

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG ESPECÍFICOS PARA SARAMPIÓN MEDIANTE LA TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Mónica Nieto Z¹, Ana Ortiz A², José Chauca C³

¹ Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad Nacional Federico Villarreal.

² División de Virología, Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud.

³ Instituto de Medicina Tropical "Alexander Von Humboldt", Universidad Peruana Cayetano Heredia.

RESUMEN

La técnica de inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpos IgG específicos a sarampión (IFI-IgG) fue evaluada con la prueba de neutralización por reducción de placas (PRN) con 128 muestras de suero de personas con edades entre 0 y 15 años, 64 con antecedente de vacunación y 64 sin éste antecedente. El IFI-IgG alcanzó una sensibilidad de 80,4% y una especificidad de 100,0%, mostrando ser una prueba sencilla, reproducible, y tener correlación con PRN, aunque menos sensible que ésta última, especialmente cuando la PRN estimó títulos bajos de anticuerpos. Se concluye que la técnica IFI-IgG puede ser usada como método de rutina para la confirmación de sarampión en muestras de fase aguda y convalescente de la enfermedad (sueros pareados), así como para estudios de prevalencia de anticuerpos en la comunidad, aunque no reemplazaría a la PRN.

Palabras claves: Técnica del anticuerpo fluorescente indirecta; IgG; Sarampión (*fuentes:* BIREME).

ABSTRACT

Indirect Immunofluorescence testing for detection of measles specific IgG antibodies (IF-IgG) performed in National Institute of Health (Perú) was assessed using Plaque Reduction Neutralization test (PRN) in 128 sera from people aged between 0 and 15 years, 64 vaccinated and 64 unvaccinated. IF-IgG facilitated the detection of IgG antibodies, showing be simple to perform, good reproducibility and correlation with PRN, although it was less sensible than this, especially when the titers for antibodies were low. IFI-IgG technique can be used as a routine method for the confirmation of measles in samples from acute and convalescent phase of the illness (serum pairs) and it would be also useful in studies of antibodies prevalence in the community, although it would not replace PRN. 95.31% of the vaccinated group and 71.88% of the unvaccinated group were positive for measles using PRN.

Keys word: Fluorescent antibody technique, Indirect; IgG; Measles (*source:* BIREME).

INTRODUCCION

El sarampión es una enfermedad infecciosa altamente contagiosa, de etiología viral, importante como problema de salud pública debido a que su impacto en la morbilidad y mortalidad de los niños ha sido reconocido por muchos años en todo el mundo¹⁻⁶. En 1994, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) se propuso la meta de erradicar el sarampión en todos los países de América para el año 2000; sin embargo, a pesar de la extensión de las coberturas de vacunación y la disminución del número de casos notificados, esta enfermedad sigue siendo un problema en muchos países⁵.

En el Perú, el sarampión ha sido la enfermedad inmunoprevenible más importante de las últimas décadas, habiéndose notificado mayor número de casos en la niñez^{3,7}. La última epidemia de gran magnitud fue en 1992 con un registro de 22 605 casos y 347 defunciones, la que se extendió hasta 1993 con 1730 casos y 24 defunciones^{2,3,7}. Ante esta situación, el Ministerio de Salud ha efectuado acciones preventivas para alcanzar la erradicación, logrando altas coberturas de vacunación durante los últimos cinco años, mediante intensas jornadas en menores de 15 años y la puesta en práctica de un sistema de vigilancia epidemiológica⁸.

El número de individuos con anticuerpos contra sarampión varía en cada país y región, por lo que es necesario realizar estudios periódicos de seroprevalencia que determinen los grupos susceptibles que harían

Correspondencia: Ana Ortiz Armas. Instituto Nacional de Salud. Calle Cápac Yupanqui 1400, Lima 11, Perú. Apartado Postal 471. Telf.: (0511) 4719920 - Fax: (0511) 4710179.
Email: inmuno@ins.sld.pe

posible la propagación de la enfermedad, pues la ausencia de circulación del virus no impide la posibilidad de brotes^{1,9}. Para dicho propósito, se requiere de una prueba que sea eficaz, simple y de bajo costo, que permita realizar en forma rápida un diagnóstico serológico de la comunidad; por ello, el Laboratorio de Virus Inmunoprevenibles y Respiratorios del Instituto Nacional de Salud (INS) ha implementado la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos IgG contra sarampión. La técnica de IFI es ampliamente utilizada y presenta muchas ventajas cuando se desea determinar cuantitativamente los niveles de anticuerpos¹⁰; sin embargo, antes de aplicar una técnica, es necesario evaluar su utilidad comparándola con un método referencial¹¹ que en el caso de sarampión es la prueba de Neutralización por Reducción de Placas (PRN), la cual es muy tediosa, costosa e involucra mucho tiempo^{6,12,13}.

En el presente estudio se realizó la evaluación de la detección de anticuerpos IgG específicos para el virus del sarampión mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta estandarizada en nuestro laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

SELECCIÓN DE LA MUESTRA

El estudio se realizó con muestras de suero conservadas a -20°C , en el Laboratorio de Virus Inmunoprevenibles y Respiratorios del INS, recepcionadas durante el año 1998 de casos sospechosos de sarampión procedentes de diferentes departamentos del Perú.

Se incluyeron 128 muestras de personas con edades entre 0 y 15 años, con datos completos sobre inmunización, agrupándolos en: a) 64 muestras de personas con antecedente de vacunación y b) 64 muestras de personas sin antecedente de vacunación; cada muestra presentó resultado negativo a infección por sarampión (IgM negativo por ELISA). Se excluyeron las muestras de personas de 16 años de edad a más, así como las muestras hemolizadas o contaminadas. Se emplearon sueros controles positivos, de pacientes con diagnóstico positivo a infección por sarampión (IgM positivo por ELISA), confirmados por el Instituto de Salud Pública de Chile: 2 muestras positivas por respuesta a vacunación (de fase aguda y convalescente) y 1 muestra positiva por respuesta a infección natural (de fase convalescente).

CULTIVO CELULAR

Se trabajó con la línea celular Vero (ATCC #CCL-81), la que se propagó en MEM-E (medio mínimo esencial con sales de Earle) suplementado con SBF (suero bovino fetal), pH de 7,1-7,2. El crecimiento de las células se mantuvo en medio con 8% de SBF y el mantenimiento en medio con 2% de SBF; a temperatura de 37°C ¹⁴.

VIRUS DE SARAMPIÓN

Se trabajó con el virus de sarampión cepa vacunal Edmonston-Zagreb, utilizados en el Programa Ampliado de Inmunizaciones (PAI), de características: viva, atenuada, liofilizada, con 1000 TCID₅₀¹, y desarrollada en células diploides humanas (WI-38).

El virus fue replicado en dos pasajes en células Vero. El antígeno de sarampión se obtuvo por lisis celular mediante congelamiento y descongelamiento (temperatura ambiente y -70°C), seguido de centrifugación a 2500 rpm, por 15 minutos en refrigeración y la preservación del sobrenadante a -70°C ¹⁵.

La titulación del antígeno de sarampión, se realizó por el método de plaqueo en cultivo de células Vero¹⁶, para determinar la concentración de partículas virales infectantes (en UFP/mL).

PRUEBA DE NEUTRALIZACIÓN POR REDUCCIÓN DE PLACAS (PRN)

Se procedió según el método descrito por Albrecht¹². Los sueros fueron diluidos seriadamente, al doble, empezando desde 1:4. Se determinó el título de anticuerpos del suero como la dilución del suero que redujo al 50% el número de placas virales por el método de Karber¹⁷.

TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI-IGG)

El fundamento de la técnica de inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpos IgG contra sarampión se basó en los reportes de Riggs¹⁰.

En la producción de láminas para inmunofluorescencia se utilizó células Vero infectadas con virus de sarampión y células no infectadas (control de células normales). Las células presentaron 50-75% de efecto citopático, las que fueron dispersadas con tripsina-EDTA y homogenizadas con MEM-H (medio mínimo con sales de Hank), seguido de 3 lavados con MEM-H a 1200 rpm por 5 minutos, el precipitado celular se resuspendió en MEM-H + 10% SBF para obtener una concentración de 5×10^5 cel/mL. Luego, se dispensó 10 mL de suspensión celular en cada pocillo de la lámina, así como, células no infectadas, en la misma concentración. Las láminas se dejaron secar toda la noche y se fijaron en acetona a -20°C por 30 minutos, preservándose a -70°C hasta su uso.

Se empleó el conjugado anti-IgG humano marcado con FITC (isotiocianato de fluoresceína), de origen comercial (SIGMA), específico a la cadena G de la inmunoglobulina G humana.

El título de anticuerpos IgG de los sueros se estimó mediante diluciones seriadas al doble, en PBS 1X pH 7,2-7,4 empezando desde 1:4. Se colocó 10 mL de una dilución del suero en cada 2 pocillos (antígeno y control de células normales), empleando 1 control positivo, 1 control negativo y PBS 1X por cada prueba, se incubó a 37°C

en cámara húmeda por 30 minutos, se lavó 2 veces con PBS, se agregó 10 mL de conjugado y se incubó a 37°C por 30 minutos con 2 lavados posteriores; finalmente, se hizo el montaje de las láminas con buffer glicerinado, pH 8,5.

La lectura se realizó en el microscopio de inmunofluorescencia, siendo el título del suero la dilución mayor en que se observó 1+ de fluorescencia en las células.

La reproducibilidad de los resultados de la técnica IFI-IgG, se determinó estimando el título de anticuerpos en 20 muestras de suero (elegidas de manera aleatoria), por repetición en dos tiempos diferentes, según Heck¹⁸. Se evaluó de manera paralela la estabilidad de las láminas de inmunofluorescencia conservadas a -70°C, usando láminas producidas con 6 meses de anterioridad.

ANÁLISIS DE DATOS

El análisis consistió en determinar el grado de relación lineal entre los títulos estimados por PRN e IFI-IgG, el porcentaje de respuesta positiva a la presencia de anticuerpos contra sarampión por PRN e IFI-IgG, y la reproducibilidad de PRN e IFI-IgG; para ello se recurrió al coeficiente de correlación de Pearson en sus formas bivalente y parcial (controla 3 o más variables), intervalos de confianza al 95%, y el test de Wilcoxon¹⁹. Se utilizaron los programas SPSS/PC versión 9,0 y EPIINFO versión 6,1 en el análisis estadísticos.

RESULTADOS

Los títulos de anticuerpos contra sarampión de las muestras séricas de personas vacunadas presentaron valores entre 5 - 2089 por PRN y entre 4 - 1024 por IFI-IgG; las muestras séricas de personas sin antecedente de vacunación mostraron títulos con valores entre 1 - 676 por PRN y entre 0 - 512 por IFI-IgG.

De los 3 sueros controles positivos, sólo 2 fueron positivos por IFI-IgG (Tabla 1).

Tabla 1. Títulos de anticuerpos contra sarampión de sueros controles estimados por PRN e IFI-IgG

Sueros Controles Positivos	Títulos de anticuerpos (GMT)	
	PRN	IFI-IgG
Respuesta vacunal ^a - Fase aguda	9 (+)	0 (-)
Respuesta vacunal ^a - Fase convalesciente	708 (+)	512 (+)
Infección natural ^b - Fase convalesciente	5128 (+)	4096 (+)

Los títulos de anticuerpos son expresados como la inversa de la dilución del suero.

GMT: Media geométrica de los títulos.

^a Persona con sarampión producido por respuesta a la vacunación.

^b Persona con sarampión producido por contacto con virus natural.

En la figura 1 se observa la dispersión de los títulos de anticuerpos contra sarampión de muestras séricas de personas vacunadas, estimados por PRN e IFI-IgG. El coeficiente de correlación bivalente de Pearson (r) entre

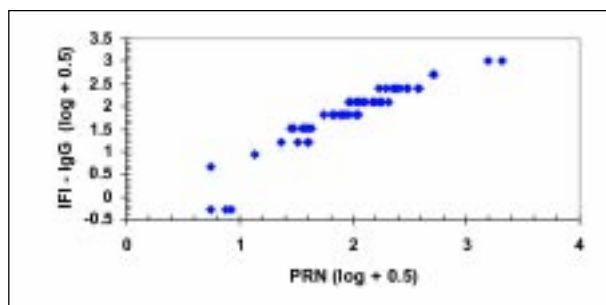


Figura 1. Dispersión de los títulos de anticuerpos contra sarampión estimados por PRN e IFI-IgG en el grupo de personas vacunadas. Los títulos son expresados en su forma log + 0.5.

los títulos estimados por ambos métodos fue significativo (r=0.941, p<0.001) así como el coeficiente de correlación parcial de Pearson (r=0.9388, p<0.001). La diferencia entre las formas bivalente y parcial no fue significativa (0.2%).

La figura 2 muestra la dispersión de los títulos de anticuerpos contra sarampión de muestras séricas de personas sin antecedente de vacunación, estimados por PRN e IFI-IgG. El coeficiente de correlación bivalente de Pearson (r) entre los títulos estimados por ambos métodos fue significativo (r=0,88, p<0,001), así como el coeficiente de correlación parcial de Pearson (r=0,8345, p<0,001). En tanto que la diferencia entre las formas bivalente y parcial no fue significativa (5,2%).

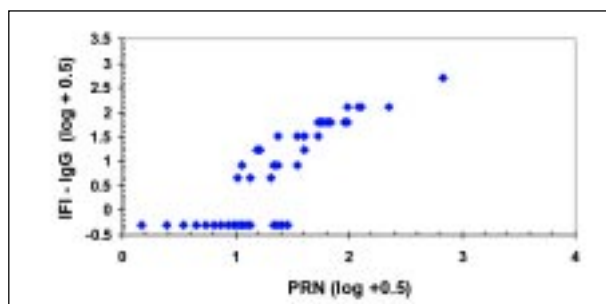


Figura 2. Dispersión de los títulos de anticuerpos contra sarampión estimados por PRN e IFI-IgG en el grupo de personas no vacunadas. Los títulos son expresados en su forma log + 0.5.

Al evaluar la presencia de anticuerpos contra sarampión con la prueba PRN fueron positivas: 95,31% (61/64) de las muestras de personas vacunadas y 71,88% (46/64) de las muestras de personas sin vacunar. Los intervalos de confianza al 95% fueron: 86,91% - 99,02% y 59,24% - 82,40% para vacunados y no vacunados, respectivamente. En el caso de la técnica IFI-IgG, fueron positivas: 93,75% (60/64) de las muestras de personas vacunadas y 40,63% (26/64) de las muestras de personas sin vacunar. Los intervalos de confianza al 95% fueron: 84,76% - 98,27% y 28.51% - 53,63% para vacunados y no vacunados, respectivamente (Figura 3).

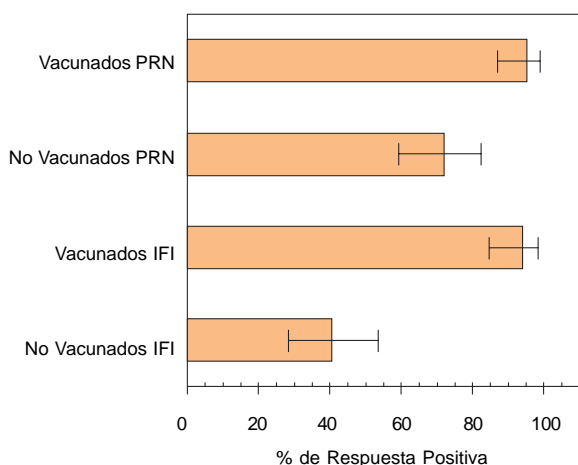


Figura 3. Porcentaje de respuesta positiva a PRN e IFI-IgG. La barra de error indica el intervalo de confianza (IC) al 95%.

En el grupo de muestras estudiadas, la técnica IFI-IgG mostró una sensibilidad de 80,4% y una especificidad de 100%. IFI-IgG no detectó títulos menores a 16 y 32, en el grupo de vacunados y no vacunados, respectivamente.

Finalmente, al evaluar la reproducibilidad, no se encontró diferencias significativas entre los títulos estimados en dos réplicas por la técnica IFI-IgG ($p=0,414$).

DISCUSIÓN

El presente estudio se desarrolló para evaluar la detección de anticuerpos IgG específicos contra sarampión por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI-IgG) estandarizada en el Instituto Nacional de Salud.

Este método es usado en diversas etiologías, y permite determinar de manera cuantitativa los niveles de anticuerpos¹⁰. Es de suma importancia para la confirmación diagnóstica de sarampión, ya que se pueden titular los anticuerpos circulantes en fase aguda y convalescente en muestras de suero²⁰. También se empleó en estudios seroepidemiológicos en la comunidad, para evaluar la inmunidad y detectar grupos de riesgo (susceptibles)²¹ a esta enfermedad y aquellos que requieren refuerzos de vacunación.

En nuestro estudio, para determinar la utilidad de la prueba IFI-IgG, se empleó la prueba de Neutralización por Reducción de Placas (PRN) por su alta sensibilidad y especificidad^{6,12,13,21}. La relación entre IFI-IgG y PRN, se determinó analizando los títulos de anticuerpos contra sarampión estimados por ambos métodos mediante el coeficiente de correlación de Pearson (r). En estudios de seroepidemiología se ha observado que los títulos varían de acuerdo a la edad^{2,22}, y los niveles de anticuerpos conferidos por la vacunación pueden decaer con el tiempo de vacunación²⁰; por lo que se determinó el coeficiente de correlación de Pearson en sus formas bivariante y parcial, esta última incluyó las variables: edad y tiempo de vacunación, pues estas podían distorsionar la rela-

ción entre los títulos de anticuerpos. Se consideraron dos grupos de muestras séricas: a) de personas con antecedente de vacunación y b) de personas sin antecedente de vacunación; los coeficientes de correlación de los títulos de anticuerpos entre IFI-IgG y PRN, fueron significativos para ambos grupos. Es importante señalar que en ambos grupos, la corrección del coeficiente de correlación con las variables edad y tiempo de vacunación no distorsionó la relación entre los títulos de anticuerpos, pues no existió diferencia significativa, siendo menores al 10%, entre los valores determinados por las formas bivariante y parcial¹⁹.

En la figura 2, se observó la dispersión de los títulos de anticuerpos de muestras de personas sin antecedente de vacunación, donde el coeficiente de correlación fue menor al de vacunados, por lo que el gráfico presentó un comportamiento diferente en los títulos bajos. Los títulos mayores o iguales a 8 fueron considerados positivos para PRN de acuerdo al CDC¹⁷. Según el estudio realizado por De Souza²¹ en inmunofluorescencia, los títulos mayores o iguales a 5 se consideraron positivos. En el presente estudio las diluciones de las muestras séricas en inmunofluorescencia iniciaron en 1:4, considerándose positivas aquellas con títulos mayores o iguales a 8 (1:8).

Con respecto a los porcentajes de respuesta positiva por PRN e IFI-IgG en personas vacunadas y no vacunadas (Figura 3), como era de esperarse, se observó mayor respuesta positiva en los vacunados, existiendo semejanza entre los intervalos de confianza de IFI-IgG y PRN; sin embargo, IFI-IgG presentó problemas para detectar títulos menores a 16. De manera contraria, los intervalos de confianza para ambos métodos en los no vacunados no tuvieron valores comunes, lo que hace suponer que ambas pruebas tienen un comportamiento diferente en este caso; asimismo, IFI-IgG no detectó eficazmente los títulos de anticuerpos menores a 32.

Por otro lado, se emplearon 3 controles positivos (IgM positivos por ELISA): dos por respuesta a la vacunación (de fase aguda y convalescente) y uno por infección natural (de fase convalescente). La tabla 1 muestra que los tres controles fueron positivos por PRN; sin embargo, sólo dos sueros (de fase convalescente) fueron positivos por IFI-IgG. La muestra de fase aguda negativa por IFI-IgG fue obtenida un día posterior al exantema, en que los niveles de anticuerpos en el suero son mínimos, especialmente las inmunoglobulinas G²⁰, observándose nuevamente que IFI-IgG no detectó los niveles bajos de anticuerpos.

La seroconversión es un incremento significativo mayor a 4 títulos entre dos muestras séricas obtenidas en fase aguda y convalescente (sueros pareados) de la enfermedad²³, dicho incremento fue evidente mediante la técnica de IFI-IgG, en los sueros pareados positivos por respuesta vacunal.

Se evaluó la utilidad de la técnica de inmunofluorescencia indirecta determinando su sensibilidad y especificidad para detectar anticuerpos IgG contra sarampión en suero humano enfrentándola con la prueba PRN sobre la base de los resultados (positivo y negativo) de las 128 muestras en estudio. La prueba PRN detecta toda clase de inmunoglobulinas específicas al virus del Sarampión⁶, por ello, es importante mencionar que las muestras en estudio presentaron resultado negativo a anticuerpos IgM