

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Inmunováloração de anticuerpos IgM en muestras sospechosas de sarampión clínicamente

Dra. María de los Ángeles Ribas Antúnez,¹ Lic. Yaima Arocha Rosete,² Téc. Ileana Torano Canto³ y Téc. Carina Rodríguez Valdés³

RESUMEN

Se realiza el estudio de 60 sueros pareados sospechosos de Sarampión clínicamente llegados al Laboratorio Diagnóstico del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" entre enero y mayo de 1996, procedentes de la vigilancia seroepidemiológica de la vacuna triple viral (sarampión, rubéola y parotiditis), a los cuales se les realizó la detección de anticuerpos hemaglutinantes a sarampión y rubéola, así como de IgM, con el estuche diagnóstico Clark Laboratories INC Measles IgM ELISA. Los casos positivos se confirmaron por las técnicas de inmunofluorescencia indirecta-IgM y neutralización. Se obtuvieron por inhibición de la hemaglutinación, 3 casos positivos a sarampión y rubéola, los cuales negativos a IgM de sarampión y a los que se les determinaron anticuerpos a Epstein Barr, Citomegalovirus y al virus herpes simple mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) la capacidad de estos virus de inducir respuesta policlonal. Por medio del ELISA IgM Clark se detectaron 6 casos positivos los cuales resultaron negativos por IFI.

Descriptores DeCS: VIRUS DEL SARAMPION/immunología; IGM/sangre; ANTICUERPOS ANTIIDOTIPOS; TECNICA DEL ANTICUERPO FLUORESCENTE INDIRECTA/métodos; TESTS DE INHIBICION DE HEMAGLUTINACION/métodos; TEST DE ELISA/métodos.

El sarampión es una enfermedad viral muy contagiosa caracterizada por fiebre, tos, coriza, conjuntivitis y un exantema específico o manchas de Koplik en la cavidad bucal, seguido de una erupción maculopapular generalizada. Su vía principal de diseminación es la respiratoria y afecta, fundamentalmente, a la población infantil con un rango de edades entre 2 y 6 años, la mayor incidencia es en los países menos desarrollados, en los cuales más de 1 000 000 de niños mueren cada año como resultado de esta enfermedad.¹ Esta afección es prevenida por la administración de una vacuna viva atenuada, la cual puede ser combinada con la de la rubéola y la de la parotiditis.

La respuesta inmune del huésped a la infección es rápida y característica, los anticuerpos se detectan

primero en forma coincidente con la aparición del *rash*. La primera clase de anticuerpos en aparecer son los de tipo IgM, seguidos de IgG1 e IgG4, los que corresponden a sitios específicos del virus y pueden ser detectados por inmunoensayos con el empleo de proteínas virales purificadas. La presencia de anticuerpos IgM es relativamente corta, dura entre 1 y 3 meses y son los de mayor importancia por su significado en la infección reciente, alcanzan su valor máximo a los 10 d de iniciado el *rash*; los anticuerpos de tipo IgG duran de por vida, determinan la inmunidad por tiempo prolongado después de una infección natural o de una inmunización activa.¹⁻⁴

Los anticuerpos circulantes pueden ser demostrados por una gran variedad de sistemas diagnósticos, como son la inmunofluorescencia indirecta

¹ Especialista de I Grado en Microbiología. Investigadora Agregada.

² Licenciada en Microbiología.

³ Técnica en Procesos Biológicos.

(IFI), los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), inhibición de la hemaglutinación (IH), la neutralización (Nt) y la fijación del complemento (FC), etcétera.⁵

Para el estudio de la presencia de anticuerpos de tipo IgM son muy usados los ensayos indirectos y los de captura con la aplicación de los anticuerpos monoclonales biotinilados y como antígenos las proteínas N y P expresadas en baculovirus, lo que le da una mayor sensibilidad y especificidad al ensayo.³

En Cuba, desde 1988, se estableció un sólido sistema de vigilancia seroepidemiológica, se estudian todos los casos sospechosos de sarampión, rubéola y parotiditis por la técnica de inhibición de la hemaglutinación⁶ a partir de la implantación del Programa de Vacunación con la Triple Viral a la población infantil.

Desde 1995, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y los países de la región adoptaron la medida de eliminar el sarampión para el año 2000 en las Américas, para lo cual estableció que se debía mantener una vigilancia minuciosa de todas las enfermedades febriles exantemáticas y realizar la detección de anticuerpos IgM a todos los sueros de los pacientes que se ciñan a la definición de caso clínico de sarampión.⁷

En este estudio se introduce la inmunoválora de IgM al virus del sarampión como parte de la vigilancia seroepidemiológica nacional de sarampión, rubéola y parotiditis que se lleva a cabo en el Laboratorio Diagnóstico del Departamento de Virología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

MÉTODOS

El universo de trabajo estuvo constituido por 60 sueros pareados pertenecientes a casos clínicamente sospechosos de sarampión y rubéola, recibidos en el Laboratorio Diagnóstico del Departamento de Virología del IPK a través del Sistema Nacional de Vigilancia Seroepidemiológica de la vacuna Triple Viral (sarampión, rubéola y parotiditis), procedentes de diferentes provincias del país en el período comprendido entre enero y mayo de 1996. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso.

Preparación del antígeno de sarampión para la IH e IFI. Se inoculó la cepa Edsmonton del virus del sarampión en células de riñón de mono verde africano (VERO), después de 30 min en contacto a 37 °C con movimientos ocasionales, se añadió medio 199 con 2 % de suero de ternera fetal (STF), 0,1 % de antibiótico (penicilina y estreptomycin) y se incubó a 37 °C. A las 72 h se realizó cambio de medio y se añadió medio 199

sin STF. Las células se observaron a diario hasta la aparición de más de 75 % de efecto citopático (ECP). Éstas se desprendieron con perlas de cristal. Se congelaron y descongelaron 8 veces y se sonicaron a razón de 6 ciclos de 30 s y se centrifugaron luego al 500 r.p.m. durante 10 min.

Preparación del antígeno de rubéola para la IH e IFI. Se preparó según el método descrito por Vejtop en 1986. La cepa utilizada fue donada por el Instituto "Carlos III" de Majadahonda, España, y cultivada en células VERO con medio 199, suplementado con 2 % de STF más antibiótico (100 µ/mL de penicilina y 100 µ/mL estreptomycin) hasta observar más del 75 % de ECP en las células infectadas.⁸

Inhibición de la hemaglutinación. Para la detección de los anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación se realizó la técnica de IH según el método adaptado para micrométodo con algunas modificaciones.⁹

Inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos de tipo IgM de sarampión y rubéola. Se prepararon láminas para la detección de anticuerpos de tipo IgM de sarampión y rubéola según el método empleado por Knapp.¹⁰ Las células VERO infectadas y sin infectar con el antígeno de sarampión y rubéola fueron fijadas con acetona a las láminas de inmunofluorescencia, a las cuales se les añadieron 10 µL de muestras previamente tratadas con absorbente del factor reumatoideo (Beringher) y se incubaron 3 h a 37 °C. Pasado este tiempo se lavaron con PBS y se les adicionó el conjugado anti- IgM humano marcado con azul de Evans (Biocen) y se incubaron 30 min a 37 °C. Se volvieron a realizar lavados sucesivos con PBS y después se añadió glicerina al 1 %, se colocó el cubreobjeto y se observó en el microscopio de fluorescencia. Se consideró una muestra positiva aquella que presentara fluorescencia en las células infectadas y ausencia de ésta en las células no infectadas.

Estuche diagnóstico "Clark Laboratories INC. Measles IgM ELISA" (EE.UU.). Para la detección de anticuerpos de tipo IgM por ELISA, se empleó el estuche diagnóstico antes citado y se siguió la metodología recomendada por el fabricante.

Preparación del antígeno de Citomegalovirus para la IFI. La cepa de referencia AD169 se inoculó en la línea de fibroblastos humanos diploides (PH), las células se mantuvieron en medio Eagle (MEM) al cual se le adicionaron 1 % de glutamina; 0,5 % de penicilina y estreptomycin; y STF al 10 % para su multiplicación. Para el mantenimiento de la célula se utilizó STF al 2 %.

Preparación del antígeno del virus del herpes simple (HSV) para la IFI. Se preparó a partir de cultivo

de células VERO infectadas con la cepa 107 de HSV tipo 1 obtenida de un aislamiento en el laboratorio y caracterizada por anticuerpos monoclonales (*Monoclonal Kit Herpes Simplex Biomeriux*). El procedimiento de fijación de las células infectadas se realizó de acuerdo con lo descrito previamente en otros estudios.¹¹

IFI para la detección de anticuerpos IgG de Citomegalovirus (CMV) y HSV. Se utilizaron células diploides de pulmón humano (PH) infectadas con CMV y células VERO infectadas con HSV, fijadas a las láminas de fluorescencia. Se añadieron los sueros diluidos desde 1:20 a 1:1 280, se tomó como criterio de positividad la dilución 1:20. Se añadió el conjugado anti-IgG humano marcado con fluorescencia (Biocen, Cuba). Se consideró como título de anticuerpos a la última dilución del suero en la cual la prueba fue positiva.

IFI para la detección de anticuerpos de tipo IgG contra la proteína de la cápside viral (VCA) del virus Epstein Barr (EBV). Se usaron láminas fijadas con células P3HR1 como fuente de antígeno y un conjugado anti-IgG humano marcado con isotiocianato de fluoresceína (Biocen, Cuba). Se emplearon diluciones cuádruples del suero, desde 1:5 hasta 1:1 280.

IFI para la detección de antígeno temprano (EA) al EBV. Se empleó igual metodología que para la detección de anticuerpos de la cápside viral, pero se fijaron a las láminas de fluorescencia células Raji tratadas previamente para que se expresara el antígeno temprano y se usó una sola dilución del suero (1:5). El criterio de positividad estuvo dado por la aparición de fluorescencia, indicativo de la presencia de antígeno temprano.

Técnica de neutralización al virus del sarampión. Se realizó por microneutralización según el método descrito para la determinación de anticuerpos neutralizantes al sarampión.⁹

RESULTADOS

De los 60 pares de suero estudiados, 3 (5 %) presentaron seroconversión o aumento del título del segundo suero 4 veces o más con respecto al primero, cuando se les hizo la IH simultáneamente a sarampión y rubéola. A éstos se les realizó IFI-IgM y fueron negativos a ambos virus de igual forma que al ser estudiados por la técnica de neutralización al virus del sarampión.

Debido a la positividad de estos sueros tanto al virus del sarampión como al de la rubéola por IH, se les determinaron anticuerpos a otros agentes virales como EBV, CMV, HSV, mediante la técnica de la IFI; se encontró en uno de ellos positividad al antígeno temprano de

EBV y aumento del título al antígeno de la cápside viral. En el segundo par de sueros se encontró alto título a CMV y el tercer par fue negativo a los virus anteriores. Los 57 pares de sueros restantes fueron negativos por la técnica de la inhibición de la hemaglutinación (tabla 1).

TABLA 1. Detección de anticuerpos a EBV, CMV y HSV por IFI en los 3 sueros positivos al sarampión y a la rubéola por IH

Casos	Rubéola	Sarampión	EA	VCA	CMV	HSV
1	-10/ 160	-4/ 16	+	20/ 80	80/ 80	80/ 80
2	10/160	-4/16	-	80/80	320/320	80/80
3	10/80	8/32	-	80/80	80/80	80/80

EA: Antígeno temprano. VCA: Antígeno de la cápside viral. CMV: Citomegalovirus. HSV: Virus del herpes simple.

En la tabla 2 se muestran los resultados de la detección de IgM al virus del sarampión con el estuche diagnóstico ELISA IgM Clark, se encontraron 6 casos positivos (10 %) por esta técnica, los cuales no coinciden con los que seroconvirtieron por IH. A los 6 casos anteriores se les realizó la IFI-IgM al virus del sarampión para confirmar su positividad, todos fueron negativos.

TABLA 2. Resultados del estudio por ELISA IgM Clark e IH de los casos estudiados

Técnica empleada	Positivos		Negativos	
	No	%	No	%
IH	3*	5	57	95
IgM Clark	6	10	54	90

* Los 3 sueros fueron negativos a IgM.

DISCUSIÓN

La detección de anticuerpos de tipo IgM en casos clínicamente probables de sarampión, es la técnica fundamental de diagnóstico que se ha puesto en práctica en el propósito de la OPS de eliminar esta enfermedad en la región de las Américas para el año 2000, con el objetivo de sustituir las muestras pa-readas por monosueros que permitan realizar el diagnóstico de esta entidad en la fase aguda de la enfermedad lo más rápido posible.⁶

En este trabajo estudiamos 60 pares de sueros por IH, técnica muy usada en diferentes laboratorios,

con la que encontramos 3 sueros positivos a sarampión. Éstos al ser estudiados para el virus de la rubéola por igual técnica, metodología aplicada en nuestro laboratorio debido a la posibilidad de errores de diagnóstico clínico, fueron positivos también.

De todos los casos estudiados con el diagnóstico de sarampión y rubéola, ninguno se ceñía a la definición de caso probable de sarampión adoptada por la OPS/OMS, donde se expresa que un caso típico de esta enfermedad debe presentar: erupción maculopapular generalizada de 3 d o más de duración, acompañada por fiebre casi siempre elevada y 1 de los siguientes síntomas: tos, coriza o conjuntivitis.¹² En nuestros pacientes predominó el cuadro clínico dado por fiebre y *rash*, sin ninguna de las otras manifestaciones, por lo que debemos clasificarlos como casos sospechosos de sarampión, éstas no son muestras clínicamente adecuadas para el diagnóstico de esta enfermedad.

Como las reacciones cruzadas entre los virus son muy conocidas, por ejemplo, aquéllas que ocurren entre parotidis y parainfluenza, así como entre los miembros de la familia Herpesviridae como son los virus Epstein Barr, Citomegalovirus y herpesvirus, decidimos realizar la detección de los anticuerpos a éstos en los 3 pares de sueros, por ser los que mayor número de reacciones cruzadas dan; nuestros resultados coinciden con las investigaciones realizadas por *Resik* y otros en 1996, donde se estudió un grupo de 20 muestras positivas a sarampión y rubéola de forma simultánea y a las que se les realizó detección de anticuerpos a HSV, CMV y EBV, y se encontró un mayor número de muestras positivas a este último.¹³

Desde el punto de vista epidemiológico no se encontraron casos de sarampión y rubéola en zonas geográficas cercanas a las que viven estos pacientes (Pinar del Río, Holguín y Santiago de Cuba), ni se conoce del arribo de éstos de un país donde aún se reporten estas enfermedades, todo lo que nos lleva a concluir que desde el punto de vista clínico, microbiológico y epidemiológico no nos encontramos en presencia de casos con estas enfermedades.

En estudios realizados por diferentes autores, se plantea que la positividad de los sueros a diferentes agentes a la vez puede deberse a varias causas, entre las que tenemos el proceso de reactivación de virus heterólogos, la estimulación selectiva de células B de memoria por antígenos relacionados o estimulación policlonal de células B durante infección viral. El EBV, el CMV y el sarampión se caracterizan por su capacidad de dar respuesta policlonal. Se ha llegado a conocer que algunos virus pueden ser moduladores no específicos de la respuesta inmune y que causan

incremento o depresión en la formación de anticuerpos para antígenos no relacionados.¹³

Para la detección de IgM la fecha de la toma de la muestra en las fases agudas y convaleciente es muy importante. En nuestros casos el intervalo del segundo suero fue de 15 d de iniciado el *rash*, a partir del décimo día es el tiempo ideal para la realización de la investigación debido a que es el momento en que la IgM alcanza su valor máximo. En el estudio efectuado por *Mayo* y otros, el 98,4 % de los casos positivos a IgM se encontró en muestras tomadas después de 15 d de iniciado el *rash*.²

Estos casos fueron estudiados por IFI, ya que dentro de las recomendaciones del estuche Clark está la confirmación de los casos dudosos y positivos por esta técnica, además, por ser de gran sensibilidad y especificidad y por contar en nuestro laboratorio con la experiencia para el trabajo con esta técnica.

En numerosos estudios se ha utilizado la IFI para la detección de IgM en pacientes sospechosos de sarampión y otras enfermedades teniendo en cuenta siempre la experiencia del observador.^{14,15}

Las 6 muestras positivas a IgM ELISA y negativas por IFI-IgM, nos hacen pensar en un resultado falso positivo por ELISA, lo que es característico de los sistemas de ELISA indirectos debido a la interferencia del factor reumatoideo (FR) presente en la muestra. Este factor puede ser eliminado por el tratamiento de las muestras con solución absorbente del FR, pero en diferentes estudios relacionados con la eficacia de éste, se han vertido diferentes opiniones con respecto a esto, ya que en investigaciones realizadas por *Olli Meurman*, se considera la necesidad de volver a tratar las muestras con solución absorbente del FR, una vez tratadas.^{16,17} Este autor plantea que no se ha reportado una vía ideal para remover el FR y que este factor es el principal problema técnico con respecto a la detección de IgM en ensayos indirectos.

Nuestro estudio coincide con el realizado por *Mayo* y otros, donde se encontraron 3 resultados falsos positivos por ELISA IgM indirecto en 93 sueros pareados estudiados al comparar con el ELISA IgG y la fijación del complemento.¹⁸

Consideramos que el ELISA IgM indirecto es indicador de positividad en el sarampión agudo, sobre todo en aquellos lugares donde existen muchas muestras positivas a esta enfermedad y en brotes epidémicos. En presencia de casos esporádicos clínicamente sospechosos como los que recibimos en nuestro laboratorio, se debe mantener la detección de anticuerpos en muestras pareadas por la técnica de IH, además de la detección de IgM para la confirmación de los casos.

SUMMARY

60 matched sera clinically suspicious of measles that were received at the Diagnostic Laboratory of the "Pedro Kouri" Tropical Medicine Institute between January and May, 1996, coming from the seroepidemiological surveillance of the MPR vaccine were studied. The detection of measles and rubella hemagglutinant antibodies, as well as of IgM, was carried out with the Clark Laboratories INC. Measles IgM ELISA diagnostic kit. The positive cases were confirmed by the IgM-indirect immunofluorescence and neutralization. 3 positive cases to measles and rubella, which were negative to measles IgM, were obtained by hemagglutination inhibition. Antibodies against Epstein Barr, cytomegalovirus and herpes simplex virus were also determined by indirect immunofluorescence (IIF) due to the capacity of these viruses to induces polyclonal responses. 6 positive cases, which were negative by IIF, were detected by means of the above mentioned diagnostic kit.

Subject headings: MEASLES VIRUS/immunology; IGM/blood; ANTIBODIES, ANTI-IDIOTYPIC; FLUORESCENT ANTIBODY TECHNIQUE, INDIRECT/methods; HEMAGGLUTINATION INHIBITION TESTS/methods; ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY/methods.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Norrby E, Oxman M. Measles virus. En: Fields BN, Knipe DM, eds. *Virology*. 2 ed. New York: Raven, 1990; vol 1: 1013-37.
- Erdman D, Health J, Watson J, Markowitz L, Bellini W. Immunoglobulin M antibody response to measles virus following primary and secondary vaccination and natural virus infection. *J Med Virol* 1993;41(1):44-8.
- Erdman D, Anderson L, Adams D, Stewart J, Markowitz L, Bellini W. Evaluation of monoclonal antibodies-based capture enzyme immunoassays for detection of specific antibodies to measles virus. *J Clin Microbiol* 1991;29(7):1466-71.
- Griffin D, Ward B, Esolen L. Pathogenesis of measles virus infection: an hypothesis for altered immune response. *J Infet Dis* 1994;170(Suppl 1):S24-31.
- Withers G, Sweimber I, Kleger B. Comparison of the MEASLESTAT M test with the Sucrose Gradient Centrifugation-Hemagglutination inhibition method for detection of measles virus-specific IgM. *J Clin Microbiol* 1992;30(8):2204-6.
- Galindo M. Sarampión. En: Programa de Eliminación del Sarampión en la República de Cuba. La Habana: Ministerio de Salud Pública, 1995:1-5.
- Herts B. Sarampión. En: OPS. Programa Especial para Vacunas e Inmunizaciones (SVI). Informe final. Atlanta: Pan American Health Organization 1995:10-20.
- Herman KL, Rubella Virus. En: Lennette EH, Schmidt N. Diagnostic procedure for viral, rickettsial and chlamydial infection. 5ed. Washington, D.C.: American Public Health Association 1979:725-66.
- Gershony A, Krugman S. Measles virus. En: Lennette E, Schmidt N. Diagnostic procedure for viral, rickettsial and chlamydial infections. 5ed. Washington, D.C.: American Public Health Association; 1979:665-93.
- Knapp W, Holabar K, Wick G, eds. Immunofluorescence and related staining techniques. Workshop report on microbiology and parasitology. Amsterdam: Elsevier, 1978:299-308.
- Ribas MA, Álvarez M, Vázquez S. Normalización y aplicación de un ultramicroELISA para la detección de anticuerpos al virus herpes simple. *Rev Cubana Med Trop* 1992;44(2):104-8.
- Galindo M. Sarampión, rubéola y parotiditis. En: Dirección Nacional de Epidemiología. Programa de eliminación del sarampión, rubéola y parotiditis. La Habana: Ministerio de Salud Pública, 1995:1-19.
- Resik S, Sariol C, Álvarez M, Marrero M. Respuesta anómala de anticuerpos en infecciones virales productoras de rash. *Rev Cubana Med Trop* 1996;48(1):56-8.
- Mennich L, Goodanough F, Ray G. Use of immunofluorescence identifies measles virus infection. *J Clin Microbiol*; 1991;29(6):1148-50.
- Rossier E, Miller H, Mc Culloch B, Sullivan L, Ward K. Comparison of immunofluorescence and enzyme immunoassay for detection of measles-specific IgM antibody. *J Clin Microbiol* 1991;29(5):1069-71.
- Meurman O, Teuho P, Salmi A. Activation of rheumatoid factor during pregnancy. *Lancet* 1978;2:685-6.
- Tuokko H. Comparison of nonspecific reactivity in indirect and reverse immunoassays for measles and mumps immunoglobulin M antibodies. *J Clin Microbiol* 1984;20(5):972-6.
- Mayo D, Brennan T, Cornier D, Hadler J, Lamb P. Evaluation of a commercial measles virus Immunoglobulin M Enzyme Immunoassay. *J Clin Microbiol* 1991;29(12):2865-7.

Recibido: 28 de febrero de 1997. Aprobado: 14 de noviembre de 1997.

Dra. *María de los Ángeles Ribas Antúnez*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.