

Comparación de los procedimientos serológicos de los laboratorios del Plan para la Eliminación del Sarampión en el diagnóstico de exantemas víricos

Fernando de Ory^a, Juan Carlos Sanz^b, Juan Emilio Echevarría^a, María del Mar Mosquera^a, María Eulalia Guisasola^a y Red de Laboratorios Autonómicos para el Plan de Eliminación del Sarampión^{*}

^aCentro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. ^bLaboratorio de Salud Pública. Instituto de Salud Pública de la Comunidad de Madrid. España.

OBJETIVO. Comparar los métodos serológicos empleados por los laboratorios de la Red del Plan de Eliminación del Sarampión para el diagnóstico de la infección por virus del sarampión, y para el diagnóstico diferencial con otras enfermedades exantemáticas.

MATERIALES Y MÉTODOS. Se ha establecido un panel de 20 muestras de suero de casos de enfermedad exantémática (sarampión [12], rubéola [4], parvovirus B19 [2] y dengue [2]), diagnosticados por detección de inmunoglobulina M (IgM) específica. El panel se ha enviado a los laboratorios de la Red.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN. Se han recibido respuestas de 20 laboratorios para IgM frente a sarampión, 19 realizadas por enzimoinmunoanálisis (ELISA) y una por inmunofluorescencia indirecta (IFI). La concordancia con el laboratorio de referencia ha sido del 91,5%. Para IgM de rubéola se han recibido respuestas de seis laboratorios (todas obtenidas por ELISA) con una concordancia del 98,7%. Para IgM de parvovirus B19 se ha recibido respuesta de 10 laboratorios (ocho realizaron ELISA y dos IFI), con una concordancia del 94,6%. Ningún laboratorio realizó diagnóstico de dengue.

CONCLUSIÓN. Algunos de los laboratorios de la Red deberían revisar los métodos empleados para el diagnóstico de sarampión. Por otra parte, se considera necesaria la existencia de un laboratorio de referencia que sirva de apoyo para la confirmación de resultados, así como para el diagnóstico de otros agentes exantemáticos, cuando los antecedentes epidemiológicos así lo requieran.

Palabras clave: Sarampión. IgM específica. ELISA. IFI.

Comparison of serological procedures used for the diagnosis of viral exanthema in laboratories participating in the measles elimination plan

OBJECTIVE. The comparison of serological methods used by the laboratories participating in the Network for the Elimination of measles to diagnose measles virus infection as well as differential diagnosis with other exanthematic diseases are compared.

MATERIALS AND METHODS. One panel of 20 serum samples including measles (12), rubella (4), parvovirus B19 (2) and dengue (2) infections was established. All cases were diagnosed by detection of specific IgM. The panel was sent to the laboratories of the Network. The results were compared with those obtained at the reference laboratory.

RESULTS AND DISCUSSION. Regarding measles, IgM response from 20 laboratories (19 by ELISA and 1 by indirect immunofluorescence) was obtained, with an agreement of 91.5%. Related to rubella IgM, replay from 6 laboratories, using ELISA, was received, with an agreement of 98.7%. With respect to parvovirus B19 IgM, response from 10 laboratories (8 by ELISA and 2 by indirect immunofluorescence) was obtained, with an agreement of 94.6%. Results about dengue virus were not reported by any laboratory.

CONCLUSION. Some laboratories from the network should review the methods used for the diagnosis of measles and other exanthematic diseases. The results reassert the need for a reference laboratory to support confirmation of the results.

Key words: Measles. Specific IgM. ELISA. IIF.

Introducción

En 1998, la Asamblea Mundial de la Salud estableció el objetivo de la eliminación del sarampión indígena de la Región Europea en 2007, para poder certificar su eliminación antes de 2010¹. Con este propósito, en 2001 se puso en marcha en España el Plan de Eliminación del Sarampión², entre cuyos objetivos se incluye la confirmación por el laboratorio de los casos sospechosos, que permita la identificación de brotes y la detección de la circulación del virus.

Correspondencia: Dr. F. de Ory.
Servicio de Microbiología Diagnóstica.
Centro Nacional de Microbiología.
Instituto de Salud Carlos III.
Ctra. Majadahonda, s/n.
28220 Majadahonda. Madrid. España.
Correo electrónico: fory@isciii.es

Manuscrito recibido el 12-6-2003; aceptado el 28-11-2003.

*Al final del artículo se ofrece la relación de los Componentes de la Red de Laboratorios Autonómicos para el Plan de Eliminación del Sarampión.

De acuerdo con los criterios del Plan, se clasifican como casos sospechosos de sarampión los casos de exantema maculopapular con fiebre alta, y que además cursan con al menos uno de los siguientes síntomas: tos, coriza y conjuntivitis². La confirmación de casos de sarampión se realiza mediante la detección de inmunoglobulina M (IgM) específica frente al virus, aproximación que permite realizar el diagnóstico de forma rápida en una sola muestra de suero, tomada entre 3 días y 4 semanas del comienzo de la enfermedad³. Existen diversos métodos para realizar la detección de IgM antisarampión, fundamentalmente de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y de enzimoinmunoanálisis (ELISA). Por razones prácticas, básicamente por la objetividad que proporciona en la interpretación de resultados, esta última técnica es la más ampliamente empleada. Aunque existen dos aproximaciones metodológicas diferentes, ELISA indirecto y ELISA de captura, en la actualidad los más utilizados son los métodos indirectos, algunos de los cuales han mostrado buenas características de funcionamiento^{4,5}. Por otra parte, es igualmente importante el diagnóstico diferencial del sarampión con otras enfermedades exantemáticas, fundamentalmente rubéola y parvovirus B19 (PVB19), cuyo diagnóstico se realiza de forma eficaz mediante técnicas de ELISA^{6,7}.

En España existe la Red de Laboratorios Autonómicos del Plan de Eliminación del Sarampión, para el diagnóstico e identificación de casos de sarampión, y para el diagnóstico diferencial con otras enfermedades exantemáticas. En lo que se refiere al diagnóstico serológico, 14 Comunidades Autónomas (Aragón, Asturias, Baleares, Canarias, Cantabria, Castilla y León, Cataluña, Comunidad Valenciana, Extremadura, Galicia, La Rioja, Madrid, Murcia y País Vasco), así como Melilla, tienen laboratorios designados, dos en el caso de Aragón y seis en la Comunidad Valenciana. Tres Comunidades Autónomas (Andalucía, Castilla-La Mancha y Navarra), así como Ceuta, no tienen designado laboratorio; esta función se realiza en el Centro Nacional de Microbiología (CNM) del Instituto de Salud Carlos III. El objetivo del presente estudio ha sido comparar los métodos para diagnóstico de sarampión y otras enfermedades exantemáticas empleados por los laboratorios de la Red de Laboratorios Autonómicos del Plan de Eliminación del Sarampión.

Métodos

Con el objetivo de comparar el rendimiento de los procedimientos que emplean los laboratorios para el diagnóstico de sarampión y el diagnóstico diferencial con otras enfermedades exantemáticas, se ha establecido un panel de 20 muestras de suero de casos de enfermedad exantemática, incluyendo casos de sarampión ($n = 12$), rubéola ($n = 4$), PVB19 ($n = 2$) y dengue ($n = 2$). Una muestra de sarampión también mostraba reactividad IgM frente a PVB19. Diecisésis muestras mostraban IgG frente a sarampión, 15 frente a rubéola y 10 frente a PVB19.

Las muestras que componen el panel proceden de casos de enfermedad exantemática diagnosticados en el CNM, por detección de IgM específica. La IgM frente a sarampión y frente a rubéola se determinó por ELISA indirecto (Enzygnost, Dade Behring); y la presencia de IgM frente a PVB19 y frente a virus dengue por ELISA de captura (respectivamente Biotrin, Irlanda, y PanBio, Australia). Las determinaciones de IgG frente a sarampión, rubéola y PVB19 se han realizado por ELISA indirecto (Enzygnost, Dade Behring para sarampión y rubéola y Biotrin para PVB19). Cada alícuota consistió en 100 μ l, dis-

tribuyéndose a los laboratorios de las Comunidades Autónomas antes citadas y a Melilla.

Resultados y discusión

Se ha obtenido respuesta de laboratorios de todas las Comunidades Autónomas excepto de las de La Rioja y Melilla. Dado que en Aragón hay dos laboratorios, y en la Comunidad Valenciana seis, se han recibido resultados de 19 laboratorios. En todos los casos, los resultados equívocos obtenidos en los laboratorios participantes se han considerado discrepantes.

Todos los laboratorios participantes determinaron IgM frente a sarampión. Uno de ellos procesó las muestras con dos ensayos, habiéndose por tanto recibido 20 respuestas. Un laboratorio realizó IFI (Stellar), el resto realizaron determinaciones por ELISA indirecto (Dade Behring [5]; Vircell [4]; Virotech [2], Panbio [1], Virion [1] y Diasorin [1]). Dos laboratorios procesaron sólo 19 muestras; por tanto, se ha recibido un total de 398 resultados. Los resultados se han comparado con los obtenidos en el CNM, que ha actuado como Laboratorio de Referencia.

El 91,5% de los resultados recibidos concuerdan con los del Laboratorio de Referencia. Los 10 laboratorios que emplean el método de Dade-Behring, el mismo que se ha empleado en el Laboratorio de Referencia, han identificado correctamente el 95,5% de las muestras. Los cuatro laboratorios que emplean el ensayo de Vircell han identificado de forma correcta sólo el 80% de las muestras, y los dos que emplean el ensayo de Virotech, el 92,5%. El resto de ensayos se han procesado en un solo laboratorio, por lo que es difícil establecer las características de su funcionamiento. Sin embargo, es importante resaltar que todas las muestras ensayadas por IFI han sido correctamente caracterizadas, a pesar de ser ésta una técnica cuya interpretación está sometida a la subjetividad de la lectura.

En la tabla 1 se muestran los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos por cada uno de los laboratorios participantes. Se observan diferencias importantes entre los laboratorios que emplean el mismo ensayo. Entre aquellos que emplean el ensayo de Dade-Behring, la sensibilidad varía entre el 75 y el 100%, manteniendo una especificidad del 100%. Estos resultados sugieren que algunos laboratorios pueden tener ciertos problemas en los sistemas de pipeteado. En los laboratorios que emplean el ensayo de Vircell la sensibilidad varía entre el 41,7 y el 100%, se observan igualmente fallos en la especificidad, que varía entre el 75 y el 100%. Aparte de los posibles problemas de pipeteado anteriores mencionados, los resultados obtenidos con el ensayo de Vircell sugieren problemas del reactivo, que afectan tanto a la especificidad como a la sensibilidad.

Nueve laboratorios determinaron IgG antisarampión, todos por ELISA indirecto (Dade-Behring [5], Vircell [2], Virion [1] y Panbio [1]). Se han recibido un total de 178 resultados. Los resultados se muestran en la tabla 2. Se ha obtenido una concordancia del 79,8%, sensibilidad de 76,1% y especificidad de 94,4%. Sólo el ensayo de Virion ha mostrado una concordancia absoluta con el laboratorio de referencia, aunque sólo se ha manejado en un laboratorio. Al igual que se ha comentado más arriba, se observan diferencias entre los laboratorios que emplean el mismo ensayo, fundamentalmente en lo relativo a la sensibilidad. La

TABLA 1. Resultados IgM antisarampión obtenidos en cada laboratorio participante

Lab	Ensayo	Concordancia (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
A	ELISA Dade Behring	19/20 (95)	11/12 (91,7)	8/8 (100)
B	ELISA Dade Behring	20/20 (100)	12/12 (100)	8/8 (100)
C	ELISA Dade Behring	20/20 (100)	12/12 (100)	8/8 (100)
D	ELISA Dade Behring	19/19 (100)	12/12 (100)	7/7 (100)
E	ELISA Dade Behring	18/20 (90)	10/12 (83,3)	8/8 (100)
F	ELISA Dade Behring	17/20 (85)	9/12 (75)	8/8 (100)
G	ELISA Dade Behring	20/20 (100)	12/12 (100)	8/8 (100)
H	ELISA Dade Behring	18/20 (90)	10/12 (83,3)	8/8 (100)
I	ELISA Dade Behring	19/20 (95)	11/12 (91,7)	8/8 (100)
J	ELISA Dade Behring	20/20 (100)	12/12 (100)	8/8 (100)
K	ELISA Vircell	13/20 (65)	5/12 (41,7)	8/8 (100)
L	ELISA Vircell	16/20 (80)	9/12 (75)	7/8 (87,5)
M	ELISA Vircell	18/20 (90)	12/12 (100)	6/8 (75)
N	ELISA Vircell	17/20 (85)	9/12 (75)	8/8 (100)
Ñ	ELISA Virotech	18/20 (90)	12/12 (100)	6/8 (75)
O	ELISA Virotech	19/20 (95)	12/12 (100)	7/8 (87,5)
P	ELISA PanBio	19/20 (95)	12/12 (100)	7/8 (87,5)
Q	ELISA Virion	16/20 (80)	8/12 (66,7)	8/8 (100)
R	ELISA Diasorin	19/20 (95)	12/12 (100)	7/8 (87,5)
S	IFI Stellar	19/19 (100)	11/11 (100)	8/8 (100)

IgM: inmunoglobulina M; Lab: laboratorio; ELISA: enzimoinmunoanálisis; IFI: inmunofluorescencia indirecta.

causa más probable de esto es que dado que la mayoría de muestras proceden de casos agudos de sarampión en las que las concentraciones de IgG son realmente bajas, pequeños defectos de los sistemas de pipeteado pueden ocasionar probablemente resultados negativos falsos.

En relación con las determinaciones de IgM frente a rubéola se ha recibido respuesta sólo de seis laboratorios, con un total de 79 resultados. Esta baja respuesta está probablemente relacionada con el hecho de que muchos laboratorios emplean métodos automatizados que requieren gran cantidad de muestra, lo que ha hecho imposible su ensayo. Todos los laboratorios determinaron las muestras por ELISA, bien indirecto (dos laboratorios, ambos Dade Behring), o de captura (cuatro laboratorios: Diasorin [2], Biorad [1] y BioMérieux [1]). Se ha obtenido una concordancia del 98,7% (78/79), con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 98,1% (54/55). Los resultados muestran unos valores excelentes de sensibilidad y especificidad, ya que sólo se obtuvo un resultado equívoco, clasificado como falso positivo, en una muestra IgM negativa frente a rubéola, procedente de un caso de PVB19.

Solamente se han recibido resultados de IgG antirrubéola de dos laboratorios, que emplean ELISA indirecto (Biorad y Diasorin), totalizando 29 determinaciones. La concordancia con respecto a los resultados de referencia fue del 93,1% (27/29), la sensibilidad del 90,5% (19/21) y la especificidad del 100% (8/8). La falta de sensibilidad fue debida a que dos muestras positivas fueron incorrectamente caracterizadas como negativas por el laboratorio que empleaba el ensayo de Biorad.

En lo que se refiere a las determinaciones de IgM frente a PVB19 se ha recibido respuesta de 10 laboratorios, con un total de 149 resultados. Ocho laboratorios realizaron

TABLA 2. Resultados IgG antisarampión obtenidos por técnica y marca comercial

	N.º de resultados	Concordancia (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Total	178	142/178 (79,8)	108/142 (76,1)	34/36 (94,4)
ELISA Behring	98	86/98 (87,8)	66/7 (84,6)	20/20 (100)
ELISA Vircell	40	24/40 (60)	18/32 (56,3)	6/8 (75)
ELISA Panbio	20	12/20 (60)	8/16 (50)	4/4 (100)
ELISA Virion	20	20/20 (100)	16/16 (100)	4/4 (100)

IgM: inmunoglobulina M; ELISA: enzimoinmunoanálisis.

ELISA, bien indirecto (Novum [1]) o de captura (Biotrin [7]); y los dos restantes hicieron IFI (Biotrin). Se ha obtenido una concordancia del 94,6% (141/149), una sensibilidad del 69,6% (16/23) y una especificidad del 99,2% (125/126). La baja sensibilidad obtenida se ha debido a que una muestra de un caso de sarampión que además mostraba IgM frente a PVB19 no fue identificada como positiva por ningún laboratorio, proporcionando 6 de los 7 resultados falsos negativos.

Se han recibido 39 resultados de IgG frente a PVB19 de 3 laboratorios. Todos los laboratorios empleaban ELISA indirecto (2 Biotrin, y 1 Novum). La concordancia con respecto a los resultados de referencia fue del 76,9% (30/39), la sensibilidad del 71,4% (15/21) y la especificidad del 83,3% (15/18).

Probablemente, el diagnóstico diferencial con virus dengue va a constituir un aspecto importante cuando la producción de casos autóctonos de sarampión se vea reducida, por lo que se han incluido en este panel dos muestras procedentes de casos de esta enfermedad. Ninguno de los laboratorios participantes realizó determinaciones de IgM frente a virus dengue. Sin embargo, de los 136 casos de sarampión confirmados por el laboratorio en el año 2001, seis fueron importados⁸, y en alguno de estos casos la primera sospecha diagnóstica fue la de infección por virus dengue.

Entre los objetivos contemplados en el Plan de Eliminación del Sarampión², se incluye la confirmación por el laboratorio de los casos sospechosos, para permitir de forma rápida la identificación de brotes y la detección de la circulación del virus. El objetivo de la distribución de este panel ha sido valorar comparativamente, frente a técnicas bien establecidas, los métodos empleados para el diagnóstico de sarampión, así como el diagnóstico diferencial con otras enfermedades exantemáticas por los laboratorios que componen la Red de Laboratorios Autonómicos para el Plan de Eliminación del Sarampión, en lo que se refiere a la serología. No existe un estándar de oro para el diagnóstico serológico del sarampión. Por lo tanto, la elección como criterio de referencia del método empleado en el presente trabajo está exclusivamente basada en experiencias previas⁹, como un ensayo que reconoce de forma eficaz los casos de sarampión. La introducción de un criterio alternativo, por ejemplo el consenso de todos los laboratorios, introduciría si cabe un sesgo mayor, por el hecho de que un ensayo (en concreto el mismo que se emplea en el laboratorio de referencia) ha sido empleado por la mayoría de laboratorios.

En relación con el sarampión, se ha obtenido una sensibilidad relativamente baja (89,1%). Esto se debe en parte a que, a efectos de realizar la comparación, los resultados equívocos obtenidos por los laboratorios participantes se han considerado discrepantes en la presente evaluación. La práctica habitual que se sigue para realizar el diagnóstico es estudiar una muestra de seguimiento que permita confirmar, o descartar, el resultado equívoco. En cuanto a PVB19, no se pueden sacar conclusiones definitivas, debido fundamentalmente a la inclusión de una muestra que mostraba una reactividad débil, que no ha sido detectada en ninguno de los laboratorios participantes. El diagnóstico de rubéola está, por último, resuelto de forma excelente.

En lo que se refiere a las determinaciones de IgG, hay que resaltar que la concordancia con el laboratorio de referencia ha sido muy baja en el caso de sarampión; sólo tres de los nueve laboratorios han identificado correctamente las muestras estudiadas. Esto puede ser explicado teniendo en cuenta que tratándose de muestras tomadas en la fase aguda de la enfermedad, contienen concentraciones bajas de anticuerpos, de forma que cualquier mínimo desajuste en el ensayo puede producir resultados falsos negativos. De cualquier forma, los ensayos para la determinación de IgG son aplicables fundamentalmente para determinar exposición previa, y son de aplicación de forma muy restringida en el diagnóstico de la enfermedad, sólo para confirmar la seroconversión frente al virus.

No ha sido el objetivo de este estudio valorar la sensibilidad y especificidad de ensayos serológicos individuales, sino de los laboratorios del Plan de Eliminación del Sarampión. Por tanto, la obtención de resultados distintos de lo esperado no es sólo dependiente del reactivo empleado, sino que pueden existir factores inherentes al laboratorio, por ejemplo, los sistemas de pipeteado, de gran importancia en el resultado obtenido.

Como conclusiones, algunos laboratorios deberían revisar los métodos empleados para el diagnóstico de sarampión. Los resultados, por otra parte, justifican la necesidad de un laboratorio de referencia que sirva de apoyo para la confirmación de resultados, así como para el diagnóstico de otros agentes exantemáticos, cuando los antecedentes epidemiológicos así lo requieran.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado mediante el Proyecto "Desarrollo del Programa de Eliminación del Sarampión en España" (SBVI

1284-3/02) de la Dirección General de Salud Pública, Ministerio de Sanidad y Consumo.

Componentes de la Red de Laboratorios Autonómicos para el Plan de Eliminación del Sarampión

Rafael Benito, Hospital Clínico Universitario, Zaragoza; Josep Costa, Hospital Clínico y Provincial, Barcelona; María Isabel Galán, Hospital Comarcal, Melilla; María José Gastañares, Complejo Hospitalario San Millán-San Pedro, Logroño; María Dolores Gómez, Hospital Universitario La Fe, Valencia; Manuel Imaz, Hospital de Basurto, Bilbao; Paloma Martín, Hospital Infanta Cristina, Badajoz; Ana Martínez, Hospital Central de Asturias, Oviedo; Santiago Muñoz Criado, Hospital Clínico, Salamanca; David Navarro, Hospital Clínico Universitario, Valencia; José Miguel Nogueira, Hospital Dr. Peset, Valencia; Manuel Omeñaca, Hospital Miguel Servet, Zaragoza; Francisco Javier Pardo, Hospital General, Castellón; María del Carmen Pérez, Hospital General de Gran Canaria Dr. Negrín; Joaquín Plazas, Hospital General Universitario, Alicante; Joaquín Ruiz, Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia; Carlos Salas, Hospital de la Santa Cruz, Liébana, Cantabria; Francisco Salvá, Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca; Juan Carlos Sanz, Laboratorio de Salud Pública, Madrid; Concha Tuset, Hospital General Universitario de Valencia; Eduardo Varela, Hospital Clínico Universitario, Santiago de Compostela.

Bibliografía

1. Salud 21. El marco político de salud para todos de la Región Europea de la OMS. Madrid, Ministerio de Sanidad y Consumo, 1999.
2. Amela C, Pachón I. La Vigilancia Epidemiológica del Sarampión en el contexto del "Plan de acción para la eliminación del sarampión en España". Bol Epidemiol Semanal 2000;8:169-80.
3. Helfand RF, Heath JL, Anderson LJ, Maes EF, Guris D, Bellini WJ. Diagnosis of measles with an IgM capture EIA: The optimal timing of specimen collection after rash onset. J Infect Dis 1997;175:195-9.
4. Ozanne G, D'Halewyn MA. Performance and reliability of the Enzygnost measles enzyme linked immunosorbent assay for detection of measles virus specific immunoglobulin M antibody during a large measles epidemic. J Clin Microbiol 1992;30:564-9.
5. De Ory F. Evaluación de un ensayo de enzimoinmunoanálisis (ELISA) de captura para el diagnóstico de la infección por virus del sarampión. Enferm Microbiol Clin 2001;19:409-11.
6. Hudson P, Morgan Capner P. Evaluation of 15 commercial enzyme immunoassays for the detection of rubella specific IgM. Clin Diagn Virol 1996;5:21-6.
7. De Ory F, Guisasola ME, Téllez A, Domingo CJ. Comparative evaluation of commercial methods for the detection of parvovirus B19 specific immunoglobulin M. Serodiagn Immunother Infect Dis 1996;8:117-20.
8. Amela C, Pachón I, Sanz MC, Peña-Rey I, Grupo de Responsables Autonómicos del Plan de Eliminación del Sarampión y Responsables de los Laboratorios de Referencia en el Ámbito Nacional. Plan de eliminación del sarampión. Evaluación del año 2001 y primer semestre del año 2002. Bol Epidemiol Semanal 2002;10:185-8.
9. Ratnam S, Tipples G, Head C, Fauvel M, Fearon M, Ward BJ. Performance of indirect immunoglobulin M (IgM) serology tests and IgM capture assays for laboratory diagnosis of measles. J Clin Microbiol 2000;38:99-104.