

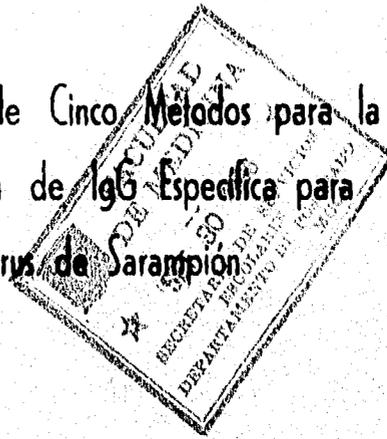
11219
2
217



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
HOSPITAL DE PEDIATRIA DEL CENTRO MEDICO NACIONAL
SIGLO XXI
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

Comparación de Cinco Métodos para la
Determinación de IgG Específica para
el Virus de Sarampión



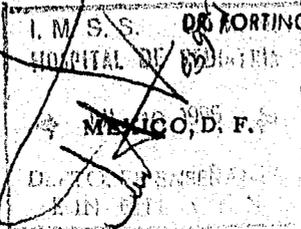
T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE
Especialización en Infectología y Ecología Médica
P R E S E N T A
Dr. José Guillermo Vázquez Rosales



IMSS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tutor. QBP María Teresa Alvarez y Muñoz
Profesor Titular del Curso:



1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

DEDICATORIA

A MARIA ANTONIETA

**CON CARINO Y AGRADECIMIENTO A MI FAMILIA , A MIS MAESTROS Y
AMIGOS: MARIA TERESA, FORTINO, HUMBERTO, LUPITA, DR. MUÑOZ Y
A MIS AMIGAS DE LOS LABORATORIOS DE VIROLOGIA Y
BACTERIOLOGIA**

CONTENIDO

	Página
ANTECEDENTES	5
JUSTIFICACION	10
OBJETIVO	10
MATERIAL Y METODOS	11
RESULTADOS	16
DISCUSION	20
BIBLIOGRAFIA	24
FIGURA 1	29
FIGURA 2	30
FIGURA 3	31
FIGURA 4	32
TABLA 1	33
TABLA 2	34
TABLA 3	35
TABLA 4	36
TABLA 5	37

COMPARACION DE CINCO METODOS PARA LA DETERMINACION DE IgG ESPECIFICA PARA EL VIRUS DEL SARAMPION

De las enfermedades exantemáticas quizá el sarampión es una de las más fácilmente reconocibles clínicamente, sin embargo la presentación de cuadros atenuados por la administración profiláctica de inmunoglobulina, la cada vez menos frecuente presentación del cuadro clínico clásico, la aparición de cuadros de panencefalitis esclerosante subaguda (PESA), así como la valoración de nuevas vacunas, esquemas y vías de administración, hacen necesario el continuar con el apoyo del laboratorio para la determinación de la respuesta inmune específica.

El agente etiológico de esta enfermedad pertenece a la familia Paramixoviridae clasificándose dentro del grupo de Morbillivirus y cuya infección da lugar a un cuadro caracterizado por la aparición de exantema maculopapular de predominio central, catarro oculonasal y conjuntivitis. Las complicaciones a nivel del árbol respiratorio, oído medio y sistema nervioso central se presentan en 18, 25 y 4 por cada 1000 casos respectivamente (1,2).

El genoma del virus del sarampión consta de seis genes diferentes que codifican para las siguientes proteínas: la proteína N (nucleoproteína), que protege el RNA viral; la proteína P (fosfoproteína) y la proteína L (proteína grande o polimerasa), éstas dos últimas están asociadas a la proteína N e intervienen probablemente en el complejo de transcripción; la proteína M (matriz), que interviene en el ensamblaje del virión; la proteína H (hemaglutinina) que media la adsorción a la célula huésped y la proteína F (fusión) que interviene en la fusión con la membrana celular y tiene actividad hemolítica (3-6).

Actualmente se han identificado otros componentes proteicos como el polipéptido C y la proteína V, codificados por el gen P y cuyas funciones no están aún bien establecidas (7).

A pesar de que las seis proteínas estructurales del virus pueden servir como antígenos e inmunógenos, son las glicoproteínas H y F quienes sirven como objetivos principales para despertar en el huésped una reacción inmune de protección. Los anticuerpos antihemaglutinina neutralizan al virus, se unen a las membranas de las células infectadas e inhiben la hemaglutinación mediada por el virus. *In vitro*, la detección de anticuerpos neutralizantes está basada principalmente en la proteína H, aunque *in vivo* la producción de anticuerpos contra la proteína F parece jugar un papel importante en la protección (8).

Derivados de la capacidad para el aislamiento del virus, han surgido diversas técnicas para la detección tanto del antígeno viral como para la determinación de la respuesta inmunológica que despierta la infección por cepas silvestres o vacunales.

Metodos de diagnóstico

Identificación del virus.

En cuanto al aislamiento viral se ha encontrado que, las líneas celulares derivadas de riñón de mono rhesus (MS) y de mono verde africano (Vero) son útiles para la propagación del virus (9-11).

Empleando éstos cultivos celulares el virus del sarampión puede ser aislado de secreciones nasofaríngeas y conjuntivales, hasta uno o dos días después de haberse iniciado el exantema y de sangre u orina por uno o dos días más; sin embargo, el aislamiento viral, técnicamente difícil, no es un método utilizado en la rutina.

En la actualidad otro método empleado para la identificación del virus del sarampión en exudados nasofaríngeos, faríngeos y en orina es la inmunofluorescencia indirecta (IFA) con anticuerpos monoclonales, técnica que ha demostrado una sensibilidad similar al aislamiento en cultivo, teniendo como ventaja la rapidez en el diagnóstico (12,13).

La determinación de anticuerpos séricos es la técnica más utilizada para el diagnóstico de enfermedad o desarrollo de inmunidad postvacunal, ésta se realiza empleando el antígeno viral completo o alguna de sus fracciones, el sistema indicador de la reacción antígeno-anticuerpo es variable y puede seleccionarse para investigar inmunoglobulinas de los tipos G, M, A, E o D.

A esta clase pertenecen las técnicas de fijación de complemento (FC), radioinmunoanálisis (RIA), inmunofluorescencia indirecta (IFA) y el ensayo inmunoenzimático (EIA). La determinación de anticuerpos contra fracciones virales específicas puede realizarse mediante la inhibición de la función de dicho componente, como serían, la proteína H (inhibición de la hemaglutinación) y la proteína F (reacción de hemólisis). Otra forma es utilizando anticuerpos monoclonales contra algunos de los componentes virales y posteriormente, un sistema indicador de la reacción antígeno-anticuerpo para alguna de las inmunoglobulinas anteriormente mencionadas (14-16).

Técnicas serológicas.

Inhibición de hemaglutinación (IH).

La prueba se basa en la capacidad de la proteína H de aglutinar eritrocitos de mono, capacidad que puede ser bloqueada (inhibida) al reaccionar este sistema con anticuerpos específicos tipo IgG contra este componente, los cuales se encuentran en el suero de pacientes o personas que hayan estado en contacto con el virus (17).

Esta técnica ha sido utilizada ampliamente, tanto para el diagnóstico de enfermedad como para la investigación del estado de inmunidad y respuesta a la vacuna, siendo la especificidad comparable en algunos de los casos con la prueba de neutralización viral, sin embargo, en otros la sensibilidad se ha reportado como menor a la obtenida por EIA. Para su realización requiere de eritrocitos de mono y para su interpretación diagnóstica son necesarias muestras pareadas (18-21).

Neutralización.

La prueba de neutralización es considerada en algunos estudios como la más sensible, pues identifica anticuerpos contra la proteína H y en menor cantidad hacia la proteína de fusión. Su presencia en el suero es evidenciada al ponerse en contacto diluciones del suero problema con una cantidad conocida de partículas virales, la falta de efecto citopático en el cultivo celular indicador es tomado como título neutralizante de los anticuerpos presentes en el suero del paciente (22,23).

La aparición de anticuerpos neutralizantes e inhibidores de la hemaglutinación esta sincronizada con la sintomatología y los máximos títulos son alcanzados en las dos semanas posteriores al exantema así como a cuatro semanas después de la vacunación, declinando estos títulos en los seis meses siguientes y permaneciendo estables posteriormente (24).

Inmunofluorescencia.

A pesar de que los anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína fueron utilizados durante los años 60s para la búsqueda de antígenos virales en células descartadas del sistema urinario y respiratorio, los trabajos de inmunofluorescencia indirecta para la determinación de anticuerpos séricos son escasos. Esta fue empleada en algunos hospitales para la determinación del estado de inmunidad contra sarampión hasta antes del surgimiento del EIA. Crener y colaboradores demostraron en 1985 una sensibilidad de 87%, con un valor predictivo positivo de 93% y negativo de 75% al ser comparada con neutralización (8). Puede utilizarse en forma directa, para observación de células corporales infectadas o bien, en forma indirecta, principalmente para valoración de anticuerpos séricos (25).

El advenimiento de métodos de amplificación como los sistemas biotina-avidina o biotina-estreptavidina, hacen pensar que pueden mejorarse dichos resultados. Ha sido variable el orden como se han manejado los componentes del sistema, en ocasiones se utilizan anticuerpos marcados con biotina y posteriormente avidina en el sistema indicador (enzima, fluoresceína, etc.), o bien en forma de complejos: inmunoglobulina-biotina y posteriormente avidina-biotina-sistema indicador. Se ha reportado que con el uso de tales sistemas se puede llegar a incrementar la sensibilidad hasta cinco veces (26-29).

Ensayo inmunoenzimático.

Desde principios de la década de los 80s. la técnica ahora denominada EIA surgió como una variante del radioinmunoanálisis. En ella se han empleado placas sensibilizadas con antígenos crudos y anticuerpos contra diferentes tipos de inmunoglobulinas como detectores (30). Su especificidad en estudios de comparación con neutralización ha sido del 100% y su sensibilidad hasta del 99% (8,19,31,32). Con el empleo de anticuerpos monoclonales, ha sido posible utilizar esta técnica para la determinación de proteínas virales específicas. En sarampión, Erdeman y cols. han demostrado que la modalidad indirecta para IgG es un mejor indicador de la inmunidad despertada por el virus y puede ser sustituto de la IH (15).

Por otra parte, la técnica de captura para IgM ha venido a resolver los problemas planteados durante el desarrollo de otros métodos, pues tiene la ventaja de eliminar los resultados falsos positivos y negativos debidos a la existencia en el suero del factor reumatoide y de anticuerpos IgG bloqueadores, proporcionando una sensibilidad y especificidad adecuadas en el diagnóstico de infección aguda por el virus del sarampión (33).

JUSTIFICACION

El sarampión es una enfermedad de distribución universal que según la OMS, produce anualmente entre la población infantil, dos millones de defunciones. En México durante los brotes de 1985, 1989 y 1990 se ha reportado un incremento hasta del 40 % en el grupo de 5 a 14 años, que han sido supuestamente inmunizados (34,35). En brotes ocurridos en población escolar de los Estados Unidos de Norteamérica, se ha encontrado que hasta el 60 % de los casos eran personas vacunadas. Este antecedente dificulta el diagnóstico clínico, por lo que es necesario conocer la respuesta inmune contra sarampión presentada por los sujetos para una mejor orientación diagnóstica.

Actualmente la técnica de EIA tiende a substituir a la de IH como método diagnóstico, pero su costo continúa siendo elevado. Otras técnicas, como las de fluorescencia tienen un menor costo y rapidez semejante pudiendo mejorarse con el uso de sistemas de amplificación como el de biotina-estreptavidina.

OBJETIVO.

El objetivo primario de este trabajo fue comparar la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo de cinco diferentes técnicas para determinación de IgG contra sarampión: inhibición de hemaglutinación (IH), inmunofluorescencia indirecta (IFA), inmunofluorescencia indirecta con biotina-estreptavidina (IFA-BS), ensayo inmunoenzimático (EIA) y neutralización de placas (NP).

Como objetivo secundario se comparó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de las mismas técnicas para realizar el diagnóstico serológico de infección natural o vacunal.

MATERIAL Y METODOS.

Material.

Se analizaron 60 sueros procedentes de: 4 casos que presentaron un cuadro exantemático clínicamente semejante a sarampión, tomándose una muestra durante el periodo exantemático y otra tres a cuatro semanas después; 9 contactos convivientes de los casos clínicos en los cuales las muestras fueron tomadas en la primera semana posterior al contacto y tres a cuatro semanas después; 17 niños vacunados que habían recibido la vacuna de sarampión Edmonston-Zagrev, tomándose la primera muestra antes de la aplicación de la misma y la segunda tres a cuatro semanas más tarde. Las muestras pareadas de suero de cada niño fueron conservadas a -20 °C hasta el momento de su análisis.

Métodos empleados.

Técnica de IH.

El método de microtitulación descrito por Sever fue empleado para evaluar los niveles de anticuerpos en suero, en este reporte la variante introducida fue trabajar con eritrocitos de mono Rhesus como lo hizo Rosen.

El suero de prueba se inactivó a 56 °C por 30 minutos, posteriormente fue adsorbido con un volumen igual (v/v) de una suspensión de eritrocitos de mono rhesus al 50% /18 horas a 10 °C. A

continuación se centrifugó a 1800 r.p.m./15 minutos, con el sobrenadante se realizó la prueba. El antígeno empleado fue la cepa Edmonston-Zagrev y como eritrocitos indicadores glóbulos rojos de mono rhesus al 0.5%. Se consideró como positiva, una muestra con un título igual o mayor de 1:8.

Técnica de IFA.

Obtención del antígeno. El virus del sarampión de la cepa Edmonston-Zagrev fue obtenido de una preparación vacunal, mediante 5 pases sucesivos en células Vero, hasta obtener un efecto citopático de cuatro cruces a las 48 hrs (Fig. 1).

Preparación de laminillas de fluorescencia. Cuando se tuvo efecto citopático cuatro cruces en los cultivos de células infectadas, se procedió a su desprendimiento por medio de Tripsina-Versenato y se mezcló una parte de células infectadas con 2 partes de células Vero no infectadas, desprendidas en forma semejante. Ambas células se habían lavado previamente mediante centrifugación por dos ocasiones con una solución salina de fosfatos (PBS) con pH de 7.2, posteriormente se procedió a depositar 20 microlitros de la mezcla en cada pozo del portaobjetos para fluorescencia. Se dejó secar a temperatura ambiente y se fijaron con acetona a 4 °C por 10 minutos, guardándose posteriormente hasta su uso a -70 °C.

Desarrollo de la prueba. Se depositaron en los pozos de las laminillas con células 10 microlitros de cada dilución del suero problema y como controles un suero positivo, un suero negativo y buffer fosfatos; las laminillas se incubaron en cámara húmeda a 37 °C por 60 minutos y se lavaron en dos ocasiones por 5 minutos en PBS pH 7.2, posteriormente se agregó el conjugado de anti-IgG humana proveniente de cabra (Innutec_R), marcado con fluoresceína e incubó a 37 °C por 30 minutos, repitiéndose el lavado con PBS por 5 minutos, se contratiñó con azul de Evans. Finalmente se realizó la valoración por observación con microscopio de epifluorescencia (Carl-Zeiss).

Técnica de Inmunofluorescencia con Biotina-Estreptavidina (IFA B/E).

Se utilizó el mismo antígeno y la preparación de laminillas de la técnica anterior. Se depositaron 10 microlitros de las diluciones del suero problema y los controles, se incubó a 37 grados °C por 60 minutos y se lavaron las laminillas en dos ocasiones por 5 minutos en PBS pH 7.2; a continuación se agregó anti IgG humana de conejo marcada con biotina (DAKOPATTS_R) e incubaron por 30 minutos a 37 °C. Las laminillas fueron lavadas nuevamente con PBS, se adicionó estreptavidina (1:50) marcada con fluoresceína (DAKOPATTS_R) y se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos, lavándose posteriormente con PBS. A cada laminilla se aplicó fluido de montaje (Gull Lab) y cubreobjetos pasándose a su observación en el microscopio de luz ultravioleta.

En ambas pruebas se consideraron como positivas las diluciones séricas que presentaron 10 ó más células por campo con material fluorescente en su membrana celular y/o citoplasma. Se consideró como valor de corte un título mayor o igual a 1:16 (Fig. 2)

Técnica de EIA (Whittaker).

Se procedió a hacer diluciones de las muestras de los sueros problema y de los controles (1:21 de acuerdo al fabricante), se depositaron en los pozos de las placas recubiertos con antígeno y se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron las placas con PBS por 5 minutos, se

agregó el conjugado (anti-IgG humana de conejo marcada con fosfatasa alcalina) y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, se lavó nuevamente con PBS y se aplicó el sustrato (fenolftaleína monofosfato) por 15 minutos, parándose la reacción con fosfato de sodio. Se evaluó el desarrollo de color (densidad óptica) mediante un espectrofotómetro.

Neutralización de la formación de placas.

Se utilizaron placas de 24 pozos de fondo plano, células Vero y virus de la cepa Edmonston-Zagreb. Los sueros fueron inactivados a 56 °C por 30 minutos, realizándose a continuación diluciones sucesivas en PBS a múltiplos de 2. Se mezclaron 100 microlitros de cada dilución sérica con 100 microlitros de una dilución viral que contenía 50 unidades formadoras de placa (UFP). La mezcla se incubó a 37 °C por una hora, colocándose posteriormente 200 microlitros de la mezcla en dos pozos recubiertos con células Vero e incubó a 37 °C por una hora, con agitación cada 10 minutos. Posteriormente la monocapa se cubrió con medio de mantenimiento (MEM 2X adicionado de suero fetal bovino al 4 %) y metil celulosa al 1.5 %, (v/v), un mililitro por pozo. Se mantuvo la incubación de las placas por 7 días a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 4 %, realizándose diariamente observaciones al microscopio de luz. Se consideró positiva la última dilución sérica en la cual existiera más del 50 % de inhibición en la formación de las placas virales del título original de la cepa. Se consideró como valor de corte una dilución mayor o igual a 1:8. Se incluyeron en cada corrimiento controles positivos y negativos del suero y de la titulación viral (Fig 3).

Análisis estadístico.

Para el objetivo primario se tomó como "n" a los 60 sueros provenientes de las muestras pareadas de los 30 niños muestreados. Para el objetivo secundario se tomó como "n" a los 30 casos dado que para el diagnóstico son necesarias muestras séricas pareadas.

Para la determinación de IgG específica de sarampión se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de cada una de las técnicas, mediante el uso de tablas tetracóricas, tomándose como estándar de oro a la técnica de neutralización de placas debido a su especificidad y a la capacidad de detectar anticuerpos contra varias porciones del virus que produzcan su inactivación.

La relación entre los resultados positivos y negativos de las técnicas anteriores fue establecida por la Prueba exacta de Fisher.

La correlación de los títulos máximos (inversa del título) entre las técnicas de IH, IFA e IFAB/S con la técnica de NP se realizó mediante la determinación de r .

Se determinó asimismo la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de cada una de ellas, para la realización del diagnóstico serológico de infección por la cepa silvestre (casos clínicos y contactos) o vacunal, tomándose nuevamente a la técnica de neutralización de placas como el estándar de oro. Se determinó la asociación existente entre IH, IFA, IFAB/S y EIA con NP, mediante la determinación de Prueba exacta de Fisher.

RESULTADOS

Determinación de IgG.

Para la determinación de anticuerpos de tipo IgG contra el virus de sarampión, se compararon todas las muestras séricas (n=60) en forma independiente por cada una de las técnicas propuestas, tomándose como estándar de oro a la técnica de NP (Cuadro No. 1).

Para la cuantificación de IgG mediante IH se tomó como valor de corte una inhibición presente a una dilución sérica igual o mayor de 1: 8, encontrándose 44/49 casos positivos, 7/11 negativos, 4 falsos positivos y 5 falsos negativos, dando una sensibilidad del 90 %, especificidad del 64 %, un VPP de 92 % y VPN de 58 %.

Por IFA se tomó como valor de corte una dilución sérica que mostrara fluorescencia mayor o igual a 1: 16 . Se obtuvieron 44/49 casos positivos, 8/11 negativos, 3 falsos positivos y 5 falsos negativos, resultando una sensibilidad de 90 %, especificidad de 73 %, VPP 94 % y VPN de 62 %.

La técnica de IFA B/E con el mismo valor de corte anterior mostró una sensibilidad de 86 % con 42/49 casos positivos, especificidad del 91 % con 10/11 casos negativos, VPP 98 % con 1 falso positivo y VPN de 53 % con 7 falsos negativos.

Cuando los sueros fueron analizados por la técnica de EIA se utilizó el valor de corte dado por la DO mostrada por el suero control, obteniéndose 37/49 casos positivos con una sensibilidad de 75%, una especificidad de 100 % con 11/11 casos negativos, VPP de 100 % con 0 casos falsos positivos y VPN de 48 % con 12 falsos negativos.

Con el objeto de determinar si la modificación del valor de corte podía incrementar la sensibilidad sin disminuir la especificidad, se realizaron curvas ROC para cada una de las técnicas (Fig. 4).

Con IH, se disminuyó el valor de corte a una dilución de 1:4 y posteriormente se incrementó a 1:16

Para IFA e IFA/BE se disminuyó inicialmente a 1:8 y se incrementó a 1:32.

Para IH con valor de corte de 1:4 se obtuvo una sensibilidad de 94 %, especificidad de 37%, VPP 87 %, VPN de 57 %. Con el valor de corte de 1:16 se obtuvieron 80 %, 73 %, 93 % y 45 % respectivamente (Tablas No. 2 y 3).

Al disminuir el valor de corte a 1:8 con IFA se obtuvo una sensibilidad de 90 %, especificidad de 73 %, VPP de 94 % y VPN 62 %. Al aumentar el valor de corte a 1:32 los valores fueron los siguientes: 73 %, 82%, 95 % y 41 %.

La técnica de IFA B/E con valor de corte 1:8 proporcionó una sensibilidad de 90 %, especificidad de 91 %, VPP 98 % y VPN 67 %. Al incrementarse el mismo, la sensibilidad disminuyó a 78 %, la especificidad y el VPP se incrementaron a 100 % y el VPN disminuyó a 50 %.

Con la técnica de EIA la disminución del valor de corte fue realizado en base al cálculo de la disminución en densidad óptica que presenta una dilución al doble del suero control y que según la validación del equipo es de 1.47 aproximadamente (Densidad óptica del control/1.47). Para una disminución del valor de corte con dilución del control calculada de 1:32 se encontró sensibilidad de 86 %, especificidad de 100 %, VPP 100 % y VPN 61 %. Para incremento del valor de corte con dilución calculada de 1:16 (Densidad óptica del control x 1.47) se reportó una sensibilidad de 65 %, especificidad de 100 %, VPP 100 % y VPN 61 %.

Analizando en forma individual cada uno de los sueros y comparando entre si cada una de las técnicas mencionadas, se encontraron diferentes grados de concordancia, medidos por la fórmula de exactitud $(a+c/a+b+c+d)$. Los mayores grados de exactitud se encontraron entre NP e IFA B/E

(con valor de corte 1:8) con un 90 %, NP y EIA (con valor de corte 1:32) con 88 %, EIA-IFA/BE (valor de corte 1:16), NP IFA (valor de corte 1:16), NP IFABS (valor de corte de 1:16) y NP IFA (valor de corte 1:8), todas con un 87 % de exactitud (Tabla No. 4).

La mejor asociación encontrada mediante la prueba de Chi cuadrada fué entre NP e IFAB/S (con valor de corte de 1:8) con $p = 0.000002$, posteriormente NP e IFAB/S (valor de corete 1:16) con $p = 0.000002$ y para NP e IFA con $p = 0.00006$.

La correlación existente entre los títulos máximos de cada suero dados por las técnicas de IH, IFA e IFAB/E y el estandar de oro fué obtenido por el índice de correlación r , siendo la mejor la existente entre NP e IFAB/S ($r = 0.5422$), posteriormente NP e IH ($r = 0.4748$) y NP e IFA ($r = 0.4629$).

Capacidad de diagnóstico.

Para determinar la capacidad de diagnóstico serológico de infección por virus del sarampión de cada una de las técnicas, se analizaron en forma pareada los sueros de cada uno de los 30 sujetos muestreados y se compararon con el diagnóstico dado por la prueba de NP (Tabla No 5).

Los criterios para considerar diagnóstico de infección por sarampión en sujetos con cuadro clínico y contactos así como el de respuesta a la vacuna, fue el de seroconversión o incremento en 4 veces el título inicial de anticuerpos específicos, exceptuando en EIA donde una razón mayor de 1.47 entre la densidad óptica de la segunda sobre la primera muestra fue tomada como respuesta.

Con la prueba de NP, el diagnóstico serológico fue realizado en los cuatro sujetos con cuadro clínico, de los sujetos vacunados, 6/17 mostraron seroconversión, 8/17 incremento en sus títulos en forma significativa y 3/17 no mostraron respuesta. De los sujetos en contacto con casos clínicos,

3/9 tres seroconvirtieron, 4/9 incrementaron sus títulos y 2 no mostraron modificaciones en sus títulos.

Mediante la técnica de HI el diagnóstico serológico fue confirmado por elevación de los títulos en cuatro veces el inicial en 24/25, con una sensibilidad de 96 %, la especificidad fue de 20 % con 1/5 sujetos encontrado como negativo. Se encontraron 4 falsos positivos con un VPP 86 % y un falso negativo con VPN de 50%.

Por IFA 22/25 de los sujetos mostraron incremento en sus títulos mayor a cuatro veces el título inicial, 3/5 se encontraron como negativos para el diagnóstico serológico, dando una sensibilidad de 88 % y especificidad de 60 %. 2 sujetos fueron encontrados como falsos positivos y 3 como falsos negativos dando un VPP de 92 % y VPN de 50 %.

La técnica de IFA B/E mostró que 21/25 de los sujetos mostraron seroconversión o incremento significativo en sus títulos, con una sensibilidad de 84 %, 3/5 fueron encontrados sin respuesta con especificidad de 60 %. El VPP fue de 91 % y el VPN de 43 % con 2 falsos positivos y 4 falsos negativos reportados por dicha técnica. Dado que IFA B/E con valor de corte de 1:8 fue encontrada como la técnica de mayor exactitud (90 %) en el análisis anterior, se procedió a determinar sus características para diagnóstico serológico, encontrándose sensibilidad de 85%, especificidad de 60 %, VPP 96 % y VPN de 43 %.

Por EIA 23/25 sujetos fueron encontrados positivos, con sensibilidad para el diagnóstico serológico de 92 %, la especificidad así como el VPP fueron de 100 % y el VPN de 71 % con 2 sujetos reportados como falsos negativos.

- Al establecerse la correlación mediante la prueba de Chi cuadrada, entre los diagnósticos obtenidos por NP y cada una de las otras pruebas, la asociación más fuerte fue encontrada entre NP y EIA ($p = 0.0004$), seguida por NP e IFA ($p = 0.06$), NP e IFAB/S ($p = 0.12$) y NP e IH ($p = 0.74$).

DISCUSION

Desde el advenimiento de los cultivos celulares en los años 50s, el diagnóstico de las enfermedades virales ha sido posible en forma más certera, ya que de ellos se ha derivado el estudio de las partículas virales, su estructura, composición química, características físicas y propiedades de cada uno de sus componentes.

- De estos conocimientos han surgido técnicas de laboratorio capaces de detectar partículas virales en sujetos enfermos o bien capaces de identificar una respuesta inmune específica presentada por los mismos.

Una de las primeras técnicas utilizadas para la identificación de la respuesta inmune contra sarampión, fue la de IH, la cual se tuvo durante casi dos décadas, como el estandar de oro. Sin embargo su sensibilidad ha variado conforme han surgido nuevas formas de evaluación. En nuestro estudio, probablemente la alta sensibilidad (90 %) presentada por esta técnica fue debida al sesgo inicial de selección de los sueros, ya que el diagnóstico fue confirmado por dicha técnica.

Algunos autores como Boteler y colaboradores (30) la han encontrado como poco sensible, ya que ésta identifica exclusivamente anticuerpos hemaglutinantes, mientras inmunofluorescencia, EIA y neutralización incluyen probablemente anticuerpos contra diversos antígenos del sarampión como los fijadores de complemento, además la existencia en el suero de aglutininas inespecíficas que no fueran depuradas completamente durante el procesamiento del suero y que pudieron dar lugar a un decremento en la especificidad (64 %). Al disminuirse el valor de corte, la sensibilidad se

incrementa ligeramente pero la especificidad baja en forma notable (hasta el 37 %), por el contrario al incrementar el mismo, la sensibilidad disminuye 10 % pero la especificidad se eleva en 9 %, lo que indica que el valor de corte de mayor o igual a 1:8 es en el cual se equilibran las dos mediciones, adquiriendo con este valor una exactitud del 85 %.

La técnica de IFA mostró una sensibilidad similar a IH, con una leve mejoría en la especificidad sin embargo ésta continúa siendo poco satisfactoria lo cual puede deberse a la unión inespecífica de inmunoglobulinas, tanto las presentes en el suero de los pacientes como de suero de cabra, de la cual se deriva el conjugado. Dicha especificidad mejoró con el incremento en el valor de corte, pero la sensibilidad disminuyó notablemente. Al reducir el valor de corte no existieron modificaciones a la sensibilidad y especificidad, por lo que el valor adecuado puede variar entre mayor o igual a 1:8 o a 1:16, conservándose una exactitud de 87 % en nuestro trabajo.

Con la introducción de un sistema de amplificación (biotina-estreptavidina) era esperado un incremento en la sensibilidad con la técnica de IFA B/E, sin embargo, dicho parámetro fue ligeramente inferior a la presentada por IFA (86 %), mejorando al reducir el valor de corte (90 %). La especificidad lograda con esta técnica fue mejor que con las dos anteriores quizá debido al uso de dos proteínas con alta afinidad, como son la biotina y la estreptavidina, manteniéndose en 91 % aún con la disminución en el valor de corte. La exactitud lograda con la modificación de este parámetro a igual o mayor 1:8 fue la más alta, alcanzando un 90 %, por lo que el uso de dicho nivel de corte es considerado como el más apropiado.

Indudablemente, la prueba más específica resultó ser la técnica de EIA, manteniéndose sin variar en el 100 % a pesar de las modificaciones en el valor de corte, sin embargo en nuestro estudio mostró ser poco sensible, en oposición a lo reportado por Weigle (32) y colaboradores, quienes la encontraron más sensible que IH en muestras con bajos títulos, esto quizá es debido a que títulos moderadamente altos están presentes en los sueros de control positivo que elevan los valores de corte, ya que al disminuir el mismo a una densidad óptica correspondiente a una dilución aproximada del doble, se incrementó la sensibilidad al 86 %, manteniéndose sin modificaciones la

especificidad. De continuar con el decremento del valor de corte puede mantenerse el incremento en la sensibilidad sin variación importante de la especificidad, por lo que quizá sea conveniente mejorar el cálculo de dichos valores mediante la dilución adecuada de los sueros controles.

En cuanto al diagnóstico serológico realizado en base al incremento en los títulos de anticuerpos específicos, la técnica de IH mostró un VPP de 86 % que fué el menor de las cuatro técnicas comparadas, aún a pesar de que su sensibilidad fue la mejor con 96 %.

Para el diagnóstico serológico, las técnicas de IFA e IFA B/E mostraron valores muy semejantes en cuanto a sensibilidad, especificidad, VPP y VPN, los cuales fueron intermedios entre los obtenidos por IH y EIA.

El método de EIA mostró una sensibilidad para el diagnóstico serológico del 92 %, y una especificidad del 100 %, siendo sus VPP y VPN mayores que los encontrados en las otras técnicas empleadas, lo cual está de acuerdo con lo reportado por Boteler y colaboradores al compararla con IH (30). A pesar de la baja sensibilidad presentada en la detección de IgG específica para sarampión, tuvo sin embargo la mayor sensibilidad para la confirmación del diagnóstico; esta aparente incongruencia es probablemente debida a que la investigación inicial se realizó en las muestras séricas de fase aguda donde la cantidad de anticuerpos es baja, mientras que en las muestras de fase de convalecencia la mayoría fueron positivas, realizándose así el diagnóstico de seroconversión. Esta prueba tiene además la ventaja de su alta especificidad (100 %), alto VPP (100 %) y el mejor VPN (71 %) comparada con el resto de las técnicas. En otros trabajos como el de Erdman y colaboradores (15), donde se compara EIA y neutralización, la mejor correlación entre estos parámetros fue encontrada al calcular un valor de corte para EIA a partir de la suma de la media de la densidad óptica de los sueros negativos más tres desviaciones estándar, siendo su sensibilidad de 87 % y especificidad de 97 %.

El tiempo de empleado y el costo son determinantes en la selección de una prueba diagnóstica, siendo evidente que EIA es la prueba con mayor especificidad y cuya sensibilidad puede mejorarse con la selección adecuada de sus controles, además de que puede utilizarse para el análisis de

grandes volúmenes de muestras, sin embargo su costo continúa siendo elevado. Nuestro estudio demuestra que la técnica de IFA B/E tiene una capacidad de identificación de IgG específica y de diagnóstico muy similar a EIA y a NP, su costo es menor que el de EIA y puede utilizarse en el diagnóstico de pequeños brotes o de casos aislados.

BIBLIOGRAFIA.

1. Norrby E, Oxman M. Measles Virus, en Fields B.N., Knipe D. *Virology*. Second edition, Raven Press, New York 1990: 1013-1044.
2. Kumate J, Muñoz O, Gutierrez G, Santos J. *Manual de Infectología*. Decimocuarta edición, F. Mendez Cervantes, Mexico D.F. 1990: Cap. 29 387-400.
3. Tyrrel D, Norrby E. Structural polypeptides of measles virus. *J Gen Virol* 1978;39:219-229.
4. Alkhatib G, Briedis D. The predicted primary structure of the measles virus hemagglutinin. *Virology* 1986;150:479-490.
5. Birrer M, Bloom B, Udem S. Characterization of measles polypeptides by monoclonal antibodies. *Virology* 1981;108:381-390.
6. Doeling P, Blumer B, Menonna J, Adamus J, Cook P, Crowley J, Kolakofsky D, Cool S. Transcriptional map of the measles virus genome. *J Gen Virol* 1986;67:1987-1992.
7. Wardrop E, Briedis D. Characterization of V protein in measles virus infected cells. *J Virol* 1991;65:3421-3428.
8. Cremer N, Cossen C, Shell G, Diggs J, Gallo D, Schmidt N. Enzyme immunoassay versus plaque neutralization and other methods for determination of immune status to measles and varicella-zoster viruses and versus complement fixation for serodiagnosis of infections with those viruses. *J Clin Microbiol* 1985;21:869-874.

9. Matunoto M. Multiplication of measles virus in cell cultures. *Bact Rev* 1966;30:152-176.
- 10. Cabasso V, Lfrickey P. Adaptation of measles virus to the chorio-allantoic membrane of chicken embryos in ovo. *Nature* 1966;210:1233-1235.
11. Peebles T, McCarthy K, Ender J, Holloway A. Behavior of monkeys after inoculation of virus derived from patients with measles and propagated in tissue culture together with observations on spontaneous infections of these animals by an agent exhibiting similar antigenic properties. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956;78:63-74.
12. Llanes -Rodas R, Liu C. Rapid diagnosis of measles from urinary sediments stained with fluorescent antibody. *N Engl J Med* 1966;275:516-523.
- 13. Minnich L, Goodenough F, Ray G. Use of immunofluorescence to identify measles virus infections. *J Clin Microbiol* 1991;29:1148-1150.
14. Norrby E. Paramyxoviridae: Measles virus en Lennette E, Halonen P, Murphy F. *Laboratory diagnosis of infectious diseases principles and practice*. Springer Verlag, New York 1988. 525-539.
15. Erdeman D, Anderson L, Adams R, Stewart J, Markowits L, Bellini W. Evaluation of monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassays for detection of specific antibodies to measles virus. *J Clin Microbiol* 1991;29:1466-1471.

16. Rossier E, Miller H, McCulloch B, Sullivan L, Ward K. Comparison of immunofluorescence and enzyme immunoassay for detection of measles-specific immunoglobulin M antibody. *J Clin Microbiol* 1991;29:1069-1071.

17. Norby E. Hemagglutination by measles virus. 4. A simple procedure for production of high potency antigen for hemagglutination inhibition (HI) test. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962;111:814-818.

18. Giraudon P, Wild F. Correlation between epitopes on hemagglutinin of measles virus and biological activities: Passive protection by monoclonal antibodies is related to their hemagglutination inhibiting activity. *Virology* 1985;144:46-58.

19. Neumann P, Weber J, Jessamine A, Oshaughnessy M. Comparison of measles antihemolysin test, enzyme-linked immunosorbent assay, and hemagglutination inhibition test with neutralization test for determination of immune status. *J Clin Microbiol* 1985;22:296-298.

20. Kalter S, Heberling R, Barry J. Detection and titration of measles virus antibody by hemagglutination inhibition and by dot immunobinding. *J Clin Microbiol* 1991;29:202-204.

21. Nakano J, Miller D, Foster S, Brink E. Microtiter determination of measles hemagglutination inhibition antibody with filter papers. *J Clin Microbiol* 1983;17:860-863.

22. Strauss J, Zdravilek J. A more rapid method of measles neutralization test with simultaneous cell inoculation. *J Hyg Epidem Microbiol Immunol* 1968;12:47-54.

23. Cutchins E. A comparison of the hemagglutination inhibition, neutralization and complement fixations test in the assay of antibody to measles. *J Immunol* 1968;12:47-54.
24. Black F, Berman L. Measles and Mumps, en Rose N, Friedman H, Fabey J. Manual of clinical laboratory Immunology. Thirth edition. American Society of Microbiology. Washington D.C. 1968.
25. White D, Fenner F. Laboratory diagnosis of viral Diseases, en White D, Fenner F. Medical Virology. Thirth edition. Academic Press Inc. London 1989:325-361.
26. Hsu S, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin peroxidasa complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC an unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577-580.
27. Yolken R, Leister F, Whitecomb L, Santosham M. Enzyme immunoassays for the detection of bacterial antigens utilizing biotin-labeled antibody and peroxidase biotin-avidin complex. *J Immunol Meth* 1983;56:319-327.
28. Berman J, Basch R. Amplification of the biotin-avidin immunofluorescence technique. *J Immunol Meth* 1980;36:335-338.
29. Settergren B, Juto P, Wadell G. Detection of specific seritin immunoglobulin M in nephropathia epidemica (scandinavian epidemic nephropathy) by a biotin-avidin-amplified immunofluorescence method. *J Clin Microbiol* 1987;25:1134-1136.

30. Boteler W, Luipersbeck P, Fuccillo D, O'beirne A. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of measles antibody. *J Clin Microbiol* 1983;17:814-818.

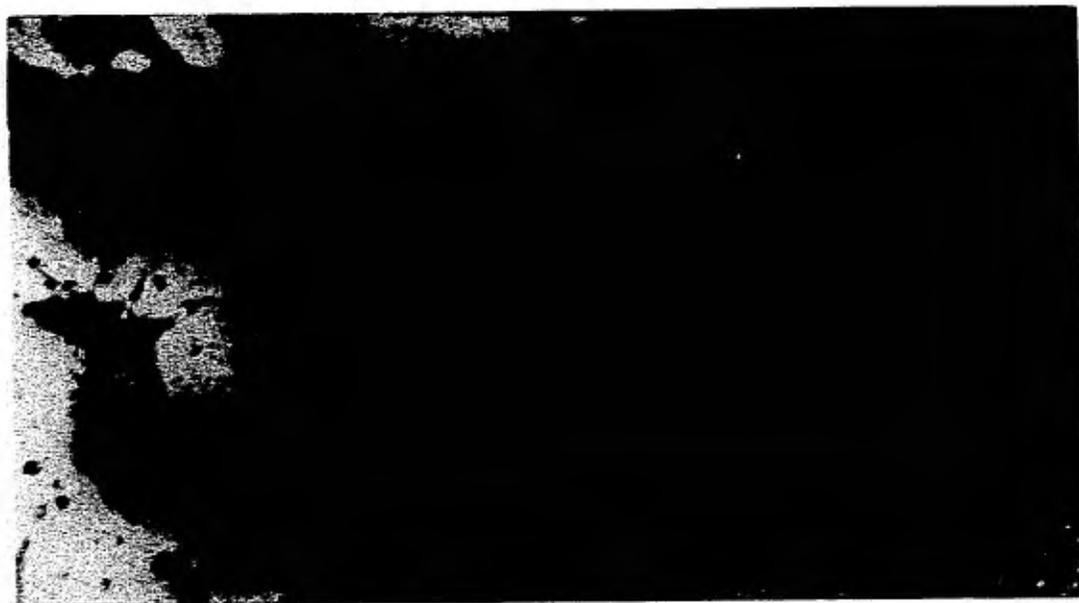
31. Rice G, Casali P, Oldstone M. A new solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for specific antibodies to measles virus. *J Infect Dis* 1983;147:1055-1059.

32. Wigle K, Murphy M, Brunell P. Enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation of immunity to measles virus. *J Clin Microbiol* 1984;19:376-379.

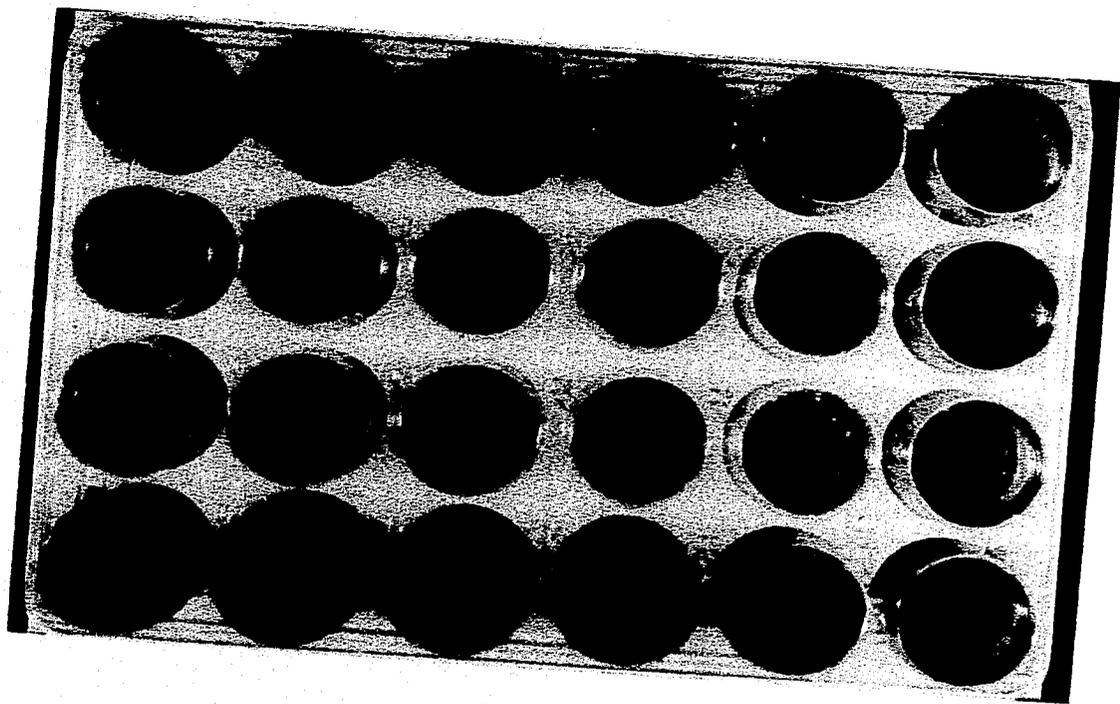
33. Forghiani B, Myoraky C, Schmidt N. Use of monoclonal antibodies to human immunoglobulin m in capture assays for measles and rubella immunoglobulin M. *J Clin Microbiol* 1983;18:652-657.

34. Velazquez O, Alvarez C, Lezana M, Avila C. Panorama epidemiológico del sarampión en México: situación actual y perspectivas. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1990;47:462-473.

35. Diaz J, Valdespino J, Zárate M, Camacho M, Gonzalez M, Chávez R. Consideraciones inmuno-epidemiológicas en la prevención del sarampión en México. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1990;47:474-481.

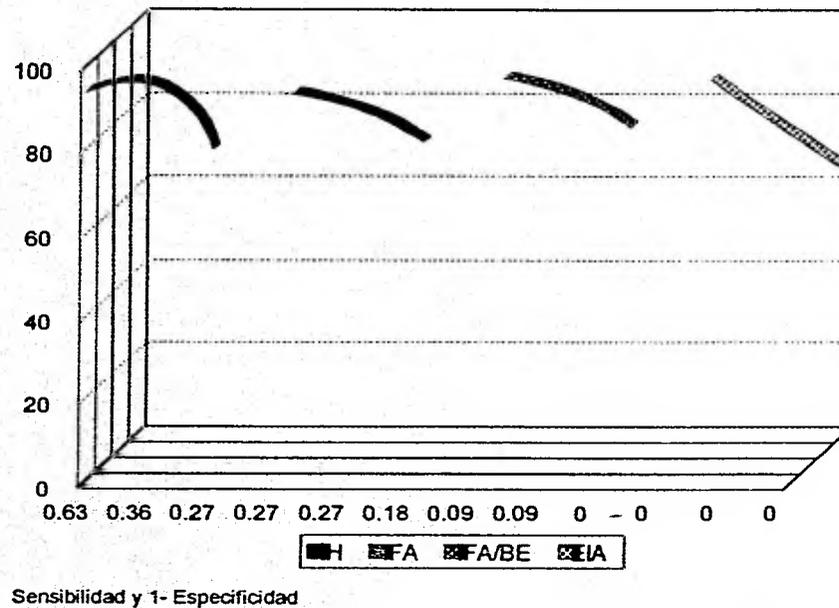


**IGURA No 1. EFECTO CITOPATICO DEL VIRUS DE SARAMPION EN CULTIVO DE
CELULAS VERO.**



**FIGURA 3. TECNICA DE NEUTRALIZACION DE LA FORMACION DE PLACAS.
UTILIZACION DE LA CEPA EDMONSTON -ZAGREV CON CELULAS VERO.**

Fig. 4. Curvas ROC de cuatro técnicas de diagnóstico para sarampión.



Técnica/Diagnóstico	Positivos	Negativos	Falsos positivos	Falsos negativos
HI	44/(49)*	7/(11)	4	5
Medición	Sensibilidad 90 %	Especificidad 64 %	VPP 92 %	VPN 58 %
IFA	44/(49)	8/(11)	3	5
Medición	Sensibilidad 90 %	Especificidad 73 %	VPP 94 %	VPN 62 %
IFAB/E	42/(49)	10/(11)	1	7
Medición	Sensibilidad 86 %	Especificidad 91 %	VPP 98 %	VPN 59 %
EIA	37/(49)	11/(11)	0	12
Medición	Sensibilidad 75 %	Especificidad 100 %	VPP 100 %	VPN 48 %

Tabla 1. Determinación de IgG específica para sarampión, mediante cinco técnicas de diagnóstico en 60 sueros.

* () determinados mediante la técnica de NP.

Técnica /Diagnóstico	Positivos	Negativos	Falsos positivos	Falsos negativos
IH	46/(49)*	4/(11)	7	3
Medición	Sensibilidad 94 %	Especificidad 37 %	VPP 87 %	VPN 57 %
IFA	44/(49)	8/(11)	3	5
Medición	Sensibilidad 90 %	Especificidad 73 %	VPP 94 %	VPN 62 %
IFA BE	44/(49)	10/(11)	1	5
Medición	Sensibilidad 90 %	Especificidad 91 %	VPP 98 %	VPN 67 %
EIA	42/(49)	11/(11)	0	7
Medición	Sensibilidad 86 %	Especificidad 100 %	VPP 100 %	VPN 61 %

Tabla 2. Determinación de IgG específica para sarampión, mediante cinco técnicas de diagnóstico en 60 sueros. Disminución del valor de corte en una dilución en las técnicas de IH, IFA, IFA/BE y EIA.

*() determinados mediante la técnica de NP.

Técnica/Diagnóstico	Positivos	Negativos	Falsos positivos	Falsos negativos
IH	39/(49)*	8/(11)	3	10
Medición	Sensibilidad 80 %	Especificidad 73 %	VPP 93 %	VPN 45 %
IFA	36/(49)	9/(11)	2	13
Medición	Sensibilidad 73 %	Especificidad 82%	VPP 95 %	VPN 41 %
IFA B/E	38/(49)	11/(11)	0	11
Medición	Sensibilidad 78 %	Especificidad 100 %	VPP100 %	VPN 50 %
EIA	32/(49)	11/(11)	0	17
Medición	Sensibilidad 65 %	Especificidad 100 %	VPP 100 %	VPN 61 %

Tabla 3. Determinación de IgG específica para Sarampión, mediante cinco técnicas diagnósticas en 60 sueros. Valor de corte incrementado en una dilución para las técnicas de IH, IFA, IFA B/E y EIA.

* () determinadas como positivas por NP.

Pruebas	Porcentaje de exactitud
IH-EIA	75 %
IH-IFA	88 %
IH-IFA B/S	78 %
EIA-IFA	77 %
EIA-IFA B/S	87 %
IFA-IFA B/S	80 %
IH-NP	85 %
IFA-NP	87 %
IFA B/S-NP	87 %
EIA-NP	80 %
NP-IH*	82 %
NP-IFA B/S*	90 %
NP-IFA*	87 %
NP-EIA*	88 %

Tabla 4. Porcentaje de exactitud encontrado al comparar la determinación de IgG para sarampión en 60 sueros, comparando dos técnicas a la vez.

*IH, IFA, IFA B/S y EIA con disminución del valor de corte.

Tecnica	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
IH	96 %	20 %	86 %	50 %
IFA	88 %	60 %	92 %	50 %
IFA B/E	84 %	60 %	91 %	43 %
EIA	92 %	100 %	100 %	71 %

Tabla 5. Características de cuatro pruebas para determinación del diagnóstico serológico de sarampión, tomando como estándar de oro a la prueba de NP.