadamente un 30%.

Stephens y col (89) compararon la tinción de inmunofluorescencia con la tinción de Giemsa y descubrieron que con la técnica de inmunofluorescencia había un aumento al cuádruple de las cuentas de inclusiones y por lo mismo se mejoraba la sensibilidad, particularmente en las muestras con una cuenta de inclusiones baja, ya que si éstas carecen de glucógeno no se tiñen. Aunque no explican completamente en qué radica la superioridad del método de inmunofluorescencia con respecto a la tinción de Giemsa o la tinción con yodo.

Por otro lado, Thomas y col (98), en una tinción inmunofluorescente con anticuerpos procedentes de un paciente con linfogranuloma venéreo, también encontraron más inclusiones por muestra, comparado con la tinción de Giemsa. A diferencia del trabajo reportado por Darougar y col (16), en el cual se encontraron pocas diferencias entre estos dos métodos de tinción, pero en el que no se estudiaron muchos pacientes cuyas muestras produjeran cuentas bajas de inclusiones.

En resumen, estos estudios sugieren que la tinción inmunofluorescente es más sensible para detectar inclusiones que la tinción con yodo o la tinción de Giemsa.

Posteriormente, Mallinson y col (57) sugieren, en base a su experiencia con 53 pacientes varones, que la micros-

copía inmunofluorescente con anticuerpos monoclonales puede ser una buena alternativa, en comparación con el método de cultivo para diagnosticar enfermedades por Chlamydia trachomatis.

No se hacen comentarios sobre ninguna dificultad para interpretar los exudados examinados con anticuerpos monoclonales fluorescentes, posiblemente porque los obtenidos de sus pacientes fueron más "limpios" que aquéllos que se obtienen del cérvix femenino. Sugieren que al estudiar éstos últimos algunas veces se dificulta su interpretación, por lo cual el método de anticuerpos fluorescentes no parece ser un método muy confiable para hacer diagnósticos en clínicas que atienden enfermedades transmitidas sexualmente y en las cuales los laboratoristas no tienen mucha habilidad en técnicas microbiológicas; sin embargo, concluyen que el método del exudado directo puede tener una ventaja sobre el cultivo, particularmente cuando en forma inevitable existe una demora entre la toma de la muestra y su posterior inoculación en el cultivo celular, esta es la celeridad con que se obtienen los resultados con el primero.

Se tiene otro estudio (73) en el cual se confirman los resultados sobre sensibilidad y especificidad previamente reportados (88) de los anticuerpos fluorescentes y que muestra ventajas sobre los métodos de tinción con yodo o Giemsa. Sin embargo, se encontró que los anticuerpos monoclonales directos generan resultados falsos tanto negativos como positivos, principalmente en pacientes cuya infección se caracteriza por un número bajo de microorganismos; se demostró que se pueden

detectar infecciones por clamidias extracelulares en secreciones obtenidas directamente. No obstante, cambió el criterio de interpretación y en lugar de considerar 10 cuerpos elementales como muestra positiva, se consideró que si se encontraban 5 o más cuerpos elementales en una área de 3mm de diámetro por cada placa, se consideraría positiva la prueba, en base a que datos previos mostraron una correlación lineal directa entre el número de cuerpos elementales por cultivo y el número de cuerpos elementales por frotis. Así, se logró aumentar la sensibilidad sin disminuir la especificidad y se corrigieron errores como los implicados en la toma de muestras, toxicidad del medio de cultivo al transportar la muestra o del cultivo de tejidos, congelamiento, muerte del microorganismo o su inhibición por la presencia de otros microorganismos que se desarrollan en el cultivo de tejidos y la presencia de sustancias inhibitoras, como anticuerpos, que afectan la capacidad del microorganismo para crecer en cultivo de tejidos.

Francis y col (27) también encontraron que los anticuerpos monoclonales conjugados con fluoresceína son útiles para diagnosticar enfermedades por clamidia y mencionan que usaron anticuerpos monoclonales específicos de género y específicos de especie para determinar inclusiones de clamidia en cultivos de tejidos y para determinar cuerpos elementales en frotis por examen de la muestra directa. Se presentaron algunos errores de lectura en los frotis inmunofluorescentes que se debieron principalmente a la reactividad cruzada de los anti-

cuerpos, a la alta luminosidad del fondo y a la unión de la fracción Fc de los anticuerpos monoclonales conjugados, con la proteína A del estafilococo dorado.

Posteriormente Pouletty y col (71) optimizaron un examen de inmunofluorescencia directa para determinar cuerpos elementales de Chlamydia en muestras clínicas, usando una mezcla de dos anticuerpos monoclonales conjugados con fluoresceína, uno específico de género y otro específico de una subespecie de Chlamydia trachomatis. Además, se optimizó (52,71) la supresión del fondo fluorescente y se inhibió la unión de la porción Fc de los anticuerpos monoclonales conjugados con la proteína A de S. aureus.

Los autores concluyen que mediante las modificaciones que hicieron a la técnica convencional, se logró una forma simple y eficiente de mejorar la especificidad de los reactivos usados para exámenes de muestras directas. La lectura de las laminillas fluorescentes fue sencilla, los cuerpos elementales fluorescentes y los cuerpos reticulados se observaron claramente contra un fondo con células teñidas con colorante de contraste. La sensibilidad y la especificidad obtenidas con muestras directas en comparación con el cultivo de tejidos, fueron similares a las descritas en otros reportes, considerando el criterio de positividad por laminilla en base a diez o más cuerpos elementales. Se evitaron la causas conocidas que podrían conducir a resultados falsos positivos, optimizando la fluorescencia de los anticuerpos monoclonales conjugados, como

se vió en otros exámenes del mismo tipo.

Se pueden detectar los antígenos específicos mientras que el cultivo de tejidos puede ser negativo. Por lo tanto, los pocos resultados positivos de muestras de examen directo que fueron negativos en el cultivo de tejidos, podrían ser positivos verdaderos.

De acuerdo a lo anterior, Pouletty y col (71) sugieren que una optimización cuidadosa de los reactivos inmunofluorescentes directos, permitiría una lectura más confiable y sencilla de las laminillas de muestras directas. También, sugieren que el uso de un criterio de positividad tomando una base menor de diez cuerpos elementales, aumentaría la sensibilidad del método sin disminuir la especificidad.

Existe un sistema comercial, Microtrack, que consiste principalmente en un anticuerpo monoclonal fluorescente (103); Forbes y col (26) lo evaluaron para detectar Chlamydia trachomatis directamente en las muestras, comparando esta metodología con el cultivo de células en dos poblaciones de pacientes, una de alto y otra de bajo riesgo de infección.

En base a sus resultados, los autores concluyen que es necesario correr el Microtrack en paralelo con el cultivo, desde el inicio. Se observaron a inmersión las laminillas y encontraron que el 40% de los resultados falsos negativos, tenían poco menos de diez cuerpos elementales en todo el frotis mientras que en el 40% de frotis falsos negativos se observaban de 0 a 5 cuerpos elementales.



En conclusión, se mejoró notablemente la sensibilidad del Microtrack al cambiar el criterio señalado por el fabricante del reactivo, y en lugar de considerar una laminilla positiva cuando en ésta se encuentren diez o más cuerpos elementales, se consideraron tres o más y se incluyó la observación de la laminilla a inmersión.

Tilton y col (99) desarrollaron dos metodologías que por microscopía, involucraban anticuerpos monoclonales y las compararon con el cultivo de Chlamydia trachomatis. Demostraron que no existe una diferencia importante en el promedio de sensibilidad y especificidad de las pruebas. Sin embargo, encontraron una variación interlaboratorio observada en función de la sensibilidad de la microscopía con anticuerpos monoclonales y una discreta variación de especificidad. Señalan que cualquiera podría ser un método de monitoreo efectivo para poblaciones en alto riesgo. Los exámenes rápidos tienen el potencial de salvaguardar las dificultades técnicas que se presenten y aventajan al tradicional método de cultivo puesto que no requieren tanto tiempo. Además, en el caso de los métodos con anticuerpos monoclonales son más sencillos de llevar a la práctica y pueden hacer una prueba cuantitativa.

Los autores estudiaron además, que en un segundo exudado se arrastran menos microorganismos que en un primero, por lo cual el segundo exudado no es tan confiable para asegurar máxima sensibilidad y dejar al libre arbitrio del laboratorio, la decisión de cuál método usar, por supuesto en base a costos

y número de muestras a tratar rutinariamente, ya que tanto el ensayo con anticuerpos monoclonales fluorescentes como el ensayo inmunoenzimático con anticuerpos monoclonales son igualmente útiles.

Por último, se sugiere que en el caso del ensayo con anticuerpos monoclonales fluorescentes, la fluorescencia es útil, pero las preparaciones tienden a desteñirse más rápidamente, por lo cual se incluyó un colorante de contraste para el fondo de estas preparaciones y se prefirió el anticuerpo monoclonal dirigido contra epítopes proteicos de la membrana externa mayor de Chlamydia trachomatis, que difiere de otros equipos en que el anticuerpo en este caso se dirige al lipopolisacárido.

Storey y col (92) así como Richmond y col (76) describen una técnica de inmunotransferencia (IDBT) para determinar el antígeno típico del género Chlamydia, comparándola favorablemente con la técnica de cultivo de células para diagnosticar enfermedades genitales por Chlamydia. En el IDBT, el antígeno lipopolisacárido (LPS) específico del género se determinó con un anticuerpo monoclonal marcado con  $I^{125}$  por auto radiografía en membrana de nitrocelulosa. El 92% de las muestras urogenitales evaluadas, dieron como resultado cultivos positivos, detectándose en un 62% de estas muestras menos de diez inclusiones. Sin embargo, el máximo de sensibilidad sólo se obtiene cuando se exponen las auto-radiografías durante 72 horas; sólo se observó una reacción falsa positiva causada por

la proteína A en un exudado de conjuntiva de un neonato con infección por estafilococo dorado.

Posteriormente, los mismos autores (61) modificaron esta técnica y mejoraron velocidad, sensibilidad y especificidad. La velocidad aumentó al mejorar la exposición del antígeno a la auto-radiografía en la membrana de nitrocelulosa (NCM) por una digestión de los antígenos proteicos adyacentes en la membrana externa de Chlamydia, por medio de una proteinasa, ya que se podría haber enmascarado parcialmente al antígeno LPS.

Se mejoró la sensibilidad al usar una película más sensible que en la técnica propuesta originalmente, así que fue posible también reducir el tiempo de exposición a 24 horas. El tratamiento con la proteinasa se utilizó para evitar interferencia con la proteína A del estafilococo dorado. Sin embargo, se reconoce que no es posible usar invariablemente la proteinasa "X", ya que las técnicas que involucran anticuerpos monoclonales dependen de la determinación de un antígeno protéico. Asimismo, los exámenes basados en el reconocimiento del antígeno LPS específico del género Chlamydia, presentan el problema de ser incapaces de diferenciar una infección debida a C. psittaci de otra por C. trachomatis; sin embargo, el ensayo de inmunotransferencia sí puede hacer la diferenciación, por lo tanto es específico.

El ensayo de inmunotransferencia resultó ser, al menos, 24 horas más rápido que el cultivo rutinario, aunque también es más lento que la identificación de Chlamydiae con

anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína. Por lo tanto, la inmunotransferencia probó ser simple y confiable para diagnosticar enfermedades genitales por Chlamydia trachomatis.

Existe otro sistema comercial llamado Pathfinder DFA, que consiste también en un anticuerpo monoclonal fluorescente, directo. De acuerdo a los resultados de Roblin y col (79), se sugiere que este sistema tanto en sensibilidad como en especificidad, es equivalente al Microtrak DFA que como ya se citó, también se vale de un anticuerpo monoclonal fluorescente, aunque examinaron un número de muestras oftálmicas relativamente bajo, la frecuencia de conjuntivitis causada por Chlamydia fue alta. La autora y sus colaboradores concluyen que la frecuencia de muestras positivas de nasofaringe, fue muy pequeña para evaluar de manera precisa el desarrollo de ambas pruebas. Sin embargo, es de especial interés lo que parecía ser un enorme número de muestras nasofaríngeas falsas positivas procedentes de infantes con conjuntivitis, se observó que estos resultados falsos positivos ocurrían sólo en neonatos que padecían conjuntivitis y que presentaban cultivo positivo para Chlamydia, es decir, muestras que eran verdaderamente positivas, lo cual se confirmó por la presencia de cuerpos elementales fluorescentes, típicos, en sedimentos de muestras del cultivo original.

Dentro de este estudio, se citan varias razones por las que la sensibilidad pudo haber variado como la dificultad para leer las pruebas por la presencia de numerosos artefactos,

o bien por un mal muestreo. Se enfatiza también, que su baja sensibilidad ~~no se debió~~ a un número bajo de microorganismos en la muestra.

Finalmente, se cita que los reactivos dirigidos a proteínas de la membrana externa mayor, parecieron producir una fluorescencia más brillante, cuerpos elementales de morfología más consistente y tinciones menos inespecíficas que los reactivos de anticuerpos monoclonales dirigidos al lipopolisacárido. Sin embargo, también se cita que aún entre los anticuerpos monoclonales dirigidos a proteínas de la membrana externa mayor, hubo diferencias en la tinción de algunas serovariedades, por lo cual algunos reactivos DFA monoclonales podrían no detectar todas las cepas de Chlamydia trachomatis. Por lo tanto, no es posible extrapolar el éxito al usar uno u otro reactivo.

Posteriormente, los equipos de trabajo representados por Hammerschlag (37) y por Smith y col (86) hicieron una nueva comparación, entre un anticuerpo monoclonal fluorescente (Pathfinder) y un anticuerpo monoclonal usado en un ensayo inmunoenzimático llamado (Chlamydiazime), para diagnosticar conjuntivitis, neumonía por Chlamydia en neonatos e infecciones genitales en mujeres.

Las diferencias fundamentales entre Pathfinder y Chlamydiazime son: que el primero utiliza un anticuerpo monoclonal antilipopolisacárido y un anticuerpo policlonal y se provee revestido en tubos de ensayo, mientras que el Chlamydiazime solamente utiliza un anticuerpo policlonal absorbido en

perlas de poliestireno.

En estos estudios, los resultados demostraron que el Pathfinder es equivalente al Chlamydiazyme para detectar C. trachomatis en muestras de conjuntiva de neonatos y en muestras de cérvix, respectivamente y, que por lo tanto, la adición del anticuerpo monoclonal en el Pathfinder no es relevante en términos de sensibilidad, de especificidad, ni de muestras oftálmicas o nasofaríngeas, de hecho, el cultivo mostró mejores resultados (86).

Según LeBar (54), el objeto de un estudio que reporta, fue el de comparar dos ensayos que no dependen del crecimiento de Chlamydia en cultivo, el IDEIA III que es un inmunoensayo amplificado con anticuerpos monoclonales y una sonda de ADN isotópico para determinar infecciones genitales por Chlamydia trachomatis. Cabe señalar que en el IDEIA III se usa un anticuerpo monoclonal específico del género Chlamydia y un sustrato con un sistema de amplificación a base de una alcohol óxido reductasa diaforasa para determinar la presencia de Chlamydia trachomatis.

Este estudio demostró una alta sensibilidad y especificidad con respecto al cultivo. El problema de esta comparación es que todos los resultados IDEIA III positivos serían considerados como falso-positivos por cultivo, ya que el cultivo no los registraría, y porque al cultivo se le toma como prueba de referencia, aunque tiene una sensibilidad inferior al 100%.

El IDEIA III demostró ser el más sensible de los dos métodos no basados en cultivo, sólo un porcentaje bajo de pacientes sería tratado innecesariamente.

Por otro lado, los métodos no basados en cultivo son muy rápidos, ahorran trabajo y problemas de interpretación objetiva de los resultados. Una consideración muy necesaria es aquélla de que los falsos positivos y negativos pueden desembocar en la administración innecesaria de terapia o en secuelas resultantes de la enfermedad.

Por otro lado Zhang y col (120) reportan haber generado un grupo de anticuerpos monoclonales que reconocen epítopes proteicos, inmuno-accesibles en la membrana externa mayor de Chlamydia trachomatis, dichos anticuerpos monoclonales protegen a los ratones de la muerte luego de inyectarles cuerpos elementales de C. trachomatis variedad B, mismos que neutralizaron la infectividad del microorganismo en los ojos de monos, mientras que aquellos monoclonales que reaccionan con especies que no son inmuno-accesibles o con epítopes de la proteína de la membrana externa mayor, específicos de especie o con epítopes inmuno-accesibles específicos al género en el lipopolisacárido de la clamidia, no protegen al ratón.

Estos resultados sugieren que los epítopes proteicos de la membrana externa mayor que son específicos al serogrupo o a la serovariedad y que están accesibles a anticuerpos en la superficie de la célula de clamidia, podrían ser útiles para preparar una vacuna para el tracoma.

### 3.2 SISTEMA DIGESTIVO

Singh-Naz y col (85) desarrollaron un ensayo inmunoenzimático con tres diferentes anticuerpos monoclonales para identificar y tipificar adenovirus del subgrupo F tipos 40 y 41, en pacientes con gastroenteritis causada por este agente viral. Al comparar este ensayo inmunoenzimático con otras técnicas, los autores encontraron que el inmunoensayo detectaba concentraciones de al menos 10 adenovirus por ml, es decir tan sensible como 10 a 64 veces más que la microscopía electrónica, 95% más sensible comparado con el aislamiento de los virus en la línea celular 293 y con una especificidad también mayor al 95%, como se determinó por análisis del perfil del genoma del adenovirus (34).

Por medio de este estudio se determinó que los 3 anticuerpos monoclonales estaban dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos de una misma proteína de 17 Kd y que mostraban diferentes reacciones con los adenovirus de los tipos 40 y 41 al realizar un ensayo inmunoenzimático (ELISA). Asimismo, demostró que los diferentes tipos de adenovirus del subgrupo F diferenciados originalmente por análisis de ADN, pueden ser también diferenciados fácilmente por el ensayo inmunoenzimático con anticuerpos monoclonales.

De igual manera Wood y col (114), evaluaron un equipo disponible a nivel comercial, en el cual se usaban anticuerpos monoclonales en un ensayo inmunoenzimático para detectar



adenovirus tipos 40 y 41 en heces, según se cita, los autores encontraron al presente método fácil de llevarlo a la práctica, con alta especificidad (95.8%) y sensibilidad (96.3%) en comparación con la microscopía electrónica, la cual generalmente da resultados falsos negativos con bajas concentraciones de virus. No se reportan reacciones cruzadas con aislamientos obtenidos de cultivos de células de las cepas estudiadas, por lo cual concluyen que probablemente los problemas que se tuvieron con el ensayo inmunoenzimático se debieron a infecciones con otro microorganismo patógeno, además del adenovirus.

Pacini y col (66) en un estudio que realizaron con rotavirus comparando la microscopía electrónica, la electroforesis de ARN en gel de poliacrilamida y los ensayos inmunoenzimáticos basados en anticuerpos monoclonales y policlonales, encontraron que la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) la microscopía electrónica y los inmunoensayos Pathfinder y Rotazyme II, (el primero con un anticuerpo monoclonal y el segundo con un anticuerpo policlonal) fueron equivalentes, aunque la especificidad del método de electroforesis de ARN en gel de poliacrilamida (PAGE) excedió a la de otros métodos y se consideró del 100%. Asimismo, los autores reportan que los dos inmunoensayos sin modificaciones, dieron especificidades idénticas al PAGE, pero la sensibilidad del Pathfinder fue mayor. Ninguna muestra fue positiva por PAGE, y negativa por Pathfinder y sólo una muestra que contenía antígeno de rotavirus detectable por Rotazyme II, pasó inadvertida por el ensayo

inmunoenzimático monoclonal Pathfinder.

Sin modificar los inmunoensayos, se obtuvieron un 13% de resultados falsos positivos por Pathfinder y un 15% por Rotazyme II, lo que implica ciertos problemas sobre todo en casos en que la frecuencia de infección por rotavirus es relativamente baja (más de la mitad de los falsos positivos resultaron negativos al reexaminarlos).

Se señala que un ajuste en el valor de positividad reduce los falsos positivos en 1.5% sin afectar la sensibilidad. Estos hallazgos sugieren que es conveniente hacer las determinaciones espectrofotométricas.

Asimismo, se reporta haber suspendido las muestras en un amortiguador de fosfatos libre de magnesio (y no en el diluyente que el fabricante del Pathfinder incluye) para obtener lecturas mayores que con las de éste último, el cual contiene un surfactante que expone antígenos orientados internamente al romper la cápside protéica del virus.

Este estudio sugiere que el Pathfinder cuando se usa como recomienda el fabricante, es tan específico como el Rotazyme II pero más sensible. Las determinaciones espectrofotométricas en Pathfinder podrían señalar resultados falsos positivos debido a lecturas relativamente bajas en número de virus; la especificidad se podría mejorar ajustando el nivel de valores de densidad óptica y el uso del amortiguador salino de fosfato en lugar de diluyentes, que no inhibió la determinación

del antígeno de rotavirus ni en Pathfinder ni en Rotazyme II y podría permitir una preparación más sencilla de la muestra cuando se usen muestras únicas para múltiples exámenes.

Svensson y col (96) describen un trabajo en el cual entre varias muestras de heces que incluyen rotavirus patógenos para el hombre, algunos no reaccionan con anticuerpos monoclonales específicos.

Sin embargo, los autores no concluyen si realmente existe o no algún nuevo subgrupo, solamente insisten en que hay ciertas cepas que no pudieron clasificarse ni en el subgrupo I ni en el II, y que algunos rotavirus encontrados en muestras de gallinas, equinos, etc, no se han podido clasificar.

Finalmente concluyen que se requerirá de investigaciones posteriores para esclarecer si existe o no este nuevo subgrupo.

Kinney y col (50) realizaron un ensayo para detectar ARN de doble cadena, aplicándolo para detectar rotavirus del grupo A y otros rotavirus de grupos diferentes al A; mencionan que la detección de estos virus por inmunoensayo o por sistemas que involucran sistemas de hibridización de ácidos nucleicos, suelen ser difíciles de aplicarse a los virus porque éstos, muestran variaciones antigénicas y genéticas, precisamente, por la falta de información y de conocimiento sobre estas variaciones se ha dificultado el desarrollo de ensayos para este diagnóstico, lo cual ha limitado el conocimiento de su papel en las

enfermedades humanas.

Entre lo que sí se conoce de los virus, está el hecho de que todos contienen un genoma con una doble cadena de ARN, por lo que se desarrolló un ensayo en el que se usaron anticuerpos monoclonales para medir la doble cadena de ARN. Este detectó esta doble cadena de ARN de al menos 10 unidades formadoras de placas (PFU) de cepas estándar del grupo A de rotavirus y también pudo detectar cepas del grupo B en ciertos animales, aún cuando los títulos de virus se encontraban tan bajos como para sólo ser detectables por electroforesis en gel de poliacrilamida.

Al aplicar el ensayo en heces de niños, se detectó la doble cadena de ARN en aquellas muestras en las que no se pudo detectar por inmunoensayo. Así, se concluye que la medición de la doble cadena de ARN ofrece un método potencialmente útil para la detección sensible de una amplia gama de rotavirus y otros miembros de la familia Reoviridae.

Además, en virtud de que el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal es resistente a la digestión proteolítica, el examen permite detectar la presencia de virus unidos a complejos inmunes en condiciones en que el virus no podría detectarse con ensayos inmunológicos.

También sugieren que el uso de este ensayo podría ser útil como un método de monitoreo para detectar ARN viral en muestras de humanos y animales; las muestras positivas pueden

ser analizadas subsecuentemente con sistemas más específicos, aunque también más laboriosos y tardados.

Concluyen que el uso del ensayo en cuestión, dará como resultado tanto un mejor control de las enfermedades infecciosas en los hospitales para evitar la contaminación, como el desarrollo de estudios epidemiológicos detallados, tanto de la familia Reoviridae como de otras familias de virus, aunque tal vez aún se desconozcan, y no sea posible identificarlas con metodologías convencionales.

En otros estudios, Burns y col (10) reportaron la caracterización de tres anticuerpos monoclonales dirigidos a rotavirus del grupo B, que causan brotes de diarrea en humanos, así como su uso en un sistema de detección de antígenos por medio de un ensayo inmunoenzimático, en el cual se menciona que la reactividad de los anticuerpos monoclonales disminuyó al someterlos a un tratamiento con EDTA, lo cual sugiere que son reactivos a las proteínas de la partícula viral (cápside). Además, se encontró que aparentemente los epítopes involucrados con las reacciones de identificación, se traslapan dentro de un solo sitio antigénico.

En base a los resultados, se sugiere que el ensayo con estos anticuerpos monoclonales, es lo suficientemente útil para identificar brotes epidémicos causados por los rotavirus del grupo B y para monitorearlos.

Matsui y col (58) mencionan que los rotavirus son causantes de diarrea severa en niños, producen brotes epidémi-

cos tanto en países en desarrollo como en aquéllos desarrollados, afectando tanto a ancianos como a enfermos en período agudo y a pacientes inmunocomprometidos; ahora, sugieren que también causan enfermedades en adultos normales.

Las partículas de rotavirus consisten en once segmentos de ARN de doble cadena, englobados por una cubierta de proteína viral de doble capa llamada cápside, que está constituida por proteínas virales denominadas VP7 y VP4. La primera es una glicoproteína de 37Kd, responsable de que el rotavirus se adhiera a las células. La VP4 es una proteína de 86.5Kd codificada por el segmento 4 del gen como la hemaglutinina viral. Recientemente se descubrió que la segunda aumenta la infectividad viral cuando se somete a tratamiento enzimático con tripsina, dividiéndose en los fragmentos VP8 y VP5.

Cada proteína de la cápside induce la producción de anticuerpos monoclonales para neutralizar al virus in vitro y proteger al paciente contra la infección in vivo.

Se menciona en este mismo trabajo que existe una protección pasiva contra rotavirus que inducen diarrea, por medio de anticuerpos monoclonales dirigidos al dominio de neutralización heterotípica de VP7 y al fragmento VP8 de la proteína VP4.

Se encontró que los anticuerpos no neutralizantes dirigidos a VP7 y a la proteína interior de la cápside (VP6) no protegían de desafíos al ratón, por lo cual surgen dos preguntas muy importantes: 1) ¿Los anticuerpos monoclonales VP7 heterotípicos protegen pasivamente a ratones lactantes del desa-

fio?, 2) ¿Son los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la porción VP8 de VP4 capaces de proteger pasivamente al ratón de desafíos con rotavirus virulentos?

También se reporta que los anticuerpos monoclonales neutralizantes protegen al ratón del desafío con rotavirus virulentos, pero no protegen contra desafíos con otros rotavirus. Así se observó que mientras un anticuerpo monoclonal neutralizó los serotipos 3 y 6 del rotavirus in vitro y protegió a los ratones contra el desafío con estos virus, no los protegió contra el desafío con rotavirus del serotipo 4. Aunque no se conoce la razón, lo que es seguro, según los autores, es que no hay ejemplos de anticuerpos que protejan in vivo sin neutralizar rotavirus in vitro.

Por otro lado, Ahmed y col (1) caracterizaron rotavirus patógenos para los humanos, por medio de ensayos inmunoenzimáticos con anticuerpos monoclonales específicos a cierto serotipo y algunos subgrupos de rotavirus obtenidos de pacientes con diarrea en Bangladesh, encontrando que el serotipo 1 predomina sobre los serotipos 2, 3 y 4, aunque en algunos casos se observó reacción entre muestras de los subgrupos I y II, además de variaciones entre diferentes hospitales. Asimismo, observaron que todas las cepas de rotavirus subgrupo 1 serotipo 2, desarrollaron un corrimiento electroforético corto, mientras que casi todas las cepas del subgrupo II y serotipo 1, 3 ó 4 desarrollaron un corrimiento largo. Sugieren, que en base a sus resultados, probablemente existe cuando menos otro subgrupo

de rotavirus grupo A y, aclaran que los anticuerpos monoclonales de este ensayo servirán para caracterizar, posteriormente, los subgrupos de rotavirus que infectan a humanos causando enfermedades gastrointestinales.

En cuanto a los resultados negativos, los autores sugieren que pueden deberse a la presencia de un número insuficiente de virus para poderse detectar, ya que al revisar 27 muestras negativas por microscopía electrónica encontraron pocos microorganismos; o bien, a que como la eficiencia del examen de serotificación depende del número de virus completos y viables en la muestra, podrían haber existido pocos completos. El hecho de que se presentaran pocos virus podría deberse a que se hubiesen roto o perdido por efectos de pH, enzimas, o inclusive el tiempo de recolección, transporte y procesamiento de las muestras.

También se notó que las cepas pueden tener características genéticas no comunes. De hecho, según sugieren, se ha demostrado que bajo condiciones experimentales, el intercambio de segmentos genómicos ocurre con alta frecuencia en células infectadas con dos rotavirus diferentes (4,102): aunque también se puntualiza que este fenómeno aún no se ha estudiado y que por su parte sólo confirmaron la correlación del corrimiento electroforético corto del subgrupo 1 y del serotipo 2.

En otro campo, Midthun y col (63) produjeron híbridos productores de anticuerpos monoclonales dirigidos a VP7, una proteína neutralizante del serotipo 9 de rotavirus cepa



W161; de entre esos anticuerpos monoclonales, sólo uno neutralizó a las cepas estudiadas de rotavirus serotipo 9 con las que reaccionó específicamente en un ensayo inmunoenzimático.

Cabe señalar que todos los anticuerpos monoclonales eran del tipo IgG, y que se habían dirigido contra la proteína VP7 de la cepa W161 de rotavirus, ningún anticuerpo monoclonal neutralizó virus cuyos genes derivaban del serotipo 1, 2, 3 ó 4. Además, no se notaron reacciones cruzadas con cepas de rotavirus de los serotipos 1 a 8 incluyendo cepas UK de bovino.

Según los autores, sus resultados demuestran la alta especificidad de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína VP7 de las cepas serotipo 09 de las cuales, 2, la W161 y la F45, se aislaron en EUA y Japón, respectivamente. La alta especificidad se fundamenta en el título elevado de neutralización y en las reacciones inmunoenzimáticas.

Destacan que es necesario identificar el serotipo de los rotavirus para estudiar y comprender la epidemiología de la infección, pero que también se necesita evaluar la eficiencia de diferentes rotavirus para preparar la vacuna correspondiente, especialmente en relación con la inmunidad heterotípica.

Asimismo, se hizo una comparación de diferentes metodologías para diagnosticar la presencia de rotavirus y se dedujo que todas, excepto el ensayo inmunoenzimático con anticuerpos monoclonales específicos, requieren mucho tiempo, representan costos muy elevados, requieren tanto cultivar al virus en líneas celulares, como laboratoristas altamente capacitados.

Por lo anterior, consideran que el ensayo inmunoenzimático es una buena alternativa de diagnóstico.

Sarasombath y col (91) establecieron dos anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de proteína de Salmonella typhi. Uno de los anticuerpos (STP 14) pertenecía a la subclase G1K de inmunoglobulinas y el otro (STP 13) se asignó a la subclase G2a(k) de inmunoglobulinas.

Para evaluar las especificidades de los anticuerpos, los autores desarrollaron una inmunotransferencia con un grupo de antígenos de 12 bacterias relacionadas: Salmonella typhi, S. paratyphi A, S. paratyphi B, S. paratyphi C, S. choleraesuis, S. enteritidis, S. krefeld, S. panama, S. typhimurium, Escherichia coli, Pseudomonas pseudomallei y Yersinia enterocolitica.

Ambos anticuerpos monoclonales identificaron al antígeno proteínico de 34Kd de S. typhi. Sin embargo, reaccionaron en forma cruzada con la proteína de 34Kd aislada de Salmonella paratyphi C, S. choleraesuis y S. typhimurium. Posteriormente, se demostró que aunque estos anticuerpos monoclonales detectaron, mediante un ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISA), el antígeno de la proteína preparada a partir de S. typhi a concentraciones tan bajas como 0.6 mg/ml, no pudieron detectarla en muestras de suero u orina de pacientes con fiebre tifoidea.

De acuerdo con lo anterior, los autores sugieren que posiblemente los epítopes que reaccionaron con estos anticuerpos monoclonales están ocultos en su forma nativa o están blo-

queados formando complejos inmunes en muestras clínicas, siendo, por lo mismo, inaccesibles para reaccionar en las pruebas con anticuerpos monoclonales disponibles o, debido a que éstos reaccionan en forma cruzada con un número determinado de otros antígenos de Salmonella, podrían tener un valor limitado en el diagnóstico diferencial de fiebre tifoidea, particularmente en regiones donde son comunes las enfermedades similares a la fiebre entérica.

En otro orden de ideas también relacionadas con el tema y, particularmente con la enterotoxina A de Staphylococcus aureus, se realizó un ensayo inmunoenzimático usando una combinación de anticuerpos monoclonales y policlonales y una reacción de biotina estreptoavidina (18), encontrando resultados muy satisfactorios, de tal suerte que se recomienda usar el sistema con la mezcla de anticuerpos tanto monoclonales como policlonales de uso rutinario ya que no son riesgosos, ni requieren estandarización, pueden refrigerarse por períodos prolongados, la técnica permite terminar la prueba y dar resultados en un solo turno, es decir en 8 horas.

Posteriormente, Sarasombath reportó al igual que Ekpo y col (19) un estudio en el cual la clave del éxito fue la purificación de la proteína Bp de S. typhi utilizada como inmunógeno, lo cual se complementó al capturar componentes antigénicos de S. typhi en una columna de afinidad preparada a partir de Sepharosa conjugada con anticuerpos IgG en contra de la Bp parcialmente purificada, eliminando efectivamente todos los compo-

nentes que no reaccionaron, mientras que se usó el eluyente para producir anticuerpos monoclonales.

Los autores seleccionaron 10 anticuerpos monoclonales a partir de 6 clonas híbridas, específicas a la proteína de 52 Kd de S. typhi y encontraron que estos 10 anticuerpos monoclonales eran específicos para epítopes de S. typhi y que reaccionaban sólo con esta proteína de 52Kd; asimismo, encontraron que los anticuerpos monoclonales podían detectar a este antígeno presente en la orina y suero de pacientes con fiebre tifoidea, por lo que es posible que los epítopes de 52Kd estén ocultos o bloqueados en la forma de complejos inmunes, por lo cual, no se pudieron identificar. Finalmente, debido a que la mayoría de los pacientes con fiebre tifoidea exhibieron una respuesta del anticuerpo IgM específico hacia el antígeno de 52Kd, los autores concluyen que dicho antígeno es potencialmente útil para el serodiagnóstico inicial o temprano de fiebre tifoidea en pacientes con fiebre de origen desconocido y que además, se debe considerar como un nuevo candidato para preparar una vacuna contra la fiebre tifoidea; sugieren que debe investigarse esta última posibilidad, ya que con la combinación de estos anticuerpos monoclonales altamente específicos y con la tecnología moderna de ADN recombinante, se pueden obtener grandes cantidades de proteína de 52Kd purificada en forma rápida y económica.

Por otro lado, Qadri y col (72) describen 15 clonas celulares híbridas que secretan anticuerpos monoclonales de diversa especificidad dirigidos contra Salmonella typhi. Los

autores determinaron la especificidad de estos anticuerpos mediante sus patrones de unión en ensayo inmunoenzimático, con un grupo de antígenos lipopolisacáridos (LPS) aislados de diferentes bacterias. Los resultados obtenidos dieron lugar a la presencia de por lo menos cuatro diferentes grupos de anticuerpos monoclonales: un grupo de siete reaccionó con LPS aislados de S. typhi, S. enteritidis y S. dublin; otro reaccionó con S. paratyphi A y B; un grupo de cinco que reaccionó con S. typhi, S. enteritidis, S. dublin y S. paratyphi B; y un grupo de dos anticuerpos que mostró un grado considerable de reacciones cruzadas con extractos sónicos de bacterias aislados a partir de S. typhi, S. paratyphi A, S. paratyphi B, Escherichia coli y Shigella sonnei; estos anticuerpos no reaccionaron con el LPS sino con células completas, confirmando que los anticuerpos monoclonales son determinantes reconocidos de la superficie celular.

Posteriormente se demostró por inmunoelectrotransferencia (Western blot), que tres de los cuatro grupos identifican un patrón tipo escalera, de bandas poco separadas del LPS. Este patrón se atribuye a la heterogeneidad molecular de la molécula del LPS.

La correlación entre la inmunoelectrotransferencia y el ensayo inmunoenzimático mostró una banda de migración rápida, común en 5 bacterias Gram negativas. Esto puede deberse tanto a una molécula de proteína, como a una entidad no proteínica que no es parte del LPS.

Con los datos anteriores, los autores concluyen que la membrana exterior de S. typhi es altamente compleja y presenta una enorme gama de determinantes antigénicos y que el hecho de que tanto los anticuerpos monoclonales generados por inmunización con extractos sónicos, como los generados de bacilos completos reaccionen con antígenos "O", refleja el carácter inmunodominante de dichos antígenos.

Hugo y col (43) generaron un grupo de anticuerpos monoclonales contra una hemolisina de 107Kd, codificada por el determinante hemolítico de Escherichia coli LE 2001, se usó una prueba de inmunotransferencia de colonia (Dot Blot) para estudiar la hemolisina en 35 cepas hemolíticas de E. coli y otros miembros de la familia Enterobacteriaceae de origen clínico. Todas las cepas de E. coli dieron reacciones positivas con dos anticuerpos monoclonales. A diferencia, ninguno de los aislamientos de microorganismos diferentes de E. coli se estudiaron por inmunotransferencia. Además que la inmunotransferencia de colonias demostró que las hemolisinas producidas por todas las cepas de E. coli aisladas tenían un peso molecular de alrededor de 107Kd. Se encontró que puede ocurrir una variación antigénica discreta en la molécula, dado que un tercer anticuerpo monoclonal no reaccionó con la hemolisina de un cierto número de cepas de E. coli no aisladas en clínicas, por lo cual, los anticuerpos monoclonales también podrían fallar en el diagnóstico de ciertas cepas de E. coli.

En vista de sus resultados, concluyen que la hemolisina de 107Kd es un inmunógeno ampliamente difundido y que lo producen todas las cepas de E. coli hemolíticas procedentes del humano, lo cual podría ser una herramienta de diagnóstico muy útil en casos de infecciones crónicas por bacterias de la familia Enterobacteriaceae. También será interesante elucidar la variación antigénica dada a conocer por el anticuerpo que no reaccionó con la hemolisina de E. coli, ya que ningún monoclonal tiene actividad neutralizante.

Perry y col (67), reportan un estudio para identificar el determinante antigénico 0157 de Escherichia coli serotipo 0157:H7, que es una bacteria virulenta importante cuyo poder patógeno reside en el lipopolisacárido de su componente celular que se identificó como un polímero lineal de unidades repetidas de tetrasacáridos.

Los autores produjeron anticuerpos monoclonales contra el antígeno 0157 de E. coli, que al usarse en laminillas de aglutinación directa en placa o en reacciones de coaglutinación con estafilococo dorado Cowan I, permitieron identificar todas las cepas examinadas de E. coli 0157. Este anticuerpo no aglutinó cepas de otras E. coli como la 07 y la 0116, ni de otras bacterias que generalmente aglutinan con anticuerpos policlonales de E. coli, lo cual demuestra que es sensible y específico para todas las cepas de E. coli serotipo 0157; además de que no produce reacciones serológicas cruzadas que frecuentemente dan resultados falsos positivos.

López Vidal y col (55), produjeron 25 anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno I del factor de colonización CFA/I de Escherichia coli, para analizar la especificidad y la capacidad de aglutinar bacterias que tiene este antígeno. Se encontró un anticuerpo que aglutinaba todas las cepas de CFA/I positivas y otro que no aglutinaba ninguna, comparándose para examinar sus reactividades a diferentes preparaciones de CFA/I; mientras uno de ellos estaba unido o podría haber sido inhibido por la fimbria CFA/I o por la subunidad proteica, sólo el anticuerpo aglutinante estaba unido al CFA/I, como se expresa en toda la bacteria. El anticuerpo no aglutinante, por otra parte, se une considerablemente mejor que el anticuerpo aglutinante a un péptido correspondiente a los 46 residuos de aminoácidos N-terminales de la subunidad proteica CFA/I. Estos resultados sugieren que los dos anticuerpos monoclonales están dirigidos a epítopes diferentes del CFA/I.

En base a la secuencia de aminoácidos de la subunidad proteica CFA/I, se habían descrito seis determinantes antigénicos, dos de éstos fueron inhibidos por un péptido presente en la misma región. Esto implica que ambos determinantes antigénicos deben estar cerca uno del otro. Es relativamente sorprendente que un péptido correspondiente a los residuos de 78 aminoácidos-N terminales, tenga un efecto generalmente inhibitorio, por lo cual se asume que el epítope en cuestión está protegido o que está en una configuración inesperada.



Husson y col (45) efectuaron un examen para capturar fosfatasa alcalina para la identificación rápida de Escherichia coli y Shigella sp con anticuerpos monoclonales específicos. Reportan que el ensayo resultó ser fácil de realizar, altamente específico, observándose una sola reacción falsa positiva con un lisado de Klebsiella pneumoniae de entre las 205 cepas de microorganismos diferentes a E. coli, el examen fue sensible, ya que determinó 10 UFC/ml en aislamientos a partir de cultivo o 10 UFC/ml de muestras de orina que habían inoculado en medios de cultivo con fosfato limitante, durante dos horas.

Este examen es, además, rápido de realizar en cultivos aislados o directamente en muestras de sangre y orina. - Facilita el tratamiento específico 24 horas antes que otros métodos, puede ser automatizado y su costo es muy bajo; sin embargo, aún requerirá de estudios posteriores para su perfeccionamiento.

Ito y Yokota (46) hicieron un estudio en relación a Vibrio cholerae, dividido en varios serogrupos de acuerdo a su antígeno "O", las cepas que más comúnmente causan el cólera en humanos son las del grupo 01, que se ha subdividido en 3 serotipos: Ogawa, Inaba e Hikoshima.

Es importante conocer la clasificación completa del microorganismo, ya que el tratamiento es distinto según el caso. Por lo mismo, los autores desarrollaron 18 anticuerpos dirigidos contra el lipopolisacárido de V. cholerae 01, capaces de identificar al serotipo Inaba, encontrando que los 18 lo

aglutinaban. Conforme a las diferentes reacciones obtenidas de las cepas Ogawa, se hizo una división que comprende tres grupos: El primero que mostró una reactividad prácticamente idéntica con ambos serogrupos; el segundo que reaccionó más débilmente con las cepas Ogawa y el tercer que solamente reaccionó con las de tipo Inaba.

Este patrón es muy diferente al observado por los anticuerpos monoclonales derivados de células tipo Ogawa ya que éstos sólo se dividían en dos grupos, los Ogawa específicos y los comunes Ogawa-Inaba, aunque los resultados de hemaglutinación pasiva mostraron que todos los anticuerpos monoclonales fueron dirigidos al lipopolisacárido de V. cholerae 01 serotipo Inaba.

Sin embargo, los anticuerpos monoclonales frente a V. cholerae muestran que, a la fecha, no hay reacciones cruzadas ni con Yersinia enterocolitica 09 ni con Brucella abortus. Sin embargo, sí se observó una sorprendente similitud entre las estructuras del antígeno "O" de B. abortus y de V. cholerae a la cual se atribuyen las reacciones cruzadas.

Por lo anterior, se ve que los anticuerpos monoclonales producidos y caracterizados en este experimento serán herramientas muy útiles para conocer la estructura antigénica de V. cholerae 01, especialmente del determinante específico Inaba, así como la estructura que cruza con B. abortus.

Carlín y col (12) reportan la utilización de anticuerpos monoclonales específicos para determinantes antigénicos

"O", específicos de los serotipos diferentes de Shigella flexneri, con lo cual serotipificaron 240 aislamientos clínicos. Para la prueba de aglutinación directa se utilizaron tres anticuerpos del tipo IgM. Asimismo, los autores utilizaron IgG adsorbidas a Staphylococcus aureus en un ensayo de coaglutinación.

Un total de 227 cepas de S. flexneri se asignaron a un solo serotipo. A dos de las cepas no tipificadas se les extrajeron los lipopolisacáridos y se sometieron a investigaciones químicas, ambas mostraron ser de un nuevo serotipo aún no descrito. Las 11 cepas restantes fueron no tipificables.

Con este estudio se demostró que los anticuerpos monoclonales sirven para tipificar un microorganismo antigénicamente variable, como Shigella flexneri. Se demostró también que el antígeno E1037 se encuentra comúnmente por lo menos en cuatro serotipos de S. flexneri (4a, 6, X e Y).

Viljanen y col (104) reportaron una determinación inmunofluorescente para determinar la presencia de Bacteroides fragilis, Bacteroides thetaiotaomicron y Bacteroides ovatus en muestras clínicas, por medio de un anticuerpo monoclonal dirigido al lipopolisacárido de B. fragilis.

Bacteroides fragilis es la especie más comúnmente aislada en infecciones anaerobias importantes. Los nuevos medicamentos han facilitado que sobrevengan infecciones por B. fragilis, por eso es importante en el sector salud administrar antibióticos sólo cuando se justifique, y entender la patogeni-

idad de este microorganismo. El cultivo del microorganismo, aún en condiciones óptimas es muy lento, mientras que los métodos rápidos se basan en la detección, ya sea de sustancias metabólicas o antigénicas de estas bacterias. Sin embargo, actualmente se sabe que los anaerobios pueden identificarse por cromatografía gas-líquido, al igual que por técnicas de inmunofluorescencia.

Todas las técnicas de inmunofluorescencia para determinar la presencia de B. fragilis se basaban en el uso de anticuerpos policlonales, pero presentaban el problema de las reacciones cruzadas.

El objetivo de este estudio fue principalmente el de evaluar la sensibilidad y la especificidad de un método de inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal en la determinación directa de los 3 miembros del grupo de B. fragilis en muestras clínicas.

El anticuerpo monoclonal se dirigió al oligómero D-galactosa del lipopolisacárido de B. fragilis. En el experimento se determinó una sensibilidad de 79% y una especificidad de 93.4%, la sensibilidad fue mayor en muestras provenientes de la región perianal, en comparación con la de muestras obtenidas de otras zonas no definidas. Ni el hecho de transportar las muestras por períodos indefinidos, ni las terapias antimicrobianas parecen correlacionarse con la frecuencia de IF-positivos en muestras con cultivos negativos.

Sin embargo, la sensibilidad del ensayo fue mejor con

los aspirados que con los exudados, seguramente debido a que el número de bacterias en los primeros, en los que hay abundante producción de pus, conlleva un número de bacterias mayor, por lo que es una mejor muestra.

Se asume que algunas muestras permanecieron negativas por inmunofluorescencia, dado que las cepas del grupo de Bacteroides fragilis no tenían el determinante al que se dirigió el anticuerpo monoclonal.

A pesar de las complicaciones encontradas, se concluye que el anticuerpo monoclonal fue específico a las tres cepas de B. fragilis. Se encontró sólo 1 cepa que resultó ser un falso positivo y no se tomó en cuenta.

En base a sus resultados, se concluye que la discrepancia entre aislamiento e inmunofluorescencia no podría haber sido causada por una baja especificidad del método, sino porque la muestra podía contener bacterias no viables.

También se menciona que cuando se intentó usar el anticuerpo producido en fluido de ascitis, se obtuvo una pluralidad de reacciones cruzadas con varios microorganismos de la flora normal.

Por lo tanto, se concluye que este anticuerpo se puede usar para diagnosticar un 79% de aislamientos positivos de infecciones por B. fragilis, tomando en consideración que el examen no puede detectar bacterias no viables.

En el campo de la parasitología igualmente se han hecho estudios; así, se tiene que Arrowood y Sterling (3) rea-

lizaron una comparación de los métodos de tinción convencional y de los basados en el uso de anticuerpos monoclonales para determinar la presencia del oocineto de Cryptosporidium, encapsulado en la pared del estómago del mosquito. Según los autores, Cryptosporidium parvum se reconoce como un importante agente causal de diarrea en humanos inmunocomprometidos.

En este estudio se evaluaron los resultados de 7 métodos de diagnóstico del microorganismo en cuestión. Estos métodos fueron: 1) tinción rápida con ácido (AF), 2) tinción con auramina-rodamina (AR), 3) anticuerpo monoclonal conjugado con fluoresceína (C1B3), 4) fluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales OW3 (DAB), 5) fluorescencia indirecta con OW3 biotinilado (AEC), 6) diaminobenzidina indirecta OW3 biotinilado (OW3), 7) amino-etil-carbazol OW3 biotinilado (OW3biotin).

Los resultados se enlistan en la Tabla No. 1 (siguiente página).

En base a estos resultados, se puede ver que el anticuerpo monoclonal OW3 reaccionó frente al oocineto de C. parvum pero no al de C. baileyi. Este anticuerpo monoclonal no mostró reactividad cruzada con ninguna bacteria o levadura, ni con otros microorganismos; en los ensayos de inmunoelectrotransferencia reaccionó con un antígeno de la pared del oocineto de 200 kd.

Al conjugar el anticuerpo monoclonal OW3 con colorantes fluorescentes se encontraron resultados menos relevantes que al conjugarlo con biotina, y el tiempo de tinción fue de

T A B L A 1

## COMPARACION DE METODOS PARA DETERMINAR OOCINETOS

METODO	NO. DE POSITIVOS	NO. DE FALSOS-POSITIVOS	POSITIVOS %	FALSO-POSITIVOS %	SENSIBILIDAD (%)	ESPECIFICIDAD (%)
AF	13	8	4.2	2.6	40.6	52.0
AR	30	5	9.6	1.6	93.8	85.7
C1B3	30	0	9.6	0.0	93.8	100
DAB	26	0	8.4	0.0	81.3	100
AEC	23	0	7.4	0.0	71.9	100
OW3	32	0	10.3	0.0	100	100
OW3-biotin	32	0	10.3	0.0	100	100

alrededor de 90 minutos.

Los métodos inmunofluorescentes en que se usa el anticuerpo monoclonal demostraron utilidad al examinar muestras fecales y agua; aunque también deben ser útiles para identificar oocinetos en biopsias de tejidos.

En vista de los altos valores de especificidad y sensibilidad de los métodos basados en anticuerpos monoclonales, es posible que reemplacen a los métodos de tinción en un futuro cercano, aunque a la fecha todavía se usan.

En el caso del parásito flagelado Giardia lamblia, a partir de muestras de heces humanas, Stibbs (90) desarrolló un ensayo inmunoenzimático (ELISA) basado en anticuerpos monoclonales para detectar antígenos solubles en agua. Se encontró que el método tenía una sensibilidad del 97% para heces fijadas con formalina y del 82% para heces no fijadas, que se estudiaron mediante lectura visual. El almacenamiento de muestras en formalina al 10% dió por resultado un aumento en la absorbancia en 20 de 26 muestras positivas de G. lamblia probadas tanto en muestras fijadas en formalina como en los que no lo estaban. El ensayo fue específico para antígenos de quistes de G. lamblia detectando los de 5 quistes por pozo, pero no pudo detectar los antígenos de trofozoitos cultivados in vitro.

El autor preparó en ratón, un anticuerpo monoclonal de la subclase de IgG1 dirigido en contra de quistes de G. lamblia y, lo utilizó como anticuerpo de captura en fase sólida, mismo que reaccionó con la pared del quiste, como se deter-



minó mediante inmunofluorescencia. Asimismo, utilizó IgG policlonal anti-quiste preparada en conejo como anticuerpo secundario. También se usó IgG anti-conejo marcada con peroxidasa como anticuerpo terciario, en el formato de prueba. La dilución óptima de la muestra resultó estar entre 1:60 a 1:600. Los estudios efectuados sobre la afinidad del antígeno purificado reconocido por el anticuerpo monoclonal, mostraron que dicho antígeno es estable al calor, resistente al tratamiento con peryodato de sodio y puede existir con pesos moleculares múltiples de entre 45 a 110 Kd.

El descubrimiento de que el anticuerpo monoclonal reacciona por inmunofluorescencia con un antígeno presente en la pared del quiste de G. muris y en otras giardias aisladas de animales, sugiere que el antígeno es una parte integral y probablemente esencial de la pared del quiste de la giardia.

El autor señala que es deseable sustituir el anticuerpo policlonal por el monoclonal, aunque aún hay muchos obstáculos para ello, ya que el uso del segundo no presentó los resultados esperados, lo cual indica que el epítipo reactivo no se repite en la molécula o no se encuentra disponible en otros sitios de unión, luego que uno de éstos ya se ha ocupado.

Lo anterior, sugiere que probablemente los anticuerpos monoclonales para otros epítipes sobre la molécula (suponiendo que éstos existan) pueden usarse y prepararse como anticuerpos secundarios en un ELISA sandwich, con un anticuerpo monoclonal en un segundo sitio sin la necesidad de los poli-

clonales.

### 3.3 SISTEMA NERVIOSO

La infección por Citomegalovirus (CMV) representa un problema clínico importante y frecuente en pacientes inmunocomprometidos y puede causar trastornos muy severos en bebés infectados por su madre, por lo cual es imprescindible generar técnicas rápidas para evidenciar al virus en diferentes muestras y administrar la terapia más adecuada al paciente.

Gleaves y col (32) describen la evaluación de un equipo de hibridización de ADN in situ, en el cual se usa una sonda de ADN biotinilada, para detectar Citomegalovirus de muestras clínicas en cultivo centrifugado, que se comparó con un método de tinción inmunofluorescente indirecto, en el que se emplearon anticuerpos monoclonales.

El uso de técnicas de hibridización de ADN para detectar Citomegalovirus teóricamente, ofrece las ventajas de ser más sensible y más específico que el cultivo de células, pero requiere de personal técnico experto y reactivos costosos, en comparación con las técnicas actualmente utilizadas, por lo que las técnicas de hibridización no han desplazado realmente a las convencionales de uso regular.

Sorbello y col (37) desarrollaron tanto la tinción inmunofluorescente indirecta como directa usando anticuerpos monoclonales, demostrando que la primera fue más rápida que la

hibridización in situ seguida de la centrifugación, en las cepas de Citomegalovirus, (AD-169 de laboratorio y tres muestras obtenidas a partir de orina), lo cual concuerda con los resultados de Scott y col (84) y los de Gleaves y col (31). En resumen, concluyen que el anticuerpo monoclonal fluorescente indirecto, da mejores resultados que el directo o la sonda de ADN para detectar CMV rápidamente y que es confiable en muestras que tienen una alta concentración de virus. Asimismo, evidenciaron que la técnica de inmunofluorescencia indirecta no es superior a la del cultivo de tejidos para detectar CMV, por lo cual sugieren que las técnicas de hibridización y de fluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales, se usen en paralelo con la técnica del cultivo de tejidos para muestras especiales de diagnóstico difícil en los hospitales. También, recomiendan (56,87) el uso de la técnica inmunofluorescente indirecta para evidenciar la presencia de virus como Citomegalovirus, el herpes virus y virus de la influenza, cuyos ciclos de replicación son más cortos y se pueden evidenciar más rápidamente.

Gleaves y col (32) también evidenciaron a Citomegalovirus por una técnica de hibridización de ADN en cultivo centrifugado y por tinción con anticuerpos monoclonales posteriormente. En este estudio ambas técnicas mostraron un 88% de muestras positivas. Dos de las que no se detectaron podrían haberlo hecho por hibridización, si se hubiesen realizado posteriormente, es decir se hibridizaron prematuramente. El hecho

es que 16 de 17 o sea el 94% de muestras, se identificaron como positivas con anticuerpos monoclonales 42 horas antes de que se detectaran por la técnica de hibridización. Este es un lapso muy importante para detectar Citomegalovirus e involucra, en el caso de la hibridización, un retraso para manejar al paciente efectivamente.

Hoy en día, el uso del cultivo centrifugado seguido de la tinción de células en monocapa con anticuerpos monoclonales que reaccionan con la proteína nuclear temprana de Citomegalovirus, es el método de diagnóstico más efectivo y rápido como se demostró en éste y en los estudios de Scott y col (84). La técnica de hibridización es tan específica como la de tinción y casi tan sensible, pero requiere de más tiempo para que el virus se replique lo suficiente como para evidenciarse el ADN de replicación. Según se indica por lo anterior, la técnica de hibridización no es lo suficientemente rápida como para reemplazar el uso de anticuerpos monoclonales.

Jespersen y col (47) evaluaron en cuatro laboratorios un anticuerpo monoclonal para evidenciar el efecto pre-citofágico y detectar en forma rápida Citomegalovirus (CMV) en cultivos de células mantenidos en frascos viales durante 16 a 24 horas y 40 a 48 horas, después de la inoculación. Los resultados así obtenidos se compararon con cultivos de células en tubos convencionales. En promedio 137 de 166 (83%) y 143 de 166 (86%) de las cepas de CMV se detectaron entre 16 a 24 horas y 40 a 48 horas luego de la inoculación, respectivamente.

El anticuerpo monoclonal evaluado resultó ser suficientemente sensible y específico para detectar rápidamente la infección por el virus en cultivos en frascos viales y confirmar su presencia por cultivo de células en tubos convencionales por medio del efecto citofágico.

Por otro lado Thiele y col (97) usaron una mezcla de CMV y demostraron que las células, en monocapa en cultivo de 4 a 11 días, fueron más sensibles a la infectividad viral que los inoculados 11 días después de su preparación, por lo cual suponen que las células podrían perder receptores para adsorber el máximo posible de virus o, para disminuir el metabolismo celular y la división de las células.

Así, Jespersen y col (47) concluyen que, en general, el cultivo de células en monocapa fue más frágil y las células quedaron intactas, en comparación con las teñidas entre 16 y 24 horas después de la inoculación. Probablemente porque el tiempo de contacto adicional de la muestra con las células en monocapa contribuyó a su toxicidad, de manera similar a la toxicidad asociada con los cultivos de células en tubo que deben incubarse por varios días o semanas.

En 1989 McClintock y col (59) estudiaron 4 métodos para detectar rápidamente Citomegalovirus en cultivo de células. Estos métodos son: la tinción con anticuerpos monoclonales fluorescentes directos; la tinción con anticuerpos monoclonales fluorescentes indirectos; la hibridización in situ con sondas de ADN biotinilado; y la hibridización in situ utilizan-

do sondas de ADN directamente unidas a una peroxidasa de rábano enzimáticamente activa. En relación a sus resultados citan que solamente el segundo y cuarto métodos dieron resultados consistentes y confiables para la detección de CMV, tan pronto como 15 horas después de la infección, que según se estima es el tiempo en el cual ocurre la síntesis de ADN y que se encuentra a una concentración suficientemente alta para detectarse por la tinción de anticuerpos monoclonales fluorescentes indirectos. Se cita que la intensidad progresiva en el tamaño de la señal de hibridización en los métodos in situ, parece estar directamente relacionada a los eventos de replicación secuencial, que es, de hecho, de enorme importancia para distinguir entre una replicación viral activa y una infección latente.

Por otro lado Chou y Scott (15) estudiaron un método de cuantificación rápida de CMV usando anticuerpos monoclonales. El método involucra el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos a una proteína mayor del virus, cuya aparición es inmediata, y que tiene un peso molecular de 72Kd; este método se comparó con la técnica convencional en placa para cuantificar células libres, infectadas por CMV de la cepa AD-169 y de otras 20 cepas clínicas.

En base a los resultados, se sugiere que las células, infectadas son consistentemente útiles para monitorear un antígeno inmediato-temprano (IE) en un lapso de entre 16 a 24 horas luego de la inoculación, por lo cual todos los métodos usados son igualmente sensibles. La ventaja de usar métodos rápidos

radica más bien en la disponibilidad de resultados durante la noche, mientras que antiguamente se requería de más tiempo. El uso de metodologías rápidas aún debe compararse con las tradicionales para calibrarlas adecuadamente.

Por otro lado según se reporta, hay diferencias en los ensayos de neutralización dependientes de la cepa, los autores lo confirman pero no profundizan en ello. Aunque sí sugieren que es necesario hacer ensayos con una variedad importante de sueros inmunes, para neutralizar la actividad de las diferentes cepas de Citomegalovirus durante la formación de inmunoglobulinas específicas y de vacunas.

Señalan que entre los problemas para usar anticuerpos monoclonales en la tinción, se encuentra el límite del período de máxima expresión del antígeno IE, el costo de los reactivos y las variaciones del antígeno, por lo que posiblemente no se logra identificar a todas las cepas del virus.

Finalmente, señalan que no se lograron identificar a dos de 21 cepas, lo cual es importante sobre todo, si se pretende sustituir las técnicas convencionales por esta metodología; se recomienda así, usar las características de los anticuerpos monoclonales usados y evaluar los resultados obtenidos, hasta conseguir uno o varios anticuerpos monoclonales, cuyos resultados sean los óptimos.

Vlaspolder y col (111) reconocen que los anticuerpos monoclonales son herramientas valiosas en el diagnóstico de laboratorio para reconocer virus como el de la encefalomiocar-

ditis y en general de los virus de la familia Picornaviridae, mismos que no se liberan al brotar a la superficie, sino al estallar las células infectadas.

El aumento de virus de la encefalomiocarditis se evidencia por un aumento rápido de la absorbancia contra células infectadas con el virus y generalmente empieza 4.5 horas después de la inoculación del virus. Este incremento en la absorbancia se inhibe con el interferón, mismo que se puede titular rápidamente, y con la pre-incubación del inóculo viral con anticuerpos neutralizantes. Los autores desarrollaron un ensayo inmunoenzimático, en el cual se detectaron los anticuerpos neutralizantes desarrollados después de un período de infección de 8 horas, los títulos de anticuerpos fueron comparables con los obtenidos por otros exámenes. Los autores consideran que es posible desarrollar otros ensayos inmunoenzimáticos para detectar anticuerpos neutralizantes dirigidos a otros Picornavirus (por ejemplo, los poliovirus), y citan además que el ensayo inmunoenzimático es un método versátil que puede usarse para titular el interferón, los anticuerpos neutralizantes u otros antígenos en general.

Visvesvara y col (109) produjeron 14 líneas celulares que generaban anticuerpos monoclonales contra Naegleria fowleri, que se usaron para identificar al agente etiológico de la meningoencefalitis amibiana primaria en niños y adultos jóvenes. Los resultados obtenidos demostraron la alta especificidad de los anticuerpos monoclonales. Asimismo se encontró



que las cepas de N. fowleri, originarias de diferentes zonas geográficas, son antigénicamente homogéneas como lo demostraron las reactividades de estas cepas con 5 anticuerpos monoclonales. Resultó de mucho interés que toda la superficie del trofozoito era homogéneamente fluorescente, pero a diluciones mayores sólo la membrana de la superficie era fluorescente, ningún anticuerpo monoclonal reaccionó con ninguna otra especie de Naegleria o Acanthamoeba castellanii.

En el ensayo de inmunotransferencia con enzimas marcadas, los anticuerpos monoclonales reaccionaron con los antígenos de N. fowleri y produjeron bandas, con pesos moleculares de 160, 104, 93 y 66 Kd y otras bandas de 30 y 50 Kd que se teñían intensamente. Los anticuerpos monoclonales también reaccionaron con antígenos de N. lovaniensis y produjeron una banda teñida opaca de 160 Kd y otra banda teñida difusamente de 116 Kd, lo cual indica que estos antígenos los comparten las dos especies.

Krambovitis y col (51) reportan sus resultados sobre la producción de 4 anticuerpos monoclonales murinos específicos al polisacárido de ácido siálico de Neisseria meningitidis subgrupo B y de Escherichia coli K-1. Desarrollaron una técnica de aglutinación con partículas de látex para detectar hasta 10 ng/ml del polisacárido capsular. Un anticuerpo monoclonal cruzó con N. meningitidis del subgrupo C, mientras que los otros 3 identificaron específicamente a los meningococos del subgrupo B

y al polisacárido de Escherichia coli K-1, y según los resultados obtenidos parecen haber identificado epítopes estructurales, mientras que el anticuerpo que cruzó, identificó sólo al ácido siálico, lo cual, además, se confirma por el aumento en la concentración mínima del antígeno detectado por la técnica de aglutinación en látex, mientras que la longitud de la cadena de ácido colomínico disminuía.

Estos comentarios son relevantes, dado que los glicolípidos que contienen ácido siálico se han aislado a partir de cerebro de ratas recién nacidas y de bebés humanos en estado embrionario y cruzan, tanto con anticuerpos policlonales como con los monoclonales.

La técnica de aglutinación con partículas de látex se basó en la especificidad de los anticuerpos monoclonales. Sin embargo, los resultados que se obtienen en muestras frescas (81% de sensibilidad) y los resultados de muestras refrigeradas (48% de sensibilidad) varían notablemente, lo cual sugiere una pérdida de antígenos en las muestras clínicas al refrigerarse, que aunque podría no ser importante en la clínica, sí lo es al evaluar la técnica.

Además, se ha encontrado que algunas de las cepas de Moraxella no liquefaciens producen un polisacárido capsular idéntico al que producen los meningococos del subgrupo B, este microorganismo podría ser una fuente importante de resultados falsos-positivos, aunque no se cree posible encontrar dicho polisacárido en fluidos infectados por N. meningitidis o por E.

coli K-1.

Se concluye que la técnica de aglutinación es rápida, sensible, (en hemocultivos la sensibilidad fue de 94% y la especificidad del 99.4%), simple y que podría usarse en otros fluidos humanos como orina y suero, por lo que ofrece ciertas ventajas sobre otras técnicas inmunológicas para usos diagnósticos.

En relación a la enfermedad de Lyme que se sabe es un desorden multisistémico que sigue a la mordedura de un ácaro presente en Norteamérica, Europa y Australia y cuya manifestación más característica es el eritema crónico que se acompaña o va seguido de artritis aguda, neuritis craneal y meningoencefalitis o alteraciones cardiacas. La causa de esta enfermedad es un agente infeccioso de la familia de las espiroquetas y que puede cultivarse en medios libres de células.

Las espiroquetas se han aislado en sangre de ratones, venados y mapaches. Sin embargo, es poco lo que se sabe sobre las espiroquetas en mamíferos y se ignora si la enfermedad de Lyme es la evidencia de una invasión de los tejidos, si es causada por la elaboración de una toxina por las espiroquetas, o bien si el hospedero monta una respuesta inmune que sea un factor relevante en este tipo de alteraciones.

Un factor importante para estudiar a fondo la patogenicidad de esta enfermedad es la superficie de la espiroqueta involucrada, ya que al parecer es la que interacciona en primer término con el hospedero durante la infección, por lo cual,

Barbour y col (4) generaron y seleccionaron una tinción inmunofluorescente y un ensayo de inmunolectrotransferencia con anticuerpos monoclonales dirigidos en su mayoría a determinantes, que son parte de, o que se asocian a una membrana externa proteica abundante en la espiroqueta.

Se encontró que un determinante, el H5332, estaba presente en todas las cepas de espiroquetas examinadas y se agregaba en tramos, en forma de lunares o manchas, cuando se unía al anticuerpo y al segundo ligando, pero no se unía con Borrelia, ni con Treponema, ni con Leptospira.

Por medio de microscopía electrónica, se descubrió que el H5332 se distribuye difusamente sobre la superficie de espiroquetas pre-fijadas y por radioinmunoprecipitación e inmunolectrotransferencia se encontró que se asociaba fuertemente a una proteína de la membrana externa, muy abundante, que es parte de o está asociada con una proteína de peso molecular de 31 kd, que se localiza dentro o encima de la membrana externa que se encontró se marcaba pobremente con yodo, tal vez porque, está expuesta en la superficie de la célula, aunque se han encontrado evidencias que discrepan de esta suposición. Sin embargo, no se excluye la posibilidad de que exista un epítipo no-proteico unido a esta proteína que es inmunogénica en pacientes humanos y en animales de laboratorio, y que se ha encontrado en todos los aislamientos examinados hasta la fecha.

En relación al virus Herpes simplex, Pouletty y col (70) usaron un anticuerpo monoclonal fluorescente para detec-

tarlo directamente en las muestras. El anticuerpo generado reaccionó con los tipos 1 y 2 del virus del herpes simple no observándose reactividad cruzada con el virus Varicella zoster, ni con Citomegalovirus, ni con el virus Epstein-Barr. Además, se comparó la metodología del anticuerpo monoclonal fluorescente con el aislamiento del virus en cultivo de tejidos, la sensibilidad y la especificidad del primer método fueron de 84.6% y 95.7%, respectivamente. No se encontraron diferencias importantes, ni en sensibilidad, ni en especificidad, en función del origen de la muestra. Todos los aislamientos positivos por el método del anticuerpo monoclonal fluorescente y negativos por cultivo de tejidos provenían de muestras de lesiones herpéticas de los pacientes que sufrían la infección con la consecuente presencia de un mayor número de virus viables, por lo cual los valores obtenidos pueden ser mayores con el anticuerpo monoclonal fluorescente que por cultivo de tejidos.

La técnica del anticuerpo monoclonal fluorescente es particularmente útil por ser rápida (puede confirmarse en menos de 2 horas), sobre todo ahora que se emplea una terapia específica, el acyclovir, especialmente en embarazos, puesto que el virus del herpes es teratogénico.

Woods y Mills (115) compararon un método de cultivo de células en tubo convencional, con un método de inoculación centrifugación de células MRC-5 y posterior tinción con anticuerpos monoclonales fluorescentes para detectar al virus del herpes simple en muestras clínicas, encontrando que sus resul-

tados discrepan importantemente con respecto a estudios previos de Gleaves y col (30), ya que un número importante de muestras en que se detectó el virus por la técnica convencional de cultivo de células, fue pasado por alto con la técnica de inoculación-centrifugación de células MRC-5 teñidas con anticuerpos monoclonales específicos al serotipo, después de 16 a 18 horas de incubación; aunque según Woods y Mills, existen diferencias muy importantes entre éste y estudios previos, por ejemplo, dichos investigadores examinaron 699 muestras en comparación con Gleaves y col quienes examinaron 116 muestras, además de que usaron células MRC-5 en cultivo de células en tubo, mientras que los primeros autores usaron primero células de riñón de conejo y luego células A 549.

Existe una polémica entre la línea celular de elección para aislar al virus Herpes simplex, ya que algunos estudios han demostrado que tanto los fibroblastos humanos como las células de riñón de conejo dan resultados aceptables, al igual que las células A 549, también útiles para recuperar al menos al virus del herpes simple. Sin embargo, otros estudios demostraron que las células MRC-5 son menos sensibles que las células de riñón de conejo para detectar al virus del herpes simple (68).

Precisamente en base a la especificidad de las células de riñón de conejo para el virus del herpes simple, los citados autores Woods y Mills usaron estas células y evaluaron los resultados usando células A 549 como línea celular alterna-

tiva, encontrando también que las MRC-5 tienen una sensibilidad más baja comparada con la línea de células de riñón de conejo. Una razón para explicar la baja sensibilidad del método de inoculación-centrifugación es el bajo título de virus, que se observó en la muestra inicial.

Se señala también que el método de tinción con anticuerpos policlonales es superior en sensibilidad al método de tinción con anticuerpos monoclonales.

Se concluye que el método de inoculación-centrifugación de células MRC-5 y la tinción con anticuerpos monoclonales fluorescentes, después de una incubación durante toda la noche, no debe sustituir al método convencional de cultivo de células en tubo para detectar al virus del herpes simple, especialmente en laboratorios de referencia, ya que el tiempo necesario para el transporte de las muestras redundaría en el retraso para procesar la muestra y consecuentemente en la disminución del título de virus. Sugieren hacer una evaluación más profunda de las líneas celulares para sustituir la línea MRC-5. Los anticuerpos monoclonales no deben sustituir a los policlonales.

Por otro lado, Espy y Smith (20) compararon la detección del Herpes simple por tres metodologías, una con un equipo que involucraba una sonda de ADN biotinilado; otra con un anticuerpo monoclonal y luego fluorescencia para detectar al virus en muestras clínicas 16 horas después de la inoculación del virus en frascos viales y la tercera, por cultivo de células en tubo convencional, encontrando que un 89% de las

muestras positivas se identificaron por los 3 métodos, la máxima sensibilidad de entre los 3 métodos se obtuvo con la sonda de ADN y con los anticuerpos monoclonales (98 y 97% respectivamente), por lo cual se demostró que el equipo que incluye la sonda de ADN puede usarse como una alternativa a las metodologías con anticuerpos monoclonales para detectar rápidamente al virus del herpes simple.

De igual manera Nerurkar (64) trabajó con un ensayo inmunoenzimático, en el que usó biotina-estreptoavidina y comparó sus resultados con un análisis de endonucleasas de restricción para establecer el tipo de virus del herpes simple y establecer una referencia para comparar los resultados del método enzimático, y de otro en el cual usaban anticuerpos monoclonales fluorescentes. Los resultados obtenidos por los tres métodos fueron consistentes y altamente satisfactorios con características de sensibilidad y especificidad de 100%. Sin embargo, se recomienda el ensayo inmunoenzimático por su simplicidad, rapidez y porque no se usan radioisótopos.

Aunque no hay ninguna diferencia muy importante entre el cultivo de células en tubo convencional y la prueba de hibridización de ácidos nucleicos o con la de anticuerpos monoclonales fluorescentes en frascos viales, las últimas dos pruebas detectaron 3 muestras positivas más que el primero, el cual todavía requirió de 2 o más días.

Resumiendo, el método de cultivo de células en tubo convencional es el más económico y simple de los métodos de



diagnóstico para detectar al virus del herpes simple sin importar el origen de la muestra (genitales, boca, piel, ojos, líquido cefalorraquídeo, tejido particularmente del cerebro, etc). Las técnicas de hibridización de ADN y anticuerpos monoclonales fluorescentes son más rápidas pero costosas, además de que podrían involucrar reacciones cruzadas. Se concluye que el método de hibridización de ADN biotinilado es sensible y específico para diagnosticar al virus en frascos viales, 16 horas después de su inoculación y que puede ser una buena alternativa a los anticuerpos monoclonales fluorescentes como técnica de diagnóstico rápido.

Bussereau y col (11) estudiaron cepas del virus de la rabia y otras cepas relacionadas con éste, usando un conjunto de anticuerpos monoclonales dirigidos en contra de las proteínas de la nucleocápside o de antígenos de una superficie de las células del virus Mokola (MOK-3), cada cepa se analizó en paralelo por cultivos de células e infectando ratones. Se determinaron los patrones de reactividad de los diferentes anticuerpos monoclonales por procedimientos de tinción con anticuerpos monoclonales fluorescentes. En las células, los anticuerpos monoclonales diferenciaron a las cepas del virus de la rabia, de las cepas de virus relacionados con el de la rabia. Se confirmó la serotipificación de los grupos establecidos con anticuerpos monoclonales antivirales de la rabia excepto por una cepa de virus, que al parecer está relacionado con el subtipo Africano Duvenhage, dentro de las cepas clasificadas como Mokola, (cada

una de las cuales pareció ser distinta). Un subgrupo, el Duvenhage reaccionó diferente al europeo. Se usaron dos anticuerpos monoclonales específicos para los antígenos de la superficie de la célula en exámenes de neutralización con todas las cepas, neutralizándose la infectividad de los virus Mokola. En base a los resultados se cree que el virus de la rabia evolucionó separadamente de los virus relacionados con la enfermedad, aunque parecen compartir un epítope común a la nucleocápside y a las proteínas de la superficie de todos los virus de la rabia y los relacionados con éste. Ahora está en investigación un uso potencial de estos anticuerpos monoclonales para diagnosticar virus relacionados con el de la rabia (al reemplazar anticuerpos policlonales por monoclonales) en improntas.

#### 3.4 SISTEMA RESPIRATORIO

Se han realizado estudios sobre la hemaglutinina filamentosa (FHA) de Bordetella pertussis, como el reportado por Gustafsson y Askelof (35), en el cual mediante ensayos de electroforesis, se confirma la presencia de bandas de 58 a 240 Kd que pueden identificarse por medio de ensayos inmunoenzimáticos con anticuerpos monoclonales. En este estudio, la FHA de Bordetella pertussis, mostró un límite de detección comprendido entre 7 a 15 ng/ml, en el cual se identificaron todas las cepas de B. pertussis y B. parapertussis, así como algunas cepas de B. bronchiseptica.

Los autores destacan que con el ensayo inmunoenzimático utilizado por ellos, se tiene la ventaja de poder discriminar entre bacterias muertas y vivas, pudiendo identificar a éstas últimas. Además, es posible identificar y hasta cuantificar los antígenos solubles liberados por la bacteria.

Por otro lado, se señala que aunque a menudo los anticuerpos policlonales muestran una sensibilidad mayor y una especificidad menor que los anticuerpos monoclonales, la sensibilidad del ensayo no se incrementó al usar anticuerpos policlonales como el anticuerpo capturado en el ensayo inmunoenzimático. Además de que los anticuerpos policlonales generalmente están disponibles en cantidades limitadas, mientras que los monoclonales lo están en forma ilimitada, siempre y cuando el hibridoma se encuentre estable, lo cual favorece su uso.

Posteriormente en 1989, los mismos autores (36) desarrollaron un nuevo ensayo inmunoenzimático con anticuerpos monoclonales específicos a la FHA y al lipopolisacárido (LPS) para determinaciones rápidas de B. pertussis. Encontraron que de diez cepas de la bacteria, todas reaccionaban positivamente con estos anticuerpos monoclonales. De catorce cepas de B. parapertussis todas se identificaron con dos anticuerpos monoclonales FHA-específicos pero no con anticuerpos LPS específicos, mientras que las cepas de B. bronchiseptica mostraron un patrón de reacción variable. No se identificaron reacciones cruzadas de B. pertussis con S. mitis, S. pyogenes, S. pneumoniae, S. aureus, Moraxella catarrhalis ni con Klebsiella pneumoniae.

Según los autores, este ensayo inmunoenzimático debe considerarse sensible, ya que cada prueba positiva representa una unidad formadora de colonias. Otra ventaja es que se detectan tanto antígenos solubles como bacterias enteras y no depende de la viabilidad de la bacteria en la muestra, mientras que otros ensayos como el de inmunotransferencia de colonias, sólo identifica bacterias vivas.

Asimismo, reportan que el anticuerpo monoclonal específico a la FHA reaccionó sólo con tres aislamientos de B. parapertussis mientras que por inmunotransferencia, todos los anticuerpos monoclonales FHA-específicos identificaron plenamente a todos los aislamientos de B. parapertussis.

Concluyen que las diferencias en reactividades entre anticuerpos monoclonales y aislamientos de B. parapertussis, sugieren cierta heterogeneidad en la estructura de la FHA de la bacteria, lo cual podría usarse para diferenciar B. pertussis y B. parapertussis en muestras clínicas.

En relación a Mycobacterium tuberculosis, el antígeno 5 es una proteína bien caracterizada de 35 Kd, que se ha purificado a partir de cultivos de M. tuberculosis, resultando ser compartida sólo por M. bovis de entre catorce especies de micobacterias estudiadas, ya que al parecer, una característica de las cepas de Mycobacterium es que no tienen antígenos específicos para cada especie, por lo cual se consideraba muy difícil producir un anticuerpo monoclonal que identificara sólo a una especie.

Olds y col (65) produjeron en ratones, 19 anticuerpos monoclonales dirigidos al antígeno 5 purificado y encontraron una elevada especificidad de los anticuerpos por los antígenos 5 y 6, lo cual sugiere que hay un tercer epítoto compartido tan solo por estas dos proteínas. La enorme variabilidad en los resultados sugiere la posible existencia de un tercer o hasta un cuarto epítoto, o inclusive cambios en la conformación antigénica causada por las diferentes técnicas empleadas, o diferentes afinidades de unión requeridas para que se positivisen los resultados en cada ensayo.

Al aislar el antígeno 5, se contaminaba con el 6 lo cual sustenta la hipótesis de que ambos, en ciertas micobacterias, comparten al menos un epítoto. Los resultados del ensayo inmunoenzimático sugieren que el epítoto del que se habla se encuentra solamente en M. tuberculosis. Por lo cual se concluye que los antígenos de las micobacterias son comunes entre ellos y que hay dos epítotos compartidos, mismos que podrían tener una estructura de carbohidratos, ya que presentan muchas reacciones cruzadas con arabinomananas y con arabinogalactano. Se identificó un tercer epítoto con un anticuerpo monoclonal, el cual se unió a los antígenos 5 y 6 por medio de un ensayo inmunoenzimático, no se encontró reactividad cruzada en este caso, por lo cual ese anticuerpo monoclonal podría ser útil para purificar al epítoto 5. A este respecto, se demostró que los anticuerpos monoclonales producidos pueden usarse para purificar el antígeno llevándolo a una alta pureza,

por cromatografía en columnas.

Posteriormente, Worsaae y col (117) produjeron anticuerpos monoclonales en ratones BALB.B10 para identificar nuevos determinantes antigénicos en filtrados de cultivo de Mycobacterium tuberculosis. De estos anticuerpos, diez se usaron para determinar la especificidad del antígeno y la reactividad entre especies; seis se usaron como inmuoadsorbentes para purificación, por afinidad con sus antígenos correspondientes. Dos anticuerpos monoclonales reaccionaron con un antígeno de 17Kd, luego se demostró que ambos estaban dirigidos al mismo epítipo o a epítipos muy cercanos el uno al otro. Otro anticuerpo monoclonal reaccionó con una molécula de 38Kd a la cual se había dirigido un anticuerpo monoclonal adicional, aún y cuando éste se había dirigido a otro epítipo de una molécula diferente. Un último anticuerpo monoclonal reaccionó con un filtrado de un cultivo de M. tuberculosis pero no con uno de Mycobacterium bovis, ni con las fracciones de la membrana de la bacteria, o con las fracciones antigénicas de superficie, concluyéndose así que este anticuerpo monoclonal llamado HBT 10 puede ser útil para monitorear enfermedades por M. tuberculosis y diferenciar a los pacientes inmunizados con la vacuna BCG.

Los autores reportan que tuvieron muchas dificultades para purificar antígenos, por lo cual sugieren como una alternativa, el uso de una columna de cromatografía por afinidad, a través de una matriz sólida con un anticuerpo

anti-beta galactosidasa. Asimismo, citan que los antígenos purificados, ahora se están utilizando como estimuladores potenciales de células T en ensayos in vitro, de proliferación de linfocitos en sangre periférica en pacientes con tuberculosis y donadores de sangre vacunados con BCG, aunque aún se desconoce si estos antígenos comparten epítopes de células T, con moléculas de otras cepas de micobacterias. Falta también elucidar la forma en que las proteínas estimulan y activan clonas de células T protectoras, por lo cual siguen estudiando los anticuerpos que produjeron para usarlos con propósitos de diagnóstico.

En relación también a Mycobacterium, pero particularmente en el caso de Mycobacterium leprae, Young y col (118) produjeron nueve líneas celulares de anticuerpos monoclonales frente al único glicolípido fenólico de esta bacteria. Uno de los anticuerpos presentó una especificidad relativamente baja ya que se unió a un glicolípido de Mycobacterium kansasii, mientras que los demás anticuerpos sí fueron específicos para el lípido de M. leprae. Algunos anticuerpos requerían que la porción del carbohidrato (trisacárido) estuviera intacta para reconocer el antígeno glicolípídico, mientras que otros reconocían formas parcialmente hidrolizadas que carecían de uno o dos azúcares. Los anticuerpos dirigidos contra el sacárido terminal del glicolípido, producían una enorme especificidad para identificar a M. leprae en ensayos inmunoenzimáticos. Estos anticuerpos marcaron con gran brillo a toda la micobacteria en

ensayos de inmunofluorescencia indirecta, con lo cual se demuestra la ubicación de los determinantes antigénicos, específicos en la superficie de la micobacteria, proporcionando así más información sobre las propiedades antigénicas del glicolípido fenólico. Los autores (118) citan, en base a sus experiencias anteriores, que en las muestras de suero de pacientes con lepra, la respuesta inmune que domina en el humano es la representada por la inmunoglobulina "M" específicamente dirigida al trisacárido terminal, que por cierto no se había encontrado en la naturaleza, por lo cual los anticuerpos monoclonales deben ser muy específicos.

También en base a sus resultados sugieren que las inmunoglobulinas "M" son más susceptibles de producir uniones no específicas que la IgG, por lo que podrían haber reacciones inespecíficas con Mycobacterium no-cromogénico.

Asimismo, indican que el glicolípido fenólico podría ser un componente importante de la cápsula que rodea a M. leprae, aunque se necesitarán estudios posteriores para deducir la importancia de esta observación.

Por otro lado, al parecer los anticuerpos monoclonales de este estudio también podrían usarse para cuantificar el antígeno y sus localizaciones en lesiones con presencia de esta bacteria.

Los anticuerpos monoclonales también se han utilizado como herramientas para investigación taxonómica, como en el caso del estudio de Brindle y col (8) en el cual se produjeron



19 anticuerpos monoclonales para producir patrones de tinción inmunofluorescente de Legionella pneumophila; 12 de estos 19 anticuerpos monoclonales se seleccionaron para dividir L. pneumophila en 17 subgrupos, en los que generalmente es más fácil y menos ambiguo clasificar los aislamientos de esta bacteria que en los serogrupos actuales. Además, se definieron los subgrupos del serogrupo 1, que es el más común.

Cabe señalar que la clasificación actual se realizó identificando subgrupos por medio de anticuerpos policlonales, aunque un enorme grupo de aislamientos produjeron patrones de inmunofluorescencia no tan fácilmente clasificables, lo cual refleja que la forma actual es inadecuada y que sería más confiable una nueva, elaborada mediante anticuerpos monoclonales fluorescentes para evidenciar las relaciones entre los serogrupos de L. pneumophila.

Ahora bien, con su selección de anticuerpos monoclonales los autores dividieron a un grupo predefinido como 4, 8 y 10, con anticuerpos policlonales ahora en cinco grupos, el 10, el 4/10, el 4, el 14 y el 8, aunque cada grupo casi se fusiona en el siguiente. El 14 es el último en describirse (6), el 4 no fue bien caracterizado, porque la fluorescencia que presentó no la produce ningún otro aislamiento. Existen otros subgrupos que no se identificaron con este conjunto de anticuerpos monoclonales, aunque no se duda de que su existencia se confirmará en otros estudios.

La importancia de analizar estos datos radica en que

se demuestra lo fácil de identificar cada subgrupo con anticuerpos monoclonales, por lo cual se asume que éstos son muy específicos y se recomienda usarlos en substitución de los policlonales.

Hierholzer y col (41) compararon dos técnicas para detectar al virus sincicial respiratorio y al antígeno del virus de la para-influenza, encontrando que el TR-FIA (método basado en la quelación de metales y en la fluorometría con anticuerpos monoclonales) parece ser más sensible para detectar antígenos de virus respiratorios que los ensayos inmunoenzimáticos con anticuerpos monoclonales biotinilados.

En este reporte, igual que en otros mencionados, se evidencia que todos los ensayos en que se usan anticuerpos monoclonales son más sensibles que los que utilizan anticuerpos policlonales.

El TR-FIA detecta antígenos virales en un 100% a partir de heces y en un 85% de muestras de tracto respiratorio. La sensibilidad es particularmente importante, ya que los virus sincicial respiratorio y el de la para-influenza son los agentes causales de enfermedades agudas o crónicas mas importantes, tanto de vías respiratorias superiores como de inferiores en niños y adolescentes. Se trató de incrementar la sensibilidad del TR-FIA incluyendo una mezcla de anticuerpos monoclonales, pero al parecer no se incluyeron los adecuados, por lo que no se aumentó la sensibilidad del método, pero sí la de los ensayos inmunoenzimáticos con anticuerpos monoclonales biotinilados.

Los anticuerpos monoclonales actúan aún a diluciones muy altas y pueden almacenarse indefinidamente a  $-90^{\circ}\text{C}$ , por lo cual los costos de preparación disminuyen. Se puede montar la técnica y concluir los resultados en dos horas, lo cual redonda en diagnósticos rápidos y terapias adecuadas.

Los anticuerpos monoclonales frente a la proteína F del virus sincicial, fueron mucho más sensibles en el TR-FIA que frente a la cápside. Estos resultados fueron sorprendentes, ya que se habían observado sensibilidades similares en el ensayo inmunoenzimático y en el inmunofluorescente con múltiples cepas aisladas de cultivos celulares; el antígeno predominante en las secreciones nasales a partir de infecciones activas es la glicoproteína  $\Psi$ . Como era de esperarse, la glicoproteína de superficie F y el HN del virus de la influenza reaccionaron tanto en el TR-FIA como en los ensayos inmunoenzimáticos y en los fluorescentes, dadas sus propiedades biológicas, respecto a su papel en la entrada del virus y en la inducción de anticuerpos protectores.

Posteriormente, Waris y col (112) estudiaron un método de determinación de los virus sincicial respiratorio y de la influenza tipo A, por medio de una tinción de anticuerpos monoclonales con peroxidasa y lo compararon con la técnica de aislamiento y cultivo de virus y con el método conocido como TR-FIA.

Los resultados indican que el método de la inmunoperoxidasa es altamente específico y sensible y no requiere de

microscopía fluorescente que suele ser costosa. No se observaron reacciones falsas positivas con muestras conteniendo adenovirus, Citomegalovirus, virus Herpes simplex o virus de la para-influenza.

En este trabajo las tres técnicas mostraron un promedio en sensibilidad similar al TR-FIA y al aislamiento. Sin embargo, si las muestras se inoculan hasta 3 h después de la toma de la muestra la técnica con peroxidasa es más sensible que el TR-FIA. En particular, para detectar virus A de la influenza, tanto la técnica con peroxidasa marcada, como el TR-FIA tienen un promedio de sensibilidad igual. La sensibilidad y la especificidad de TR-FIA fueron comparables con lo obtenido por aislamiento de los virus sincicial respiratorio y el A de la influenza, aunque comercialmente sólo se pueden encontrar equipos inmunoenzimáticos para detectar al virus A de la influenza.

En vista de lo anterior, el método de elección para diagnosticar infecciones causadas por el virus A de la influenza es el de la inmunoperoxidasa, que puede usarse como un método alternativo al aislamiento del virus y es aplicable para estudiar la sensibilidad de cepas de virus frente a medicamentos antivirales.

Stout y col (33) evaluaron el diagnóstico de las enfermedades respiratorias de etiología viral, usando una mezcla de anticuerpos monoclonales tanto como método de confirmación de cultivo de células como método de monitoreo rápido.

La mezcla de anticuerpos monoclonales se usó en un procedimiento de tinción fluorescente de dos fases; en la primera, sólo con cultivo de células se encontró una sensibilidad y una especificidad del 91% y 94%, respectivamente; en la segunda, en células exfoliadas de nasofaringe o de tráquea, por tinción directa, la sensibilidad y la especificidad fueron del 69% y del 97%, respectivamente, lo cual demuestra que la mezcla de anticuerpos monoclonales es altamente específica, aunque poco sensible para diagnosticar 7 diferentes virus respiratorios, además de ser rápida y potencialmente económica, en comparación con el cultivo de células para examinar directamente las muestras en la detección de más de un virus respiratorio.

Se destaca que independientemente del virus de la influenza B, que no se detectó, la mezcla de anticuerpos monoclonales mostró una buena especificidad para detectar 7 diferentes virus respiratorios como se mencionó anteriormente, no obstante la baja sensibilidad obtenida. Sin embargo, ni el cultivo ni otras técnicas son del todo específicas para la gama de virus en cuestión -según dice el autor- tal vez debido a que la mezcla de anticuerpos monoclonales seleccionada no fue la más adecuada, pero se señala que ésta es más rápida (45-90 min) en comparación con un ensayo inmunoenzimático o con el aislamiento del virus por cultivo de células, además de que el penúltimo ensayo mencionado sólo detecta virus sincicial directamente mientras que la mezcla de monoclonales permite reducir lo más posible el costo del examen y se puede usar aún cuando

no se aisle al virus y detecta una amplia variedad de virus respiratorios.

Por otro lado, se justifica la baja sensibilidad de los anticuerpos monoclonales en función de un número bajo de virus en la muestra. Aunado a la transportación de las muestras en hielo -que es inevitable- da como resultado una proteólisis enzimática y pérdida de los antígenos virales.

Lo anterior podría sugerir que la mezcla de anticuerpos involucra varias eventualidades que conllevan a una baja sensibilidad. Sin embargo, concluyen que esta mezcla de anticuerpos monoclonales es una buena alternativa diagnóstica y confirmativa, que aún puede mejorarse.

Posteriormente, Hierholzer y col (40) adaptaron una nueva técnica de TR-FIA desarrollada con anticuerpos monoclonales y la compararon con varios ensayos inmunoenzimáticos para detectar antígenos de adenovirus en diversas muestras. El ensayo inmunoenzimático más sensible fue uno en el cual se usaba biotina de marcador y un conjugado de estreptoavidina-peroxidasa.

Todos los exámenes se evaluaron con aspirados de nasofaringe de enfermos con padecimientos respiratorios, con homogeneizados de tejidos de pacientes con infecciones sistémicas y con heces de enfermos con padecimientos gastrointestinales. En los enfermos del sistema respiratorio y en muestras de tejidos, el TR-FIA identificó adenovirus en un 85% de las muestras positivas por cultivo, que presentaban una sensibilidad

similar (79%), a la del ensayo inmunoenzimático con anticuerpos monoclonales y una marca de biotina-avidina. Otro ensayo inmunoenzimático en el cual se usaron anticuerpos policlonales y biotina-avidina, mostró una sensibilidad del 88%. En heces, el TR-FIA detectó el 100% de adenovirus de muestras positivas por cultivo, siendo así decididamente superior a los ensayos inmunoenzimáticos, en los cuales se detectó el 78% y el 75% al utilizar anticuerpos monoclonales y policlonales, respectivamente.

Este estudio demostró que el TR-FIA es eficiente, flexible y específico para un número importante de muestras clínicas, y que los anticuerpos monoclonales son invariablemente más sensibles que los policlonales. La especificidad y hasta cierto punto la sensibilidad del TR-FIA con anticuerpos monoclonales pueden aumentarse cambiando la selección de anticuerpos monoclonales.

El ensayo inmunoenzimático con anticuerpos monoclonales marcados con biotina es más sensible que el método en el que se usan anticuerpos policlonales. La biotinilación es sencilla, los reactivos son baratos y estables ilimitadamente a una temperatura comprendida entre  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-70^{\circ}\text{C}$ , usándose el mismo equipo que con el policlonal.

El TR-FIA se hace más simple con una sola incubación sin disminuir su sensibilidad, pero requiere de inversiones más fuertes en reactivos, amortiguadores, purificaciones, etc., aunque una vez montado es estable.

### 3.5 ENFERMEDADES SISTEMICAS

Viscidi y col (108) detectaron al virus de la inmunodeficiencia humana por medio de un anticuerpo monoclonal en solución, en un ensayo de hibridización en el que se detectaron los ácidos nucleicos del virus. Describen un ensayo de hibridización no isotópica, nuevo, en fase líquida, para medir el ARN viral en muestras biológicas con ADN biotinilado. La técnica de hibridización se comparó con un ensayo por captura de antígeno, mostrando el primero una sensibilidad del 93.5% y una especificidad del 94.6%, aunque se considera que al detectar al virus en los linfocitos de los pacientes puede estar identificándose al virus infectante aunque éste no necesariamente se esté replicando in vitro.

El ensayo se realiza en dos partes: en la primera, se lleva a cabo una hibridización con una sonda isotópica y en la segunda, los híbridos de ADN-ARN biotinilados, se detectan en una reacción inmune en fase sólida similar a las reacciones enzimáticas, pero con la ventaja de combinar la alta sensibilidad y especificidad de una hibridización, con las conveniencias de la amplia disponibilidad de los sistemas inmunoenzimáticos.

Los inconvenientes observados al realizar la técnica de hibridización con un anticuerpo monoclonal son: el tiempo necesario para que los antígenos virales y ácidos nucleicos lleguen a valores detectables, dificultades propias del mues-



treo y la conservación de la muestra, ya que a menudo es difícil cultivar virus de pacientes que se sabe tienen una infección y se sospecha que son portadores del virus pero es difícil comprobarlo. También se ha confirmado y observado al virus directamente en muestras iniciales, es decir, sin replicarlo in vitro, esta observación podría deberse a reacciones de hibridación falsas positivas, aunque los autores no lo creen posible en vista de que ninguna de las muestras positivas reaccionó con un plásmido recombinante que contenía un fragmento de ADN del genoma del virus Coxackie B3 y por la baja reactividad observada con una muestra de una mezcla de células mononucleares de donadores seronegativos.

Por todo lo anterior, se asume que los ensayos de hibridación con anticuerpos monoclonales en solución, tienen el potencial de convertirse en un sistema de detección de ácidos nucleicos de microorganismos a partir de muestras biológicas, se podrá usar ampliamente, ya que es confiable y permitirá el control cuantitativo de las reacciones de identificación.

En relación con Pseudomonas aeruginosa que se ha convertido en uno de los agentes etiológicos causantes de una muy alta morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos con heridas quirúrgicas, quemaduras, traumatismos y cáncer, Pfaller y col (69) evaluaron un anticuerpo monoclonal fluorescente directo para detectar a esta bacteria en hemocultivos. Se encontraron magníficos resultados, ya que el bacilo se identificó en 44 de 45 (98%) hemocultivos y 131 de 133 (98%)

cultivos en los que habían otros bacilos Gram negativos, la especificidad del reactivo se confirmó por la tinción directa de 10 serotipos de P. aeruginosa (todos positivos) y 57 bacilos Gram negativos, que incluían 8 especies de Pseudomonas diferentes a P. aeruginosa (todos negativos). Así mismo se encontró un resultado falso negativo para el cual no hay explicación según los autores, aunque consideran que los antígenos de la membrana externa de la bacteria se enmascararon durante su crecimiento en el cultivo, por lo cual no pudieron evidenciarse posteriormente; también citan que el cultivo de donde se obtuvo el falso negativo estaba en una botella en anaerobiosis, por lo cual probablemente creció solo P. necrophorum y no Pseudomonas sp, o que tal vez éstas no eran viables.

La metodología del anticuerpo monoclonal fluorescente directo es fácil de llevar a la práctica, rápida (50 minutos aproximadamente) y parece prometedora.

Por otro lado Husson y col (44) aislaron y caracterizaron anticuerpos monoclonales dirigidos a una fosfatasa alcalina producida por Pseudomonas aeruginosa, todas las clonas de anticuerpos reaccionaron con dicho microorganismo en ensayos inmunoenzimáticos y de inmunofluorescencia indirecta incluyendo 17 serotipos y 2 cepas no tipificables. Se observaron reacciones cruzadas con 3 anticuerpos monoclonales, aunque sólo con algunas especies de Pseudomonas por la homología de su ARNr. En unos experimentos originales realizados en aislamientos

clínicos, se demostró que la fosfatasa alcalina de Pseudomonas se encuentra en la superficie de la bacteria, por lo cual se considera posible identificar a P. aeruginosa directamente en muestras clínicas con esta metodología.

Asimismo, se considera que las reacciones cruzadas entre ésta y otras especies como P. fluorescens y P. stutzeri no son importantes, ya que son sensibles a los mismos antibióticos.

El esquema internacional de tipificación antigénica (IATS) para tipificar Pseudomonas aeruginosa se usa casi universalmente, aunque algunos investigadores prefieren el esquema de Homma (42), que corresponde íntimamente al IATS.

La actual disponibilidad de anticuerpos comerciales ha permitido que los laboratorios clínicos reduzcan la necesidad de laboratorios de referencia y ha permitido evaluar la superioridad de los anticuerpos policlonales de conejo para serotipificar rutinariamente los aislamientos clínicos.

Strickland y col (94) compararon anticuerpos policlonales de conejo con anticuerpos monoclonales para tipificar Pseudomonas aeruginosa, los resultados demostraron que los segundos monoclonales fueron contundentes y más rápidos que los primeros excepto una cepa denominada M. Estos resultados se aplican a casi todas las cepas, excepto a aquéllas no tipificables con anticuerpos monoclonales como la "M". Como resultado del incremento en el número de aislamientos de P. aeruginosa en pacientes con fibrosis quística, también ha

aumentado la proporción de cepas poliaglutinantes, es decir, de aquellas cepas que aglutinan con 3 o más anticuerpos a tipos "O", tales como el 03, el 05, el 09, el 010, el 013, y de las cepas no tipificables (NT).

Se estudiaron 24 cepas de P. aeruginosa, 20 fueron no tipificables (NT) tanto por anticuerpos monoclonales como por policlonales, por ello, las 20 cepas se atribuyeron al anticuerpo monoclonal que identificó a la cepa M, cuya reactividad es casi exclusiva a cepas poli-aglutinantes (PA) o (NT), lo cual sugiere que este anticuerpo podría estar dirigido al lipopolisacárido del núcleo de la bacteria, por lo cual se requiere un cuidado especial para cepas serotipificables como M. Se cita que los anticuerpos monoclonales usados dan resultados claros comparables con los anticuerpos anti-conejo pero no aumentan el porcentaje de tipificación de cepas.

Figueroa y col (21) prepararon un grupo de anticuerpos monoclonales murinos con especificidad hacia la fase levaduriforme del hongo dimórfico Paracoccidioides brasiliensis, modificando la técnica convencional de producción de anticuerpos monoclonales, al usar un fármaco inmunosupresor la -ciclofosfamida- para suprimir la respuesta inmune de los animales y así evitar la reactividad cruzada entre el hongo en estudio e Hystoplasma capsulatum.

Uno de los anticuerpos monoclonales reconoció por inmunoelectrotransferencia un epítoto antigénico lineal de P. brasiliensis de peso molecular de entre 70 y 75 Kd. Sin embargo,

aún se discute el serodiagnóstico de P. brasiliensis con sondas específicas a esta especie.

Es importante la producción de anticuerpos monoclonales específicos en el caso de P. brasiliensis, ya que comparte un antígeno con Hystoplasma capsulatum y porque además comparten las mismas zonas endémicas en Latino América.

Los anticuerpos monoclonales podrían ser apropiados para sistemas diagnósticos en los que tanto los anticuerpos monoclonales con reactividad cruzada, como los policlonales en contra de P. brasiliensis, podrían usarse como controles positivos para técnicas como la inmunodifusión, la electroforesis, etc, aunque tal vez el empleo más útil podría ser en ensayos inmunoenzimáticos para detectar antígenos circulantes.

Reiss y col (75) produjeron y usaron anticuerpos monoclonales para detectar el homopolímero manana de Candida tropicalis por ensayos inmunoenzimáticos o con inmunofluorescencia y encontraron que es posible sustituir los anticuerpos policlonales por monoclonales y con esto mejorar la especificidad tanto de ensayos inmunoenzimáticos, como de inmunofluorescencia, y así poder investigar la topografía de la superficie de C. tropicalis y deducir las diferencias moleculares de los serotipos de la bacteria logrando que estos anticuerpos actuaran como detectores de antigenemia. Los descubrimientos reportados por estos autores se consideran aún preliminares, por lo cual se necesitaría de estudios posteriores para confirmar lo anterior o para depurar las técnicas de producción de estos an-

ticuerpos monoclonales y consecuentemente de sus propiedades.

Se cita que la sensibilidad de los anticuerpos monoclonales es muy importante debido a que la cantidad de manana detectable durante la antigenemia es muy baja (ng/ml) y se degrada a manosa. Sin embargo, se detectó una cierta falta de avidéz de los anticuerpos monoclonales por el antígeno, lo que se interpretó como una falta de sensibilidad durante la antigenemia. También se evidenció que las concentraciones de antígeno, varían en función de los serotipos y están íntimamente relacionadas con la especie, lo cual se concluye en función de que los conejos infectados con C. albicans serotipo A, mostraron una concentración de antígeno mucho mayor que los conejos infectados con C. tropicalis.

La detección del antígeno del serotipo B de C. albicans durante la antigenemia por manana fue baja, lo cual, según los propios autores, indica que la detección exitosa de la manana, depende del uso de un conjugado serotipo específico.

El término tifus se usa para definir un grupo de enfermedades infecciosas agudas, graves, producidas por diversas especies del género Rickettsia, que se caracterizan por fiebre elevada, delirio, postración y erupciones cutáneas tipo petequias.

En relación con este campo, McDade y col (60) produjeron un panel de anticuerpos monoclonales y evaluaron su especificidad para identificar antígenos del género Rickettsia por

fluorescencia. De 9 anticuerpos evaluados, 2 fueron específicos para R. akari; 4 reaccionaron con R. akari y con los demás grupos de Rickettsia que producían la fiebre manchada. Los demás anticuerpos reaccionaban con algunos miembros del grupo de las rickettsias que producen la fiebre manchada; ninguno de los anticuerpos monoclonales reaccionó con las que causan el tifus de la fiebre manchada, el tifus de los matorrales o la fiebre de las trincheras, ni con las causantes de la fiebre Q.

Por lo tanto, estos anticuerpos se suman a la lista de los ya existentes para identificar Rickettsia causantes de la fiebre manchada, aún cuando éstas sean antigénicamente similares. Por otra parte, los autores destacan el hecho de que el método de cultivar las rickettsias no afecta en nada su capacidad de reaccionar frente a los anticuerpos monoclonales.

Rickettsia tsutsugamushi es agente causante de la enfermedad de tsutsugamushi y muestra una heterogeneidad antigénica, que es de gran importancia en el serodiagnóstico y en el desarrollo de una vacuna contra esta enfermedad.

Chang W. y col (14) encontraron diferentes tipos antigénicos a partir de 113 cepas de R. tsutsugamushi aisladas de pacientes coreanos, mismas que se analizaron utilizando anticuerpos monoclonales y policlonales murinos.

Se produjeron varios anticuerpos monoclonales que reaccionaron con cepas prototipo y con una de las cepas aisladas.

Las cepas prototipo de R. tsutsugamushi -Gilliam

(ATCC VR-312), Karp (ATCC VR-150) y Kato (cepa Nigatta)- se propagaron en cultivo en monocapa de células L en un medio esencial.

Los aislamientos pueden clasificarse en seis grupos de acuerdo a su reacción con un grupo de anticuerpos monoclonales. Nueve aislamientos del grupo I se identificaron como serotipo Gilliam y 13 de los grupos II y III, se identificaron como serotipo Karp. Dos grupos se consideraron como una mezcla de grupos I y II o grupos I y III, respectivamente. Las 88 cepas restantes del grupo IV tenían un antígeno único que no estaba presente en las cepas prototipo, además de compartir antígenos comunes con las cepas prototipo.

La heterogeneidad antigénica de R. tsutsugamushi se ha probado mediante análisis con anticuerpos fluorescentes, neutralización, inmunización cruzada, o neutralización de toxina; sin embargo, estos métodos presentan muchas dificultades debido a que existe un alto grado de reacción cruzada entre las cepas.

También se trató de identificar el serotipo de los aislamientos de R. tsutsugamushi mediante una prueba de anticuerpo fluorescente, utilizando ratones infectados con 3 cepas prototipo. Sin embargo, no fue posible determinarlo en varios aislamientos, debido a la reacción serológica cruzada, por lo cual se utilizaron anticuerpos monoclonales para la clasificación serológica.

En este estudio se encontraron tres casos de infec-



ción con cepas reactivas múltiples, en los cuales la clasificación antigénica con anticuerpos monoclonales o policlonales puede causar grandes errores; tales hallazgos son muy comunes entre los aislamientos de Pakistán, de Filipinas y de Tailandia, pero no comunes en los japoneses.

La distribución de los serotipos que frecuentemente se aíslan del norte de Corea, es diferente de la del centro y sur, por lo tanto, se sugiere utilizar cepas locales de R. tsutsugamushi para propósitos de diagnóstico y profilácticos, y que deben ser de características epidemiológicas diferentes, de acuerdo a la localización geográfica.

Vitale y col (110) produjeron 22 hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-Rickettsia conorii. Al examinar por inmunofluorescencia indirecta 46.6 sobrenadantes de los 22 hibridomas, resultaron ser del tipo M. Solo 5 sobrenadantes fueron positivos para todas las cepas examinadas, aunque produjeron diferentes títulos con las distintas cepas, tal vez, sugieren los autores, porque se reconoce un antígeno común a las rickettsias causantes de la fiebre manchada. Se determinaron epítopes inmunodominantes usando un examen de inhibición de la unión de la cepa MAVI, se encontró que un número importante de muestras de suero de pacientes con fiebre botonosa, producían anticuerpos que reconocían a los mismos epítopes que reconocieron los anticuerpos monoclonales de ratón, aunque se examinaron un número de muestras relativamente bajo. Se encontró una heterogeneidad sorprendente tanto en la expresión de

epítopes que reconocen al ratón en las cinco cepas de Rickettsia, como en la respuesta de anticuerpos a estos epítopes en el suero de pacientes con fiebre botonosa. También se cita que las conclusiones en este estudio pudieron verse afectadas dada la alta frecuencia de la inmunoglobulina M. Sin embargo, se cree que este estudio proporcionará bases epidemiológicas para estudiar las posibilidades de los anticuerpos monoclonales como herramientas potenciales para el diagnóstico y el desarrollo de una vacuna contra Rickettsia conorii, causante de la fiebre manchada.

En 1988 Uchida y col (100) identificaron un nuevo grupo de Rickettsia patógena para el hombre en Japón y compararon este nuevo grupo con los ya conocidos: R. rickettsii, que produce la fiebre manchada de las Montañas Rocosas; R. conorii, que produce la fiebre botonosa; R. siberica, que produce el tifus del norte de Asia; R. australis, que produce el tifus de Queensland y R. akari, que produce la fiebre de los matorrales. Estas especies se presentan en diferentes lugares geográficos separados por fronteras naturales.

La identificación del nuevo microorganismo se confirmó mediante sueros policlonales y monoclonales y se propuso el nombre de Rickettsia japonica sp. nov.

En 1990, Uchiyama y col (101) describen un estudio con 192 hibridomas productores de anticuerpos monoclonales dirigidos a epítopes de las proteínas de superficie de la cepa yH de R. japónica que reaccionaron con todas las cepas japone-

sas examinadas, pero no así con las cepas conocidas de otros patógenos, apoyando la conclusión de que R. japónica es una nueva especie de Rickettsia del grupo de la fiebre manchada.

Los anticuerpos monoclonales específicos para la especie indican que todas las cepas pertenecen a una sola especie. Los epítopes específicos que reaccionan con estos anticuerpos monoclonales se localizan en las proteínas de la superficie del microorganismo, evidenciando dos bandas por inmunoelectrotransferencia, una de 145 y otra de 120 Kd . Estas resultaron ser de naturaleza proteica, ya que al someterlas a tratamiento enzimático con proteínasa K, se inhibió totalmente su reactividad con anticuerpos monoclonales.

Por otro lado, se reporta que hasta la fecha de publicación del reporte (101), no se habían detectado casos de enfermedad por R. japónica fuera de Japón, y que el vector del microorganismo recientemente descubierto aún no se ha evidenciado.

En relación con el género Nocardia, se investigaron (48) N. asteroides y N. brasiliensis. Se usaron extractos de células completas usados como antígenos para generar anticuerpos monoclonales, mismos que mostraron diferentes grados de reacción con dichas nocardias así como con antígenos de filtrados de cultivo de Mycobacterium sp que tiene cierto potencial para usarlos como reactivos en la purificación de antígenos de Nocardia.

## CAPITULO IV

### DISCUSION

A través de numerosas investigaciones, se han utilizado y tratado de hacer más y más eficientes las técnicas de identificación de los agentes patógenos.

Así surgieron y se han empleado las técnicas conocidas como inmunológicas, en cuya forma más sencilla, un antígeno da lugar a un anticuerpo, con el cual puede interaccionar posteriormente.

Cabe señalar que desde el descubrimiento del primer fenómeno inmunológico, las técnicas basadas en éste se han usado con fines diagnósticos y han evolucionado.

Por otro lado, aún se conserva el objetivo original, el de depurar las técnicas en busca de sensibilidad, especificidad, rapidez, confiabilidad, bajo costo y un mínimo de reacciones cruzadas, por ello, la técnica de los anticuerpos monoclonales es relevante.

Desde que surgieron los anticuerpos monoclonales se estudió su capacidad para usarlos como una herramienta para diagnosticar diferentes enfermedades infecciosas identificando el agente causal de éstas; a la fecha, los anticuerpos monoclonales también se han utilizado exitosamente en el tratamiento de diferentes enfermedades.

Los anticuerpos monoclonales son muy sensibles y específicos, le confieren mucha rapidez a las técnicas en las que se emplean. Sin embargo, el montar la técnica para producirlos

implica varias dificultades, lo que no los hace accesibles en forma rutinaria.

El procedimiento que originalmente propusieron Kohler y Milstein consistía en obtener células de bazo de un ratón inmunizado con eritrocitos de carnero y fusionar estas células con las de un mieloma en un medio con polietilenglicol, clonar y obtener los anticuerpos monoclonales.

Al procedimiento original se le han hecho ciertas modificaciones en función de las necesidades del laboratorio interesado en producir los anticuerpos monoclonales, dependiendo del antígeno, es decir, de su capacidad para inducir una respuesta inmune, de las concentraciones en que esté disponible, etc.

Asimismo, se han inmunizado diferentes animales para estudiar sus respuestas, encontrándose que los mejores sistemas son los de rata o ratón por ser más fáciles de manejar, porque ocupan menos espacio, porque sus necesidades nutricionales son más fáciles de cubrir, etc.

De igual manera, se ha estudiado la necesidad de obtener antígenos puros para inmunizar a los animales y obtener una respuesta mayor sin distraer al sistema inmunitario del individuo con las contaminaciones. Sin embargo, por otra parte se encontró que la pureza del antígeno no es relevante para los efectos de estos estudios.

También se estudió la posibilidad de inducir eventos oncológicos al administrar anticuerpos monoclonales a un paciente, observándose que dicha posibilidad es muy remota.

En vista de los comentarios anteriores resulta evidente que los anticuerpos monoclonales se han estudiado muy ampliamente, aunque su descubrimiento sea tan reciente y su potencial aún esté en desarrollo.

Milstein estudió los anticuerpos monoclonales como herramienta de diagnóstico, sus características, los procedimientos para su obtención y las características que heredan de sus células progenitoras:

Un anticuerpo monoclonal es aquél que se obtiene de las inmunoglobulinas del bazo de un animal sensibilizado a un determinado antígeno y que pueden immortalizarse al fusionarlas con células de mieloma, considerando que éste produce un solo tipo de anticuerpos, el anticuerpo puede segregarse en clonas, es decir en líneas celulares seleccionadas y obtener el anticuerpo en cantidades ilimitadas y por tanto tiempo como se mantenga estable el hibridoma.

Al fusionar las células específicas de ratón con células de mieloma en polietilenglicol, éstas, que son deficientes en la enzima hipoxantina, guanina fosfo-ribosil transferasa (HGPRT), aportan la capacidad de crecimiento ininterrumpido y las células esplénicas inmunizadas, la capacidad de producir una inmunoglobulina específica. Las células que no se fusionan se eliminan, ya que carecen de la enzima HGPRT y no pueden usar la aminopterina por la vía de utilización de purinas exógenas, al sembrarse en el medio HAT y por tanto desaparecen en cultivo ininterrumpido.

Una observación digna de tomarse en cuenta es, que los monoclonales híbridos expresan las cadenas de inmunoglobulinas de ambas células originales, lo cual involucra rearrreglo de cromosomas y mutación de clonas que dejan de expresar una de las cadenas. Este no es un evento al azar, los anticuerpos monoclonales pueden perder especificidad y sensibilidad al perder cadenas y ésta es la razón de que varios autores los usen en paralelo con otras técnicas confirmativas.

Por otro lado, no existe duda de que la presencia de una capa alimentadora de células incrementa la capacidad de las células en cultivo para desarrollarse (a densidades muy bajas). El uso de estas capas alimentadoras es esencial para aislar clonas híbridas muy sensibles, que de otra forma serían muy difíciles de cultivar, esto incrementa el rendimiento de híbridos viables luego de la fusión y es muy recomendable tomarlo en cuenta durante este procedimiento. Aunque hay que tener cuidado con el uso indiscriminado de estas capas, ya que el simple hecho de usarlos introduce una nueva variable que puede representar nuevas complicaciones a menudo innecesarias.

El Sistema Nervioso es de cuidado especial debido a lo sensible de éste y porque los daños causados en él son irreversibles; el Digestivo es de relevancia porque las enfermedades e infecciones de éste generalmente se manifiestan por diarreas que deshidratan rápidamente al paciente y lo pueden llevar a la muerte especialmente en el caso de neonatos y en-

fermos inmunocomprometidos. De igual manera, en el Sistema Respiratorio las enfermedades pueden inclusive disiparse a otros sistemas. De las enfermedades Sistémicas es obvia su importancia pues se caracterizan por infectar varios sistemas causando complicaciones enormes y dificultades para controlar al paciente lo cual puede causar daños irreparables o incluso la muerte del paciente.

En relación con el Sistema Genito-Urinario debemos recordar que las enfermedades sexualmente transmitidas han aumentado alarmantemente hasta niveles inaceptables, fundamentalmente por las cepas resistentes a los antibióticos, aunque otros problemas de índole social han contribuido a este aumento en la frecuencia de infección, éstos son, por ejemplo: la bigamia, la homosexualidad y la prostitución. En vista de lo anteriormente citado, es necesario readoptar una postura concientizadora de masas y, por otro lado, insistir en el tratamiento adecuado de las enfermedades sexualmente transmisibles.

Todo manejo adecuado de cualquier enfermedad, empieza por un buen diagnóstico de la misma, una correcta identificación del microorganismo patógeno y, por último, con la pronta administración de la terapia más adecuada, por eso es necesario contar con métodos rápidos y confiables de diagnóstico, como aquellos en los que se usan anticuerpos monoclonales, como herramienta diagnóstica.

Como se mencionó en el capítulo correspondiente, numerosas investigaciones sobre los diferentes sistemas y trac-



tos del cuerpo humano se han enfocado a estudiar, mediante anticuerpos monoclonales, una amplia variedad de microorganismos, tales como bacterias, hongos, levaduras, virus y parásitos. Algunos aerobios estrictos, otros anaerobios estrictos, un buen número de facultativos, otros más oportunistas, algunos mesófilos, varios más termófilos, pero todos mediante el empleo de los anticuerpos monoclonales.

Las investigaciones indican que los anticuerpos monoclonales son capaces de aplicarse en diferentes ensayos, pruebas y equipos entre los que se incluyen; inmunofluorescencia directa e indirecta, coagulación, radioinmunoensayo, ensayos inmunoenzimáticos, inmunoelectrotransferencia, microscopía electrónica, pruebas de aglutinación, de precipitación, neutralización (toxinas), etc.

Las técnicas en que se usan los anticuerpos monoclonales se han comparado con técnicas de referencia, encontrándose que en algunos casos, inclusive las superan en resultados y en economía, tal es el caso de la microscopía electrónica, los ensayos de hibridización de ácidos nucleicos y las técnicas de tinción que involucran marcas radioactivas, que al compararlos con ensayos inmunofluorescentes, inmunoenzimáticos, etc. en los que se usan anticuerpos monoclonales, se imponían estas técnicas.

Los resultados fueron muy satisfactorios en la mayoría de los casos estudiados, como se mencionó con anterioridad, en términos de: sensibilidad, especificidad, rapidez y facili-

dad de manejo de las técnicas, ya que no es necesario personal altamente entrenado ni equipos en extremo costosos. Por todo lo anterior, los anticuerpos monoclonales hacen más confiables las técnicas en que se usan, demostrando así su versatilidad.

Sin embargo, también se encontraron inconvenientes en su uso, que evidencian discrepancias en las opiniones de diversos autores, por ejemplo:

- En torno a la polémica de sustituir los anticuerpos policlonales por anticuerpos monoclonales en todos los campos al parecer por las investigaciones de la gran mayoría de los autores consultados, los resultados demuestran que dicha sustitución está plenamente justificada, a pesar de que algunos trabajos demuestran que los primeros produjeron resultados sobresalientes superando a los anticuerpos monoclonales y sorprendiendo incluso a los mismos autores, aunque usaron solamente un equipo en particular.

- No se ha decidido si el antígeno con el que se generan los anticuerpos monoclonales debe o no estar puro, pues los resultados a este respecto son inconsistentes y ni siquiera se habla del grado de pureza, sino de purificar o no.

- Los anticuerpos monoclonales se pueden usar para examinar muestras directas o cultivos, sin embargo, el muestreo, transporte y aislamiento de ciertos microorganismos es a veces contraproducente, ya que no se logra la identificación categórica de un determinado agente patógeno, aunque éste se encuentre en la muestra.

Desde tiempos inmemorables, el muestreo ha sido tal vez la mayor preocupación de los estudiosos de la Microbiología. Sus implicaciones son tantas y tan importantes, que aún para emplear técnicas tan sensibles como las de los anticuerpos monoclonales se debe tomar en cuenta como uno de los parámetros cruciales de los que depende el éxito de la prueba.

Así pues, son dignos de estudiarse: el tipo de muestra óptimo, el sitio más adecuado para muestrear, la cantidad de muestra necesaria (en términos de volumen, para concentrar la muestra o la cantidad de microorganismos viables), la conveniencia de usar segundos o hasta terceros muestreos (en el caso de hisopos), la zona geográfica de donde proviene el paciente cuya muestra se estudia, la conservación de la muestra durante el transporte, el medio de transporte óptimo para cada microorganismo y la administración de terapias antimicrobianas previas al muestreo.

Respecto a los medios de cultivos óptimos (ya sea para bacterias o, en el caso de los virus, el cultivo de células) se prefieren usar los anticuerpos monoclonales directamente siempre que sea posible, ya que al cultivar un microorganismo éste tiende a variar no sólo genéticamente sino que las implicaciones van hasta variaciones antigénicas causadas por las variaciones genómicas.

También se descubrió que la conservación de la muestra, invariablemente la deteriora en mayor o menor medida, ocasionando la pérdida de antígenos y consecuentemente un de-

terioro en la capacidad antigénica del microorganismo en estudio, así como cambios conformacionales importantes o inclusive la pérdida de su viabilidad, lo cual provoca una disminución en el número de éstos en la muestra y conlleva a la necesidad de técnicas en extremo sensibles.

De igual manera, se ha observado que el uso de algunos medios de cultivo presentan toxicidad hacia las células cultivadas, lo que les provoca mutaciones y cambios indeseables, dificultando su identificación por los efectos de variación del pH, presencia de enzimas, tiempo involucrado desde la recolección de la muestra hasta su procesamiento, etc.

Empero, con tantos reveses se ha sorteado la problemática involucrada por las variables anteriormente citadas, de diferentes formas, por ejemplo:

Se observó que en algunos casos las especificaciones de los fabricantes de reactivos en que se involucran anticuerpos monoclonales eran demasiado conservadoras, razón por la cual se ajustaron los criterios de positividad de las reacciones, disminuyendo el número de hallazgos en pruebas de microscopía sin sacrificar especificidad.

Se realizó el cambio del diluyente que incluía el fabricante.

Las determinaciones se hicieron espectrofotométricas en los casos en que era posible, incluyendo técnicas de procesamiento de muestras que no involucran el uso de tensoactivos, pero sí de enzimas. Se concentraron las muestras por centrifu-

gación, se empleó el calor o agentes químicos para exponer los epítopes que podrían estar ocultos o bloqueados formando complejos inmunes, inaccesibles a los anticuerpos monoclonales.

En los casos en que no se tuvo un epítope al cual dirigir los anticuerpos monoclonales se decidió trabajar con células completas, en casos como el de Salmonella typhi y otros, se confirmó que los anticuerpos monoclonales son ciertamente reconocidos por la superficie de la célula del microorganismo en cuestión; sin embargo, resulta que se reconoce a más de un determinante antigénico de ésta, en virtud de que las células estudiadas tienen una membrana externa particularmente compleja y presentan una enorme gama de determinantes antigénicos.

Por otro lado, hay que recordar que si las células no están completas y viables, se pierde especificidad y sensibilidad, o tienen que estar presentes en una proporción mayor, por otro lado, no es posible asegurar cuál fue la estructura de la célula que realmente se identificó, es decir, qué parte de la célula reaccionó, ya que podrían ser epítopes de antígenos capsulares, flagelares o somáticos, o bien una combinación de éstos.

Al trabajar con células completas se tiene otro inconveniente, este es, que si las células no están completas y viables se pierde especificidad por lo que se necesita un método de muestreo que garantice la presencia de un número de microorganismos suficiente para obtener buenos resultados, como

por ejemplo, en los aspirados; pero, si por otro lado se toman en cuenta las reacciones cruzadas que son otro inconveniente tan grande como el muestreo, al emplearse anticuerpos monoclonales, que identifican un determinado antígeno de una bacteria, puede resultar que ese antígeno lo comparten otros microorganismos y que ninguno realmente es el responsable, este inconveniente redundaría en la administración de una terapia inútil, que en ocasiones para lo único que sirve es para alterar la flora normal del paciente favoreciéndose las infecciones por oportunistas y por flora patógena. El problema es que se ha descubierto que mientras más compleja es una estructura, es más frecuente encontrar reacciones cruzadas, por eso es lógico pensar que estructuras más simples como virus o micoplasmas, deberían presentar menos reacciones cruzadas pero no es así, puesto que al ser parásitos intracelulares obligados, se multiplican dentro de las células y sólo se liberan al estallar éstas pudiéndose entonces detectarlos; lo peor del caso es que los virus también evolucionan, se enmascaran o liberan antígenos solubles y muestran variaciones antigénicas o genéticas que dificultan su detección confiable y oportuna.

En relación con el pili de Neisseria gonorrhoeae se generaron anticuerpos monoclonales dirigidos a las proteínas PIA y PIB encontrando que la primera es la de elección para identificar dicha bacteria.

Acerca del mismo microorganismo, también se han estudiado los fragmentos de las proteínas PIB producidos luego de

ataques enzimáticos para encontrar un supuesto epítoto conservado, a efecto de conocerlo y evaluarlo como un blanco potencial para preparar una vacuna, encontrando resultados alentadores, ya que se vió un grupo de epítotos que se conservan reconocibles. De hecho uno de los anticuerpos monoclonales obtenido es efectivo en tres niveles: produciendo inmunidad en las mucosas, generando defensas bactericidas mediadas por complemento (C') e induciendo fagocitosis activada por el mismo anticuerpo.

Por lo anterior se deduce que el antígeno peptídico de la proteína IB es un buen candidato para preparar una vacuna multicomponente en la que necesariamente se debería incluir un componente común a la proteína IA, por lo mismo aún se requieren de ulteriores investigaciones.

Mientras tanto, este anticuerpo monoclonal se ha usado para identificar las diferentes cepas de gonococos produciendo resultados contundentemente alentadores y un mínimo de reacciones cruzadas.

Al disminuir el número de reacciones cruzadas se ha sumado importancia al punto de la evolución de las especies, es decir, que todas las cepas estudiadas cambian su estructura antigénica y sus propiedades al someterlas a condiciones nuevas.

Así mismo, se ha desarrollado un equipo, el Syva Microtrack, en el que se usan anticuerpos monoclonales fluorescentes, con los que no se presentan las reacciones cruzadas; de

cualquier forma se recomienda usar una batería de pruebas más amplia y así evitar al máximo las reacciones cruzadas.

De igual manera se han desarrollado otros equipos como el PBGOT que involucra el uso de una mezcla de anticuerpos monoclonales, dichas técnicas se han mejorado con una disminución de los costos facilitando la interpretación de las pruebas.

En relación a la técnica de coagulación podemos decir que los resultados así obtenidos son categóricos, confiables y no requieren microscopio de fluorescencia, ni de otros equipos costosos, personal altamente capacitado, o cuartos estériles, etc., por lo cual es una técnica recomendable.

Por otro lado, se ha discutido que no existe método ni prueba con confiabilidad que se base en sensibilidad y especificidad al 100%, puesto que, entre otras razones, cada examen que se diseña se ha evaluado y comparado con otros, cuya confiabilidad no es al 100%, por eso al enfrentarla a muestras "difíciles", las técnicas fallan. Las variaciones en la distribución de las serovariedades de diferentes regiones geográficas, exigen seguir evaluando la configuración antigénica de las cepas de gonococos infectantes para mantener la sensibilidad de las pruebas y para depurar o seleccionar los métodos y equipos usados hasta optimizarlos.

En relación a Chlamydia trachomatis -que es un parásito intracelular- cada vez se identifica con mayor frecuencia en pacientes con infecciones genito-urinarias y oculares.



Al comparar la técnica de inmunofluorescencia con los anticuerpos monoclonales para identificar a C. trachomatis con las técnicas de tinción con Giemsa y con yodo, las primeras se eligieron sobre las segundas, ya que al tomar en cuenta el número de inclusiones en cada muestra, se separan las poblaciones de los pacientes, resultando más difícil identificar las poblaciones con cuentas bajas. También se suscito polémica con otras pruebas que involucran anticuerpos monoclonales en relación a cuál antígeno dirigirlos, considerando que muy difícilmente se diagnosticaría C. psittaci cuando se tratara de C. trachomatis o el antígeno proteico de la membrana externa mayor de C. trachomatis; aunque con el primero se obsevaron mejores resultados.

Sin embargo, en la lectura de los frotis de anticuerpos monoclonales, algunos investigadores encontraron errores debidos a la reactividad cruzada y a la unión de la fracción Fc de los anticuerpos monoclonales conjugados con la proteína A de estafilococo dorado, por lo cual se incluyeron ciertas modificaciones en la técnica de inmunofluorescencia indirecta y en la de coagulación, incluyéndose el uso de colorantes de contraste para teñir el fondo y evitar los errores de apreciación debidos al fondo brillante de la muestra, tratamiento de muestras con enzimas, etc.

Se han usado ampliamente métodos inmunoenzimáticos para demostrar a microorganismos como Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli y Shigella sp por medio de anticuerpos mono-

clonales dirigidos a la fosfatasa alcalina, que aparece casi inmediatamente en el cultivo y se conserva en la muestra, como se puede detectar directamente, se adelanta aproximadamente 24h a los resultados obtenidos por otros métodos y puede automatizarse a un costo relativamente bajo.

Sin embargo, en relación a Pseudomonas aeruginosa se produjeron reacciones cruzadas con otras especies del género en virtud de la homología de su ARN. No obstante, algunos autores consideran de poca importancia estas reacciones cruzadas dado que otras bacterias del género que cruzan con P. aeruginosa son sensibles a los mismos antibióticos y como este microorganismo se puede identificar por sus características macroscópicas, microscópicas, bioquímicas y serológicas, con alta confiabilidad como hasta la fecha se ha realizado, se considera irrelevante discriminar entre una y otra especie usando una técnica rápida, específica, sensible, costosa y difícil de montar como los anticuerpos monoclonales, además de que los utilizados no fueron lo suficientemente específicos para detectar al microorganismo en cuestión encontrándose algunos de otra u otras especies o hasta géneros que podrían cruzar e interferir con el diagnóstico de esta bacteria oportunista que tan importante es en infecciones sistémicas, en pacientes quemados e inmunocomprometidos. Se podría pensar que lo anterior se debió a que las bacterias examinadas se habían sometido a condiciones tales que cambiaron sus características estructurales y antigénicas, que es otra de las razones con las que se justifican las reac-

ciones cruzadas.

Los resultados obtenidos con anticuerpos monoclonales son de cualquier forma más confiables que los obtenidos con los policlonales y más rápidos, razón por la cual se recomienda sustituir unos por otros.

Resultados similares se encontraron al examinar muestras en busca del homopolímero de C. tropicalis por ensayos inmunoenzimáticos y de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales comparándolos con policlonales. Tomando en cuenta que los primeros son muy sensibles, los resultados obtenidos son confiables a diferencia de otras técnicas.

En relación a Vibrio cholerae, se ha dividido en función de su antígeno "O" en varios sub-grupos, y en tres serotipos. Entre los hallazgos más importantes de estas investigaciones debe citarse que con los anticuerpos monoclonales producidos se propone una solución a las reacciones cruzadas entre V. cholerae, Brucella abortus y Yersinia enterocolitica cuyo antígeno "O" es muy similar.

Esta investigación se considera muy importante dado que permite demostrar que con una selección de anticuerpos monoclonales es posible evitar las reacciones cruzadas, elevar su confiabilidad y, por supuesto, detectar al microorganismo sospechoso.

De igual manera se han estudiado parásitos como Giardia muris encontrando un antígeno específico del género. Este parásito se estudió por medio de inmunoensayo usando anti-

cuerpos monoclonales, los resultados obtenidos fueron satisfactorios dado que se identificó al antígeno del género sin reacciones indeseables con antígenos específicos de otros géneros de protozoarios intestinales comunes. El anticuerpo monoclonal usado permite su unión a tubos de plástico, látex u otros soportes, el tiempo para identificar al parásito se puede reducir a un intervalo de entre 10 y 30 minutos por muestra. Estas características son muy importantes si se compara a los anticuerpos monoclonales con los resultados obtenidos actualmente por microscopía.

Observaciones similares se encontraron al examinar heces con un anticuerpo monoclonal para la identificación de Cryptosporidium parvum, agente causal de diarrea en humanos inmunocomprometidos. Se encontró que los tipos de tinción con los que se comparó al anticuerpo monoclonal (tinción con fluoresceína, biotina, auramina-rodamina, diamino-bencidina, etc.) sí producían diferencias en términos de sensibilidad, lo cual significa que estas técnicas no son inocuas prefiriéndose por ello la de inmunofluorescencia indirecta.

Esta situación también se observó al estudiar antígenos de Naegleria fowleri por métodos enzimáticos, por lo cual se prefirió el método de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales.

En relación a la detección de agentes etiológicos a nivel de Sistema Nervioso, se estudió su capacidad para detectar a los Citomegalovirus usando anticuerpos monoclonales

fluorescentes directos, anticuerpos monoclonales fluorescentes indirectos y otros; asimismo se compararon varios métodos diagnósticos.

Los hallazgos son relevantes en función de las altas especificidad y sensibilidad demostradas, lo cual, era de esperarse ya que estas características son inherentes a los anticuerpos monoclonales.

También se comparó el uso de equipos de hibridización de ADN in situ, con el cultivo del virus y técnicas con monoclonales. La primera técnica resultó ser superior al cultivo pero también es cierto que requiere de personal técnico experto y de reactivos costosos, mientras que las técnicas tradicionales de cultivo no presentan este último problema.

Otra característica muy útil e importante de los anticuerpos monoclonales fue la rapidez, se cita que las técnicas que involucran su uso identificaron a Citomegalovirus 42 horas antes que el tiempo necesario para su identificación por la técnica de hibridización y por el cultivo de células que involucra días.

Así mismo, debemos citar que se prefiere el anticuerpo monoclonal fluorescente indirecto sobre el directo por su rapidez y confiabilidad, aunque se recomienda usar dicho anticuerpo en paralelo con el cultivo de tejidos para muestras especialmente difíciles.

En otros estudios sobre el efecto pre-citopático se encontraron resultados muy similares, pues se detectó un alto

porcentaje de cepas del virus en cuestión entre 16 y 24 horas con el anticuerpo monoclonal y entre 40 a 48 horas con el cultivo del virus en células en monocapa.

Todo esto confirma que la prueba de anticuerpos monoclonales fluorescentes indirectos está a la cabeza de la lista de pruebas diagnósticas de elección en enfermedades del Sistema Nervioso.

Se puede complicar la identificación del virus al dirigir los anticuerpos monoclonales preferentemente indirectos, a algún antígeno que aparezca inmediatamente luego de la infección, así se desarrolló otro método, llamado de cuantificación rápida de Citomegalovirus en el que los anticuerpos monoclonales, se dirigieron a una proteína que aparece casi inmediatamente después de la infección. Se recomienda continuar estos estudios hasta optimizar la técnica.

Otro estudio corrobora el hecho de que los anticuerpos monoclonales son muy versátiles, en relación a la familia Picornaviridae se estudió al virus de la encefalomiocarditis por medio de un ensayo inmunoenzimático para detectar anticuerpos neutralizantes después de 8 horas de infección, se encontró un aumento rápido en la absorbancia en células infectadas. Es evidente que por esta metodología se puede diagnosticar otros Picornavirus como el poliovirus, titulando el interferón.

Por otro lado, los esfuerzos por demostrar y describir un nuevo subgrupo de rotavirus son notables. Sin embargo fueron infructuosos en virtud de que no se logró el objetivo.

No obstante, es muy importante citar que al parecer lo que se predijo como una nueva clase o subgrupo de rotavirus en realidad correspondía a una infección mixta, lo cual se detectó por medio de técnicas de hibridización de ácidos nucleicos que incluyen anticuerpos monoclonales, esta técnica al compararse con electroferesis en gel de poliacrilamida se caracterizó por sus mejores resultados particularmente en casos en que el número de virus en la muestra es bajo y en aquellos en que muchos no están viables, lo cual habla de la muy alta sensibilidad de esta metodología.

En relación a las reacciones cruzadas y demás inconvenientes, se han tratado de evitar de diferentes formas:

1. Se estudiaron, usaron y seleccionaron anticuerpos monoclonales empleándose con muestras directas.

2. Se usaron muestras de anticuerpos monoclonales cuidadosamente dirigidas hacia diferentes antígenos de una cepa de un microorganismo en particular, tomando en cuenta antígenos específicos de género y de especie.

3. Se depuraron las técnicas y aún se sigue con esta tarea, usando ensayos basados en Biología Molecular para diferenciar un ácido nucléico de otro, hasta establecer las regiones específicas del patógeno para encontrar, si la hay, una región que se puede aislar y hacia ella dirigir anticuerpos monoclonales con los que luego reaccione.

4. Se continúan aún los estudios para encontrar antígenos óptimos y la técnica ideal para cada microorganismo.

5. Se trabaja con células completas.

6. Se usan los anticuerpos monoclonales para estudiar la topografía de las células, y así evidenciar la existencia y periodicidad de ciertos determinantes antigénicos y la localización de estos en la célula. La importancia de esos estudios radica en el conocimiento del papel de cada estructura en la patogenicidad del microorganismo en estudio y sus características antigénicas, para conocer la dinámica de la reacción antígeno-anticuerpo. Los hallazgos en este campo demuestran que todavía se está lejos de entender la estructura íntima de los microorganismos pero se siguen haciendo esfuerzos a este respecto.

También es importante y se continúa avanzando en el estudio de la Biología Molecular de cada microorganismo, pues si se logran conocer las diferencias del material genético entre un microorganismo patógeno y otro no patógeno, se podrá neutralizar su virulencia o por lo menos, diagnosticarlo y combatirlo en forma específica y de la mejor manera posible.



## CONCLUSIONES

1. Los anticuerpos monoclonales constituyen una herramienta diagnóstica muy útil para realizar la identificación de varios microorganismos.

2. Para usar los anticuerpos monoclonales como herramienta diagnóstica es necesario encontrar un antígeno óptimo contra el cual dirigir a los primeros.

3. En ocasiones se recomienda purificar al antígeno seleccionado para producir los anticuerpos monoclonales. Ello depende de si dicho antígeno es dominante, de su localización en la célula y de las proporciones en que se le encuentre en su forma nativa.

4. El tratamiento de las muestras con agentes químicos y físicos es, en ocasiones, recomendable para exponer los determinantes antigénicos de los microorganismos en estudio; no obstante, dicho tratamiento dependerá de la localización y la susceptibilidad de los determinantes antigénicos.

5. Las técnicas que involucran el uso de anticuerpos monoclonales deben continuar estudiándose para depurarlas y seleccionar las mejores.

6. Se pueden presentar reacciones cruzadas, las cuales se deben considerar y evitar, en la medida de lo posible.

7. Tanto la recolección de la muestra óptima, como el tiempo y las características de su procesamiento son facto-

res cruciales para obtener resultados confiables.

8. La administración previa de antibióticos al paciente no interfiere en la sensibilidad de los anticuerpos monoclonales.

9. Los anticuerpos monoclonales son específicos y sensibles, las técnicas que los emplean son rápidas e inocuas para el analista y -hasta cierto punto- no afectan a las muestras. Por ello, se recomienda la sustitución de los anticuerpos policlonales por monoclonales.

10. De entre todas las técnicas estudiadas, la de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales es la mas confiable; sin embargo, existen otras de diferente naturaleza -como la de coagulación y el ensayo inmunoenzimático- las cuales se prefieren por su sencillez, rapidez y bajo costo y porque poseen una sensibilidad y especificidad comparables con la mencionada en primer término.

11. Se emplean a usar los anticuerpos monoclonales para identificar antígenos que después de su purificación se emplean como estimuladores potenciales de células T para proliferación de linfocitos en sangre periférica y para identificar antígenos con los cuales generar posibles vacunas.

BIBLIOGRAFIA

1. Ahmed M. H., K. Taniguchi, N. Kobayashi, T. Urasawa, F. Wakasugi, & M. Islam. Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay using subgroup and serotype-specific monoclonal antibodies of human rotavirus obtained from diarrheic patients in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1678-1681 (1989).
2. Anand C. M., S. Gubash & H. Shaw. Serologic confirmation of Neisseria gonorrhoeae by monoclonal antibody-based coagglutination procedures. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2283-2286 (1988).
3. Arrowood M. J. & C. R. Sterling. Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody based methods for Cryptosporidium Oocyst detection. *J. Clin. Microbiol.* 27:1490-1495 (1989).
4. Barbour A. G., S.L. Tessier & W. J. Todd. Lyme disease spirochetes and ixodid tick spirochetes share a common surface antigenic determinant defined by a monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.* 41: 795-804 (1983).
5. Barret J. T.  
INMUNOQUIMICA E INMUNOBIOLOGIA.  
Editorial Interamericana.  
4a. ed. p. 3-27 y 101-125.  
México (1985).
6. Benson R. F., W. L. Thacker, H. W. Wilkinson, R.J. Fallon & D. J. Brenner. Legionella pneumophila serogroup 14 isolated from patients with fatal pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 26: 382-384 (1988).
7. Berkow R. & J. H. Talbott.

Merck & Co. Inc.

6a ed.

Rahway N. J. EUA (1978).

8. Brindle R. J., T. Bryant & P. W. Draper. Taxonomic investigation of Legionella pneumophila using monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol. 27: 536-539 (1989).

9. Brinton C. C., J. Bryan, J. A. Dillon, N. Guerina, L. J. Jacobson, A. Labik, Lee & S., Levine, A. The development of a Neisseria pilus vaccine for gonorrhoeae and meningococcal meningitidis. In seminars in infectious disease. J. Clin. Microbiol. 4: 140-159 (1982).

10. Burns J. W., Siao-Kun Wan Welch, S. Nakata & M K. Estes. Characterization of monoclonal antibodies to human group B Rotavirus and their use in an antigen detection Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. J. Clin. Microbiol. 27: 245-250 (1989).

11. Bussereau F., J. Vincent, D. Coudrier & P. Sureau. Monoclonal antibodies to Mokola virus for identification of rabies and rabies-related viruses. J. Clin. Microbiol. 26: 2489-2494 (1988).

12. Carlin Nils I., M. Rahman, D. A. Sack, A. Zaman, B. Kay & A. Lindberg. Use of monoclonal antibodies to type Shigella flexneri in Bangladesh. J. Clin. Microbiol. 27: 1163-1166 (1989).

13. Carlson B., M. B. Calnan, R. E. Goodman & H. George. Phadebact monoclonal GC OMNI test for confirmation of Neisseria gonorrhoeae. J. Clin. Microbiol. 25: 1982-1984 (1987).

14. Chang W., J. S. Kang, W. K. Lee, M. S. Choi & J. H. Lee. Serological classification by monoclonal antibodies of Rickettsia tsutsugamushi isolated in Korea. J. Clin. Microbiol. 28: 685-688

(1990).

15. Chou S. & K. M. Scott. Rapid quantitation of Cytomegalovirus and assay of neutralizing antibody by using monoclonal antibody to the major immediate-early viral protein. *J. Clin. Microbiol.* 26: 504-507 (1988).

16. Darougar, S., R. M. Woodland, T. Forsey, S. Cutbitt, J. Allarni & B. R. Jones. Isolation of chlamydia from ocular infections. *J. Clin. Microbiol.* 295-298 (1977).

17. Dillon J. R., M. Carballo & M. Puzé. Evaluation of eight methods for identification of pathogenic Neisseria species: Neisseria-kwik, RIM-N, gonobio-test, minitek, gonochek II, gonogen, phadebact monoclonal GC OMNI Test, and syva microtrak test. *J. Clin. Microbiol.* 26: 493-497 (1988).

18. Edwin Chitra. Quantitative determination of staphylococcal enterotoxin A by an enzyme-linked immunosorbent assay using a combination of polyclonal and monoclonal antibodies and biotin--streptavidin interaction. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1496-1501 (1989).

19. Ekpo P., S. Sarasombath, N. Banchuin & S. Sirisinha. Monoclonal antibodies to 52-kilodalton protein of Salmonella typhi. - *J. Clin. Microbiol.* 28: 1818-1821 (1990).

20. Espy M. J. & T. F. Smith. Detection of Herpes simplex virus in conventional tube cell culture and in shell vials with a DNA probe kit and monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 26: 22-24 (1988).

21. Figueroa J. I., A. J. Hamilton, M. A. Bartholomew, T. Harada, L. Fenelon & R. J. Hay. Preparation of species-specific murine monoclonal antibodies against the Yeast phase of Paracoccidioides

brasiliensis. J. Clin. Microbiol. 28: 1766-1769 (1990).

22. Finegold S. M., & W. J. Martin.

DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO.

Editorial Médica Panamericana.

Sexta edición.

Argentina (1983).

23. Fletcher J. N., K. Zak., M. Virji & J. E. Heckels. Monoclonal antibodies to gonococcal outer membrane protein I: location of a conserved epitope of protein IB. J. General Microbiol. 132: 1611-1620 (1986).

24. Fohn M. J., S. A. Lukehart & S. L. Hillier. Production and characterization of monoclonal antibodies to Mobiluncus species. J. Clin. Microbiol. 26: 2599-2603 (1988).

25. Folch Pi A., F. Colchero & H. Vela.

DICCIONARIO ENCICLOPEDICO UNIVERSITARIO DE TERMINOS MEDICOS.

Editorial Interamericana S.A. de C.V.

México, D. F. (1986).

26. Forbes B. A., N. Bartholoma, J. McMillan, M. Roefaro, L. Weiner & L. Welych. Evaluation of a monoclonal antibody test to detect Chlamydia in cervical and urethral specimens. J. Clin. Microbiol. 23: 1136-1137 (1986).

27. Francis R. A. & A. M. A. Abras. Fluorescein-conjugated monoclonal antibodies to detect Chlamydia trachomatis in smears. The Lancet. 222 (1985).

28. Freeman B. A.

TRATADO DE MICROBIOLOGIA DE BURROWS.

Editorial Interamericana.

21a. edición.

Mexico, D.F. (1984).

29. Galfre G. & C. Milstein. Preparation of monoclonal antibodies; Strategies and procedures. *Methods in enzymology*. 73: 3-47 (1981).
30. Gleaves C. A. , D. J. Wilson, A. D. Wold & T. F. Smith. Detection and serotyping of Herpes simplex in MRC-5 cells by use of centrifugation and monoclonal antibodies 16 h post-inoculation. *J. Clin. Microbiol.* 21: 29-32 (1985).
31. Gleaves C. A., E. C. Reed, R. C. Hackman & J. D. Meyers. Rapid diagnosis of invasive Cytomegalovirus infection by examination of tissue specimens in centrifugation culture. *Am. J. Clin. Pathol.* 88: 354-358 (1987).
32. Gleaves C. A., D. A. Hursh, D. H. Rice & J. D. Meyers. Detection of Cytomegalovirus from clinical specimens in centrifugation culture by in situ DNA hybridization and monoclonal antibody staining. *J. Clin. Microbiol.* 27: 21-23 (1989).
33. Goding J. W.  
MONOCLONAL ANTIBODIES: Principles and Practice.  
Academic Press Limited.  
2a. ed.  
London (1986).
34. Gombold J. L. & R. F. Ramig. Analysis of reassortment of genome segments in mice mixedly infected with Rotaviruses SAI1 y RPV. *J. Virol* 57: 110-116 (1986).
35. Gustafsson B. & P. Askelof. Monoclonal antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2077-2082 (1988).

36. Gustafsson B. & P. Askelof. Rapid detection of Bordetella pertussis by a monoclonal antibody-based colony blot assay. J. Clin. Microbiol. 27: 628-631 (1989).
37. Hammerschlag M. R., P. Roblin, M. Gelling & M. Worku. Comparison of two enzyme immunoassays to culture for the diagnosis of Chlamydial conjunctivitis and respiratory infections in infants. J. Clin. Microbiol. 28: 1725-1727 (1990).
38. Hansen E. J. & Loftus T. A. Monoclonal antibodies reactive with all strains of Haemophilus ducreyi. Infect. Immun. 44: 196-198 (1984).
39. Herrmann, J. E., D. M. Perron-Henry & N. Blacklowe. Antigen detection with monoclonal antibodies for the diagnosis of adenovirus gastroenteritis. J. Infect. Dis. 155: 1167-1170 (1987).
40. Hierholzer J. C., K. H. Johansson, L. J. Anderson, C. J. Tsou and P. E. Halonen. Comparison of monoclonal time-resolved fluoroimmunoassay with monoclonal captured-biotinylated detector in enzyme immunoassay for Adenovirus antigen detection. J. Clin. Microbiol. 25: 1662-1667 (1987).
41. Hierholzer J. C., P. G. Bingham, R. A. Coombs, K. H. Johansson L. J. Anderson & P. E. Halonen. Comparison of monoclonal antibody time-resolved fluoroimmunoassay with monoclonal antibody captured-biotinylated detector enzyme immunoassay for respiratory Syncytial virus and Parainfluenza virus antigen detection. J. Clin. Microbiol. 27: 1243-1249 (1989).
42. Homma J. Y. A new antigenic schema and live cell slide agglutination procedure for the infra-subspecific serologic classification of Pseudomonas aeruginosa. Jpn. J. Exp. Med. 46: 329-336 (1989).



43. Hugo F. M. Arvand, J. Reichwein, N. Mackman, I. B. Holland & S. Bhakdi. Identification with monoclonal antibodies of hemolysin produced by clinical isolates of Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 25: 26-30 (1987).
44. Husson M. O., C. Mielcarek, F. Gavini, C. Caron, D. Izard & H. Leclerc. Isolation and characterization of monoclonal antibodies against alkaline phosphatase of Pseudomonas aeruginosa. J. Clin. Microbiol. 27: 1115-1118 (1989).
45. Husson M. O., C. Mielcarek, D. Izard & H. Leclerc. Alkaline phosphatase capture test for the rapid identification of Escherichia coli and Shigella species based on a specific monoclonal antibody. J. Clin. Microbiol. 27: 1518-1521 (1989).
46. Ito Teruyo & T. Yokota. Monoclonal antibodies to Vibrio cholerae O1 seotype Inaba. J. Clin. Microbiol. 26: 2367-2370 (1988).
47. Jespersen D. J., W. Lawrence Drew, C. A. Gleaves, J. D. Meyers, A. L. Warford & T. F. Smith. Multisite evaluation of a monoclonal antibody reagent (Syva) for rapid diagnosis of Cytomegalovirus in the shell vial assay. J. Clin. Microbiol. 27: 1502-1505 (1989).
48. Jimenez T., A. M. Díaz and H. Zlotnika. Monoclonal antibodies to Nocardia asteroides and Nocardia brasiliensis antigens. J. Clin. Microbiol. 28: 87-91 (1990).
49. King R. C. & W. D. Stansfield.  
DICTIONARY OF GENETICS.  
Oxford University Press.  
3th. Edition.  
New York, New York (1985).

50. Kinney J. S., R. P. Viscidi, S. L. Vonderfecht, J. J. Eiden & R. H. Yolken. Monoclonal antibody assay for detection of double stranded RNA and application for detection of group A and nongroup A Rotaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 27: 6-12 (1989).
51. Krambovitis E., M. B. McIlmurray, P. A. Lock, H. Holzel, M. R. Lively & C. Moreno. Urine monoclonal antibodies for detection of antigens and culture identification of Neisseria meningitidis group B and Escherichia coli K-1. *J. Clin. Microbiol.* 5: 1641-1644 (1987).
52. Krech T., D. Gerhard-Psadni, N. Hofmann & S. M. Miller. Interference of Staphylococcus aureus in the detection of Chlamydia trachomatis by monoclonal antibodies. *The Lancet.* 1161-1162 (1985).
53. Laughon B. E., J. M. Ehret, T. T. Tanino, B. Van der Pol, H. Hunter Hansfield, R. B. Jones, F. N. Judson & E. W. Hook III. Fluorescent monoclonal antibody for confirmation of Neisseria gonorrhoeae cultures. *J. Clin. Microbiol.* 25: 2388-2390 (1989).
54. Lebar W. B. Herschman, C. Jemal & J. Pierzchala. Comparison of DNA probe, monoclonal antibody enzyme immunoassay and cell culture for the detection Chlamydia trachomatis. *J. Clin. Microbiol.* 27: 326-328 (1989).
55. Lopez-Vidal Y., P. Klemm & A. Svennerholm. Monoclonal antibodies against different epitopes on colonization factor antigen I of enterotoxin-producing Escherichia coli. *J. Clin. Microbiol.* 26: 1967-1972 (1988).
56. Lucas G., J. M. Seigneurin, J. Tamalet, S. Michelson, M. Baccard, J. F. Delagneau & P. Deletaille. Rapid diagnosis of Cytomegalovirus by indirect immunofluorescence assay with monoclonal antibody F6b in a commercially available kit. *J. Clin.*

Microbiol. 27: 367-369 (1989).

57. Mallinson H., G. C. Turner, P. B. Carey & M. H. Khan. Rapid detection of Chlamydia trachomatis with monoclonal antibodies. The Lancet. 1180-1181 (1984).

58. Matsui S. M., P. A. Offit, P.T. Vo, E. R. Mackow, D. A. Benfield, R. D. Shaw, L. Padilla & H. B. Greenberg. Passive protection against Rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to the heterotypic neutralization domain of VP7 and the VP8 fragment of VP4. J. Clin. Microbiol. 27:780-782 (1989).

59. McClintock J. T., S. R. Thacher, M. Mosher, D. Jones, M. Forman, P. Charache, K. Wright, J. Keiser & F. E. Taub. Comparison of in situ hybridization and monoclonal antibodies for early detection of Cytomegalovirus in cell culture. J. Clin. Microbiol. 27: 1554-1559 (1989).

60. McDade J. E., C. M. Black, L. F. Roumillat, M. A. Redus & C. L. Spruill. Addition of monoclonal antibodies specific for Rickettsia akari to the rickettsial diagnostic panel. J. Clin. Microbiol. 26: 2221-2223 (1988).

61. Mearns G., S. J. Richmond & C. C. Storey. Sensitive immune Dot Blot test for diagnosis of Chlamydia trachomatis infection. J. Clin. Microbiol. 26: 1810-1813 (1988).

62. Meyer T. T., & N. Mlawer. Pilus expression in Neisseria gonorrhoeae involves chromosomal rearrangement. Cell 40: 45-52 (1982).

63. Midthun K., J. Valdesuso, A. Z. Kapikian, Y. Hoshino & K. Y. Green. Identification of serotype 3 human rotavirus by enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol. 27: 2112-2114 (1989).

64. Nerurkar L. S., M. R. Miller, M. Namba, M. monzon, G. Brashears, G. Scherba & J. L. Sever. Typing of Herpes Simplex virus by capture biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay and comparison with restriction endonuclease analysis and immunofluorescence method using monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol. 25: 128-132 (1987).
65. Olds G. R., A. J. Sanson & T. M. Daniel. Characterization of Mycobacterium tuberculosis antigen 5 epitopes by using a panel of 19 monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol. 24: 471-475 (1987).
66. Pacini D. L., M. T. Brady, C. T. Budde, M. J. Connell, V. V. Hamparian & J. H. Hughes. Polyacrylamide gel electrophoresis of RNA compared with polyclonal and monoclonal antibody-based enzyme immunoassays for rotavirus. J. Clin. Microbiol. 26: 194-197 (1989).
67. Perry M. B., D. R. Bundle, M. A. Gidney & H. Lior. Identification of Escherichia coli serotype O157 strains by using a monoclonal antibody. J. Clin. Microbiol. 26: 2391-2394 (1988).
68. Peterson E. M., B. L. Hughes, S. L. Aarnes & L. M. de la Maza. Abstr. VIIth Int. Congr. Virol. R2361 181 (1987).
69. Pfaller M. A., M. Barrett, F. P. Koontz, R. P. Wenzel, M. D. Cunningham, N. Rollins & R. P. Darveau. Clinical evaluation of a direct fluorescent monoclonal antibody test for detection of Pseudomonas aeruginosa in blood cultures. J. Clin. Microbiol. 27: 558-560 (1989).
70. Pouletty P., J. J. Chomel, D. Thouvenot, F. Catalan, V. Rabillon & J. Kadouche. Detection of Herpes simplex virus in direct specimens by immunofluorescence assay using a monoclonal antibody. J. Clin. Microbiol. 25: 958-959 (1987).

71. Pouletty P., J. Martin, F. Catalan, M. Garcia, I. Morellet, S. Bettinger & J. Kadouche. Optimization of a rapid test by using fluorescein-conjugated monoclonal antibodies for detection of Chlamydia trachomatis in clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 26: 267-270 (1988).

72. Qadri A., S. K. Gupta & G. P. Talwar. Monoclonal antibodies delineate multiple epitopes on the O antigens of Salmonella typhi lipopolysaccharide. J. Clin. Microbiol. 26: 2292-2296 (1988).

73. Quinn T. C., P. Warfield, E. Kappus, M. Barbacci & M. Spence. Screening for Chlamydia trachomatis infection in an inner-city population: A comparison of diagnostics methods. J. Infect. Dis. 152: 419-423 (1985).

74. Rajasekariah G. R., S. Edward, D. Shapira, J. Tapsall, J. Walsh, J. Ho, K. Hopper & A. Pucci. Direct detection of Neisseria gonorrhoeae with monoclonal antibodies characterized by serotyping reagents. J. Clin. Microbiol. 27: 1700-1703 (1989).

75. Reiss E., L. de Repentigny, R. J. Kykendall, A. W. Carter, R. Galindo, P. Auger, S. L. Bragg & L. Kaufman. Monoclonal antibodies against Candida tropicalis mannan: Antigen detection by enzyme immunoassay and immunofluorescence. J. Clin. Microbiol. 24: 796-802 (1986).

76. Richmond, S. J., J. M. G. Bailey, A. S. Bailey & G. Mearm. Primary isolation of Chlamydia trachomatis and Chlamydia psittaci in vitro cell culture. Soc. Appl. Microbiol. Tech. Ser. 21: 297-312 (1985).

77. Ridderhof J. C., M. Vaughan, A. Tinney, F. A. Meier & H. P. Dalton. Two confirmatory test for identification of Neisseria gonorrhoeae from primary culture. J. Clin. Microbiol. 28: 619-620 (1990).

78. Robertson S., J. Keltman, J. Miller, & M. Norgard. Murine monoclonal antibodies specific for virulent Treponema pallidum (Nichols). *Infect. Immun.* 36: 1076-1085 (1982).
79. Roblin P. M., M. R. Hammerschlag, C. Cummings, T. H. Williams & M. Worku. Comparison of two rapid microscopic methods and culture for detection of Chlamydia trachomatis in ocular and nasopharyngeal specimens from infants. *J. Clin. Microbiol.* 27: 968-970 (1989).
80. Saldaña de Delgadillo S., S. Morales, López, A. Bruner Liebshard.  
MENSAJE BIOQUIMICO DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA.  
UNAM. Vol. 5 (1982).
81. Sarasombath S., G. Lertmemongkolchai & N. Banchuin. Characterization of monoclonal antibodies to protein antigen of Salmonella typhi. *J. Clin. Microbiol.* 26: 508-512.
82. Saunders J. M. & J. D. Folds. Development of monoclonal antibodies that recognize Treponema pallidum. *Infection and Immun.* 41(2): 844-847 (1983).
83. Schwartzman J. D. & E. C. Krug. Detection of microtubules of the flagellate Trichomonas vaginalis by monoclonal antibodies specific for beta-tubulin. *J. Protozool.* 33(4): 576-578 (1986).
84. Scott, A. A., K. A. Walker, L. M. Hennigar, C. H. Williams, J. P. Manos & T. Gansler. Detection of Cytomegalovirus in shell vial cultures by using a DNA probe and early nuclear antigen monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.* 26: 1895-1897 (1988).
85. Singh-Naz N., W. J. Rodríguez, A. H. Kidd, & C. D. Brandt. Monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assay for speci-

fic identification and typing of subgroup F Adenoviruses. J. Clin. Microbiol. 26: 297-300 (1988).

86. Smith J. W., R. E. Rogers, B. P. Kats, J. F. Brickler, P. L. Lineback, B. Van Der Pol & R. B. Jones. Diagnosis of chlamydial infection in women attending antenatal and gynecologic clinics. J. Clin. Microbiol. 25: 868-872 (1987).

87. Sorbello A. F., S. L. Elmendorf, J. J. McSharry, R. A. Venezia & R. M. Echols. Rapid detection of Cytomegalovirus by fluorescent monoclonal antibody staining and in situ DNA hybridization in a dram vial shell culture system. J. Clin. Microbiol. 26: 1111-1114 (1988).

88. Stamm W. E., M. Tam, M. Koester & L. Cles. Detection of Chlamydia trachomatis inclusions in McCoy cell cultures with fluorescein-conjugated monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol. 17: 666-668 (1983).

89. Stephens R. S., C. C. Kuo & M. R. Tam. Sensitivity of immunofluorescence with monoclonal antibodies for detection of Chlamydia trachomatis inclusions in cell culture. J. Clin. Microbiol. 16: 4-7 (1982).

90. Stibbs H. H. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for Giardia lamblia antigens in human stool. J. Clin. Microbiol. 27: 2582-2589 (1989).

91. Stites D. P., J. D. Stobo., J. V. Wells.  
INMUNOLOGIA BASICA Y CLINICA.  
El Manual Moderno S. A. de C. V.  
6a. ed.  
México, D. F. (1988).

92. Storey C. C., G. Mearns & S. J. Richmond. Immune Dot Blot

technique for diagnosing infection with Chlamydia trachomatis.  
Genitourin Med. 63: 375-379 (1987).

93. Stout C., M. D. Murphy, S. Lawrence & S. Julian. Evaluation of a monoclonal antibody pool for rapid diagnosis of respiratory viral infections. J. Clin. Microbiol. 27: 448-492 (1989).

94. Strickland M. A., M. A. Gaston & T. L. Pitt. Comparison of polyclonal rabbit antisera with monoclonal antibodies for serological typing of Pseudomonas aeruginosa. J. Clin. Microbiol. 26: 768-769 (1988).

95. Strugnell A., J. R. Underwood, F. M. Clarke, J. S. Pedersen, P. J. Chalmers, S. Faine & B. H. Toh. A monoclonal IgM smooth muscle antibody reactive with fibroblast stress fibres produced by immunization with Treponema pallidum. Clin. Exp. Immunol. 52: 537-542 (1983).

96. Svensson L., L. Grahnquist, C. Pettersson, M. Grandien, G. Stintzing & H. B. Greenberg. Detection of human rotaviruses which do not react with subgroup I- and II-specific monoclonal antibodies J. Clin. Microbiol. 26: 1238-1240 (1988).

97. Thiele, G. M., M. S. Bicak, A. Young, J. Kinser, R. J. White & D. T. Purtilo. Rapid detection of Cytomegalovirus by tissue culture, centrifugation and immunofluorescence with a monoclonal antibody to an early nuclear antigen. J. Virol. Methods. 16: 327-338 (1988).

98. Thomas B. J., R. T. Evans, G. R. Hutchinson & D. T. Robinson. Early detection of chlamydial inclusions combining the use of cycloheximide-treated McCoy cells and immunofluorescence staining. J. Clin. Microbiol. 6: 285-292 (1977).

99. Tilton R. C., F. N. Judson, R. C. Barnes, R. P. Gruninger, R.



W. Ryan & O. Steingrímsson. Multicenter comparative evaluation of two rapid microscopic methods and culture for detection of Chlamydia trachomatis in patient specimens. J. Clin. Microbiol. 26: 167-179 (1988).

100. Uchida T., X. J. Yu, T. Uchiyama & D. H. Walker. Identification of a unique spotted fever group Rickettsia from humans in Japan. J. Infect. Dis. 159: 1122-1126 (1989).

101. Uchiyama T., T. Uchida & D. H. Walker. Species-specific monoclonal antibodies to Rickettsia japonica, a newly identified spotted fever group rickettsia. J. Clin. Microbiol. 28: 1177-1180 (1990).

102. Urasawa S., T. Urasawa & K. Taniguchi. Genetic reassortment between two human Rotavirus having different serotype and subgroup specificities. J. Gen. Virol. 67: 1551-1559 (1986).

103. Uyeda C. T., P. Welborn, N. Ellison-Birang, K. Shunk & B. Tsao. Rapid diagnosis of chlamydial infections with the microtrack direct test. J. Clin. Microbiol. 20 (1984).

104. Viljanen M. K., L. Linko & O. Lehtonen. Detection of Bacteroides fragilis, Bacteroides thetaiotaomicron, and Bacteroides ovatus in clinical specimens by immunofluorescence with a monoclonal antibody to B. fragilis lipopolysaccharide. J. Clin. Microbiol. 26: 448-452 (1988).

105. Virji M. & J. E. Heckels. Antigenic cross-reactivity of Neisseria Pili: Investigations with type and species-specific monoclonal antibodies. J. Gen. Microbiol. 129: 2761-2768 (1983).

106. Virji M., J. E. Heckels & P. J. Watt. Monoclonal antibodies to gonococcal pili: Studies on antigenic determinants on pili

from variants of strain P9. J. Gen. Microbiol. 129: 1965-1973 (1983).

107. Virji M., K. Zak & J. E. Heckels. Monoclonal antibodies to gonococcal outer membrane protein IB: Use in investigation of the potential protective effect of antibodies directed against conserved and type-specific epitopes. J. Gen. Microbiol. 132: 1621-1629 (1986).

108. Viscidi R. P., C. O'Meara, H. Farzadegan & R. Yolken. 1989. Monoclonal antibody solution hybridization assay for detection of human immunodeficiency virus nucleic acids. J. Clin. Microbiol. 27: 120-125 (1989).

109. Visvesvara G. S., M. J. Peralta, P. H. Brandt, M. Wilson, C. Aloisio & E. Franko. Production of monoclonal antibodies to Naegleria fowleri, agent of primary amebic meningoencephalitis. J. Clin. Microbiol. 25: 1629-1634 (1987).

110. Vitale G., R. DiStefano, G. Damiani & S. Mansueto. Characterization of Sicilian strains of spotted fever group Rickettsiae by using monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol. 27: 1081-1085 (1989).

111. Vlaspolder F., T. Harmsen, D. Van Veenendaal, C. A. Kraaijeveld & H. Snippe. Application of immunoassay of encephalomyocarditis virus in cell culture with enzyme-labeled virus-specific monoclonal antibodies for rapid detection of virus, neutralizing antibodies and interferon. J. Clin. Microbiol. 26: 2593-2597 (1988).

112. Waris M., T. Ziegler, M. Kivivirta & O. Ruuskanen. Rapid detection of respiratory syncytial virus and influenza A virus in cell cultures by immunoperoxidase staining with monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol. 28: 1159-1162 (1990).

113. Welch W. D. & G. Cartwright. Fluorescent monoclonal antibody compared with carbohydrate utilization for rapid identification of Neisseria gonorrhoeae. J. Clin. Microbiol. 26: 293-296 (1988).
114. Wood D. J., K. Bijlsma, J. C. de Jong & C. Tonkin. Evaluation of a commercial monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for detection of adenovirus types 40 and 41 in stool specimens. J. Clin. Microbiol. 27: 1155-1158 (1989).
115. Woods G. L. & R. D. Mills. Conventional tube cell culture compared with centrifugal inoculation of MRC-5 cells and staining with monoclonal antibodies for detection of Herpes simplex virus in clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 26: 570-572 (1988).
116. Woolrich D. J..  
UROLOGIA.  
Academia Nacional de Medicina.  
México, D. F. (1977).
117. Worsaae A., L. Ljungqvist & I. Heron. Monoclonal antibodies produced in BALB.B10 mice define new antigenic determinants in culture filtrate preparations of Mycobacterium tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 26: 2608-2614 (1988).
118. Young D. B., S. R. Khanolkar, L. L. Barg & T. M. Buchanan. Generation and characterization of monoclonal antibodies to the phenolic glycolipid of Mycobacterium leprae. Infect. Immun. 43: 183-188 (1984).
119. Young H. & K. G. Reid.  
IMMUNOLOGICAL DIAGNOSIS OF SEXUALLY TRANSMITTED DISEASES.  
Marcel Dekker Inc.  
2a. Ed. p.77-155.  
New York, New York (1988).

120. Zhang Y., S. Stewart, T. Joseph, H. R. Taylor & H. D. Caldwell. Protective monoclonal antibodies recognize epitopes located on the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis. J. Immunol. 138: 575-581 (1987).