

Identificación de infección primaria y secundaria al virus de la rubéola mediante la detección de la avidéz de la IgG en muestras de un brote en el 2004 en Cuba

María de los Angeles Ribas,^{1*} Yahisel Tejero,¹ Marlen Valcárcel,² Miguel Galindo,² Gretel Acosta,¹ Deneb García,¹ Yanislet Cordero¹

¹ Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía km 61/2. La Lisa, La Habana, Cuba.

² Ministerio de Salud Pública. Calle 23 No. 201 e/ M y N. Vedado, La Habana, Cuba.

email: maribas@ipk.sld.cu

La rubéola es una enfermedad infectocontagiosa que afecta a niños y adultos jóvenes, y cuando esta se produce en el primer trimestre del embarazo ocasiona malformaciones congénitas en el feto. En el Laboratorio Nacional de Referencia de Sarampión, Rubéola y Parotiditis del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", se realizó la detección del índice de avidéz relativo (IAR) de la IgG en 15 pares de sueros correspondientes a igual número de pacientes adultos que enfermaron durante un brote de rubéola ocurrido en dos provincias de Cuba en el 2004, los cuales fueron positivos a anticuerpos de tipo IgM específicos al virus, y en algunos se encontró seroconversión o un aumento de cuatro veces el título entre los sueros de la fase aguda y convaleciente con la técnica de inhibición de la hemaglutinación. En 13 (86,6%) de los pacientes estudiados se detectó infección primaria, mientras que en dos (13,3%) de ellos la infección fue secundaria. La detección de la avidéz de la IgG constituye un método alternativo útil para distinguir una infección primaria de una secundaria al virus de la rubéola y fortalece el diagnóstico de esta enfermedad en Cuba.

Palabras clave: rubéola, avidéz, ELISA, IgG.

Introducción

La rubéola es una enfermedad exantemática aguda, generalmente moderada que se manifiesta por una erupción maculopapular, linfadenopatías y fiebre no muy elevada. Afecta a niños y adultos jóvenes, es capaz de ocasionar el síndrome de rubéola congénita (SRC) y, cuando se presenta en una mujer susceptible durante el primer trimestre del embarazo, trae graves implicaciones para el feto (1,2).

El diagnóstico serológico de la infección por el virus de la rubéola se realiza casi siempre a través de la detección de los anticuerpos de tipo IgM e IgG, pero los anticuerpos de clase IgM pueden estar presentes ante una reinfección, lo que dificulta la interpretación de si se trata de un caso primario o secundario (2).

La incorporación de la vacuna triple viral (sarampión, rubéola y parotiditis) al programa de inmunización de muchos países y la meta de eliminación de la rubéola/SRC en el mundo, reduce de forma considerable la incidencia de infección por este virus y crece la reactividad inespecífica a la IgM, lo que ocasiona una disminución del valor predictivo positivo de los ensayos de tipo IgM y comienza la detección de resultados falsos positivos. Esta situación conduce a la implementación de técnicas de laboratorio que permitan distinguir entre una respuesta primaria y una reinfección, mediante la incorporación de un método alternativo o complementario a

la detección de la IgM, tal como la determinación de la avidéz de los anticuerpos de tipo IgG (3,4).

En 1984 se introduce el término avidéz en la práctica clínica, aplicándose a los sistemas tipo ELISA y a la inmunofluorescencia, métodos que permiten diferenciar una infección reciente de una residual. La determinación de la avidéz de la IgG en el suero muestra su gran utilidad en el diagnóstico de las enfermedades virales, bacterianas y parasitarias, fundamentalmente en las mujeres embarazadas, donde se necesita conocer si la infección ocurre antes o durante la gravidez (4,5).

En Cuba, en el año 2004, tras más de 10 años de no notificarse casos de rubéola, se produce un brote de esta enfermedad en una población adulta, que por la edad que tenían los casos estos debían estar vacunados contra la rubéola o padecían la infección natural. Con el objetivo de confirmar si se trataba de una infección primaria o secundaria al virus de la rubéola, se realizó la detección de la avidéz de los anticuerpos IgG en el suero de estos pacientes.

Materiales y Métodos

Muestras

En el presente estudio se investigaron 15 pares de sueros pertenecientes a igual número de pacientes que enfermaron

* Doctor en Medicina, Doctor en Ciencias, Especialista de Segundo Grado en Microbiología, Profesor Auxiliar e Investigador Titular.

con el virus de la rubéola en un brote ocurrido en dos provincias de Cuba (Santiago de Cuba y La Habana) en el año 2004. El estudio se realizó en el Laboratorio Nacional de Referencia de Sarampión, Rubéola y Parotiditis, del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", donde se recibieron y conservaron las muestras a -20 °C hasta el momento de su procesamiento.

Detección de anticuerpos de tipo IgM al virus de la rubéola

Se empleó el estuche comercial Enzygnost antirubella IgM, Dade Behring (Marburg, Germany), basado en el principio de captura de anticuerpos, el que se utilizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

Técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (IH) para la detección de anticuerpos al virus de la rubéola

Para la realización de esta técnica se aplicó el método descrito por Gershon y Krugman en 1979, en el cual se consideraron positivas al virus de la rubéola aquellas muestras de suero que presentaron una seroconversión o aumento del título del segundo suero cuatro veces o más con respecto al primero (6).

ELISA para detección del índice de avidéz relativo (IAR, porcentaje de avidéz) de los anticuerpos de tipo IgG al virus de la rubéola

Para medir la avidéz de la IgG se empleó el estuche comercial Avidity Anti-Rubella ELISA (IgG) (EUROIMMUN, Medizinische Labordiagnostika AG, Holanda), con un principio indirecto y en el cual se siguieron las instrucciones del fabricante.

A todos los pocillos de la placa de reacción se les adicionaron 100 μ L de las muestras a estudiar y en la misma se realizó la técnica ELISA, de manera convencional y añadiendo 200 μ L de una solución de urea entre la incubación de la muestra y la adición del conjugado (anti IgG humana marcada con peroxidasa), en hileras alternas.

Se incubó 1 h a 37 °C y después de realizar los lavados con el tampón fosfato suministrado en el estuche, se aplicaron 100 μ L del cromógeno TMB/sustrato y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente (20-25 °C), protegido de la luz. Posteriormente, la reacción se detuvo con la solución de parada.

La lectura se realizó con los filtros de 450 y 620 nm como referencia, en un lector de ELISA (Reader 25, Biomérieux).

El IAR se calculó dividiendo la densidad óptica (DO) de la muestra tratada con urea, entre la DO de la muestra sin tratar y luego se multiplicó por 100.

Interpretación de los resultados

El límite superior del rango considerado como anticuerpos de baja avidéz (valor de corte) recomendado en el estuche fue de 40%. Valores de IAR por debajo del corte recomendado indicaron la presencia de anticuerpos de baja avidéz (< 40%); resultados entre 40 y 60% se interpretaron como moderados y los valores por encima de 60% se consideraron como de alta avidéz.

A las muestras que después de tratadas presentaron una DO por debajo de 0,150, no se les realizó la detección del IAR, y se consideraron como no detectables (ND).

Criterio de infección primaria: Aquellos casos donde el valor del IAR fue moderado, por debajo del valor límite o no se pudo detectar.

Criterio de infección secundaria: Aquellos casos donde el valor del IAR fue mayor de 60%.

Definición de infección primaria: Cuando el individuo se expuso por primera vez al virus de la rubéola, ya sea por infección natural o por vacunación (7).

Definición de infección secundaria (reinfeción): Cuando después de que se produjeron los anticuerpos contra el virus de la rubéola por enfermarse naturalmente o por la vacunación, los anticuerpos disminuyen significativamente después de transcurrir varios años. Cuando el individuo se expone de nuevo al virus se vuelve a infectar, pero generalmente con menor intensidad (7).

Resultados

En la Tabla se muestra la presencia de anticuerpos de tipo IgM, IH y el IAR de la IgG, en los 15 pares de sueros de los pacientes que enfermaron en el brote del año 2004.

La respuesta de anticuerpos de tipo IgM fue positiva en todos los sueros (100%): el 73,3% (11/15) de las muestras presentó seroconversión o aumento del título cuatro veces o más del segundo suero con respecto al primero con la IH, mientras que en el primer suero de 11 (73,3%) de los 15 casos no se pudo determinar el valor del IAR, por ser la DO inferior a 0,15; en 2 (13,3%) el IAR fue bajo (< 40%) y en los otros 2 (13,3%) fue alto (> 60%).

En las segundas muestras los valores de IAR variaron y aquellos que al inicio fueron ND (11) pasaron a ser: altos, 3 casos (27,3%), moderados, 5 (45,5%) y bajos, 3 (27,3%).

Al realizar el análisis de los resultados obtenidos se consideró que 13 (86,6%) de los casos estudiados presentaron una infección primaria y dos de ellos tuvieron una rubéola secundaria (casos 12 y 14).

Tabla 1. Resultados de la IgM, IH, y la avidéz a la IgG en los pares de sueros estudiados.

Casos	Primera y segunda muestra (días)	ELISA/IgM Sueros pares	Resultado IH	IAR Primera muestra	IAR Segunda muestra	Clasificación de la Infección
1	5/24	Pos/Pos	< 10/80	ND	alta avidéz	Primaria
2	3/40	Pos/Pos	10/40	ND	alta avidéz	Primaria
3	5/28	Pos/Pos	10/80	ND	moderado	Primaria
4	5/13	Pos/Pos	20/40	ND	baja avidéz	Primaria
5	7/14	Pos/Pos	40/40	ND	baja avidéz	Primaria
6	5/ 23	Neg/Pos	10/40	ND	moderado	Primaria
7	7/14	Neg/Pos	< 10/20	ND	baja avidéz	Primaria
8	5/21	Pos/Pos	10/40	ND	alta avidéz	Primaria
9	3/17	Pos/Pos	20/80	ND	moderado	Primaria
10	4/11	Pos/Pos	40/80	ND	moderado	Primaria
11	5/12	Pos/Pos	20/40	baja avidéz	baja avidéz	Primaria
12	5/12	Pos/Pos	10/40	alta avidéz	alta avidéz	Secundaria
13	6/39	Pos/Pos	10/40	baja avidéz	alta avidéz	Primaria
14	8/27	Pos/Pos	20/320	alta avidéz	alta avidéz	Secundaria
15	3/22	Pos/Pos	10/40	ND	moderado	Primaria

Legenda: ND: No determinado (DO < 0,15) ; IAR: Índice de avidéz relativo ; Pos: Positivo ; Neg: Negativo

La edad promedio de los pacientes fue de 31,7 años, todos presentaron manifestaciones clínicas de rubéola y a pesar de que reportaron haber recibido la vacuna monovalente de rubéola o la triple viral, esta información no pudo verificarse por no contar con la tarjeta de vacunación.

Se muestra la distribución de los valores de los IAR de los primeros y segundos sueros de los pares estudiados, donde el mayor número de las segundas muestras se distribuyó por encima de 40% del valor del IAR, incluso algunas sobrepasaron el 60%.

Discusión

Una vez que los anticuerpos se producen, las células B permanecen en la circulación y son responsables de la respuesta de memoria ante una nueva exposición a ese mismo antígeno, produciéndose un incremento en el IAR de la IgG, lo que hace a esta prueba muy útil para diferenciar entre una infección primaria o secundaria (8).

A pesar de que los pacientes estudiados expresaron haber recibido la vacuna contra la rubéola cuando tenían un año de edad o en alguna de las campañas de vacunación realizadas en Cuba contra este virus, la presencia de anticuerpos de tipo IgM, así como la ausencia o baja avidéz de los anticuerpos IgG en el primer suero obtenido de la mayoría de los casos, sugirió que los mismos padecieron una infección primaria.

En los casos 12 y 14 (de 26 y 56 años de edad, respectivamente), cuya respuesta de anticuerpos se elevó entre el primer y segundo suero con la IH y el IAR fue alto.

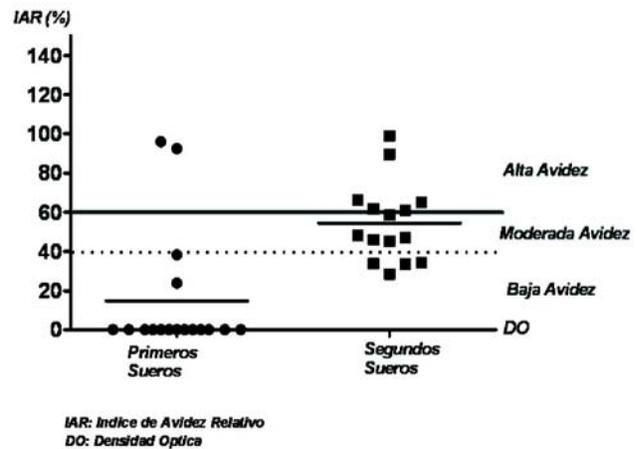


Fig. 1. Distribución de los pares de sueros estudiados de acuerdo con el valor del IAR.

Se consideró que tenían una infección secundaria, la que pudo producirse por pérdida de los anticuerpos frente a la rubéola, ya que la vacuna se aplicó en etapas tempranas de la vida (al año de edad) o en el caso 14, por una disminución de los anticuerpos, después de muchos años de haber enfermado de forma natural.

Todos los individuos estudiados presentaron anticuerpos de tipo IgM en ambos sueros. Algunos autores plantean que la evidencia de reinfección se expresa con el aumento de los anticuerpos de memoria ante una nueva exposición al virus, lo que puede acompañarse o no de una respuesta positiva de la IgM, la cual por lo general es débil, produciéndose picos

muy reducidos de la misma que generalmente no se captan por los sistemas serológicos empleados (9, 10).

En el caso de brotes, el aumento de la IgM compatible con una historia epidemiológica confirma la positividad de infección. Sin embargo, una respuesta IgM positiva puede encontrarse durante las seis primeras semanas de la infección y persistir hasta 3 o 12 meses después de iniciarse los síntomas, observándose un aumento en el rango de detección en la fase convaleciente (11, 12).

En los casos 4, 5, 10 y 11, al realizarse la IH no hubo un cambio significativo en el título de los anticuerpos entre el primer y segundo suero, resultado quizás vinculado con un intervalo de colección menor a 15 días entre la primera y segunda muestra del suero.

Clásicamente, la infección o reinfección con el virus de la rubéola, se determina a través del incremento del título de los anticuerpos IgG en sueros pareados, donde el segundo suero se extrae entre los 15 y 21 días después del primero. En la mayoría de las muestras estudiadas, los anticuerpos IH mostraron seroconversión o aumento del título cuatro veces o más del segundo suero con respecto al primero. Tipples en 2011 plantea que para interpretar los resultados obtenidos en los estudios serológicos, donde se realiza la titulación de anticuerpos, se necesita tener en cuenta el momento de colección de la muestra, ya que cuando el primer suero se obtiene varios días después de iniciados los síntomas y el segundo entre los 10 y 14 días después del primero, puede no producirse un aumento significativo en el nivel de anticuerpos entre una y otra muestra (3).

En los pacientes cuyo IAR del primer suero no se determinó o este fue bajo, se observó un incremento en el valor de la avidéz de la IgG cuando el tiempo de recolección transcurrido tras la primera y segunda muestra fue mayor de 20 días. Algunos autores expresan que el cambio del porcentaje de avidéz de bajo a alto ocurre entre 100 a 150 días después de iniciada la infección. Sin embargo, otros afirman la detección de altos índices en muestras de suero tomadas entre el tercer y el día 26 de la fecha del inicio de los síntomas (11, 13).

En los casos 12 y 14, clasificados como infección secundaria, el valor del IAR fue alto en ambos sueros. La avidéz de los anticuerpos estriba en su fortaleza de unión con el antígeno y se considera que una vez obtenido un alto porcentaje de avidéz, el mismo no se modifica a lo largo de la vida del sujeto, independientemente de las oscilaciones que se produzcan en el nivel de los anticuerpos como consecuencia de reinfecciones o reactivaciones (14, 15).

Se plantea que la avidéz de la IgG para neutralizar al antígeno viral se incrementa rápidamente después de la infección primaria y que es mucho más lenta después de la vacunación, manteniendo un valor moderado durante un periodo prolongado (meses) y las variaciones en el rango de baja a

alta avidéz está condicionada por factores tales como: el sistema inmune del paciente, la fecha de toma de la muestra y del inicio de los síntomas, la técnica empleada, la preparación del antígeno para el estudio, la concentración del reactivo que actúa como disociante e incluso el método para realizar el cálculo de los resultados (16, 17).

La detección de la avidéz de la IgG mostró ser una técnica útil, no solo en el diagnóstico de diferentes enfermedades donde se desea conocer si se produjo una infección primaria o secundaria, sino también en aquellas donde las manifestaciones clínicas son poco específicas, no hay respuesta aparente de la IgM y se produce una aparición precoz de la IgG, sin seroconversión demostrable o cuando la IgM es positiva a uno o varios virus, por lo que se recomienda su inclusión en los laboratorios como complemento de la detección de la IgM, ante la posibilidad de que la positividad de este anticuerpo no se deba, precisamente, a una infección primaria, sino a una recurrencia clínica o a un estímulo policlonal inespecífico (18, 19).

Referencias

1. Hamkar R, Jalilvand S, Abdolbaghi M, Jelyani K, Esteghamati A, Hagh-goo A, et al. Distinguishing between primary infection and reinfection with rubella vaccine virus IgG avidity assay in pregnant women. *East Med Health J* 2009;15(1):94-103.
2. Wandinger K, Saschenbrecker S, Steinhagen K, Schepel T, Meyer W, Bartelt U, et al. Diagnosis of recent primary rubella virus infections: significance of glycoprotein-based IgM serology, IgG avidity and immunoblot analysis. *J Virol Methods* 2011;174:85-93.
3. Tipples G. Rubella diagnostic issues in Canada. *J Infect Dis* 2011;2004 (Suppl 2):659-63.
4. Mubareka S, Richards H, Gray M, Tipples G. Evaluation of Commercial Rubella Immunoglobulin G Avidity Assays. *J Clin Microbiol* 2007;45(1):231-3.
5. Shepherd S, Kean J, Hutchinson S, Cameron S, Goldberg D, Carman W, et al. A hepatitis C avidity test for determining recent and past infections in both plasma and dried blood spot. *J Clin Virol* 2013;57(1):29-35.
6. Gershon A, Krugman S. Measles virus. En: Lennette E, Schmidt N. Diagnostic procedure for viral, rickettsial and chlamydial infections. Washington DC: Am Public Health Association; 1979. p. 665-93.
7. Pannuti C, Morello R, de Moraes J, Pires S, Alfonso A, Correa M, et al. Identification of primary and secondary measles vaccine failures by measurement of immunoglobulin G avidity in measles cases during the 1997 Sao Paulo epidemic. *Clin Diag Lab Immunol* 2004;11(1):119-22.
8. Kontio M, Jokinen S, Paunio M, Peltola H, Davidkin I. Waning antibody levels and avidity: Implication for MMR vaccine induced protection. *J Infect Dis* 2012;206(10):1542-8.
9. De Paschale M, Agrappi C, Manco M, Clerici P. Positive predictive value of anti-HCMV IgM as an index of primary infection. *J Virol Meth* 2010;168:121-5.
10. Rota J, Hickman C, Sowers S, Rota P, Mercader S, Bellini W. Two case studies of modified measles in vaccinated physicians exposed to primary measles cases: high risk of

- infection but low risk of transmission. *J Infect Dis* 2011;204 (Suppl 1):559-63.
11. Hickman C, Hyde T, Sowers S, Mercader S, Mc Grew M, Williams N, et al. Laboratory characterization of measles virus infection in previously vaccinated and unvaccinated individuals. *J Infect Dis* 2011;204 (Suppl 1): 549-58.
 12. Vicari A, Dietz V, Bellini W, Icenogle J, Castillo C. Interpretation of Measles and Rubella Serology. In: Andrus J, de Quadros C. *Recent Advances in Immunization*. Washington DC: Pan American Health Organization; 2006. p. 76-86.
 13. Vauloup-Fellous C, Grangeot-Keros L. Humoral Immune Response after Primary Rubella Virus Infection and after Vaccination. *Clinical and Vaccine Immunology* 2007;14(5):644-7.
 14. Binley JM, Arshad H, Fouts TR, Moore J. An Investigation of the High-Avidity Antibody Response to Glycoprotein 120 of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *AIDS Research and Human Retroviruses* 1997;13(12):1007-15.
 15. Paunio M, Hedmon K, Davidkin I, Valle M, Heinonen O, Leinikki P, et al. Secondary measles vaccine failure identified by measurement of IgG avidity: high occurrence among teenagers vaccinated at a young age. *Epidemiol Infect* 2000;124(2):263-71.
 16. Narita M, Matsuzono Y, Takekoshi Y, Yamada S, Itakura O, Kubota M, et al. Analysis of Mumps Vaccine Failure by Means of Avidity Testing for Mumps Virus-Specific Immunoglobulin G. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5(6):799-803.
 17. Gutiérrez J, Maroto C. Serodiagnóstico de la infección vírica: su interés clínico. *Control de Calidad SEIMC* 2004:1-8. Disponible en: http://www.seimc.org/control/revi_Sero/Serovir.htm.
 18. Suresh S, Nor-Masniwati S, Nor-Idhariani M, Wan-Hazabbah W, Zeehaida M, Zunaina E. Serological IgG avidity test for ocular toxoplasmosis. *Clin Ophthalmol* 2012;6:147-50.
 19. Mercader S, García P, Bellini W. Measles virus IgG avidity assay for use in classification of measles vaccine failure in measles elimination setting. *Clinical and Vaccine Immunology* 2012;19(11):1810-7.

Identification of primary and secondary infection to rubella virus by the detection of IgG avidity in samples of an outbreak occurred in 2004 in Cuba

Abstract

Rubella infectious diseases affect children and young adults and when they occur during the first trimester of pregnancy, cause congenital malformations in the newborn. In the National Reference Laboratory (NLR) of measles, rubella and mumps from the Tropical Medicine Institute "Pedro Kourí", the IgG Avidity Index (AI) detection was carried out to 15 paired serum samples, which corresponded to same number of patients infected with this virus in two Cuban provinces in 2004. The samples were positive to virus-specific IgM antibodies, in addition seroconversion or an increase of > 4 fold of the titers in the sera of the acute and convalescence phase using the hemagglutination inhibition assay (HIA). The AI value showed a primary infection to rubella virus in 13 (86.6%) of the patients studied, and a secondary infection in 2 (13.3%) of them. The IgG avidity antibody detection is a reliable alternative tool for distinguishing between primary and secondary rubella virus infection and for strengthening the diagnosis of this disease in Cuba.

Key words: rubella, avidity, ELISA, IgG.

Recibido: Febrero de 2013

Aceptado: Abril de 2013