
Estudio comparativo de las técnicas de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA para la detección de Parvovirus B19.

Maczy González¹, Manzur Hassanhi², Sergio Rivera³ y María del Pilar Bracho⁴.

¹Cátedra de Hematología, Departamento de Morfofisiopatología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia,

²Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia,

³Laboratorio de Inmunogenética, Banco de Sangre de Maracaibo, Instituto Hematológico de Occidente y Departamento de Enfermedades Transmisibles, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia y ⁴Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Palabras clave: Crisis aplásticas, Parvovirus B19, IFI, ELISA, IgG, IgM.

Resumen. Se evaluaron 53 sueros provenientes de pacientes con diversos desórdenes hematológicos y 15 sueros controles, para determinar la seroprevalencia de IgG e IgM específicos del Parvovirus B19 (P. B19) empleando las técnicas de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) e Inmunoensayo enzimático (ELISA). La prevalencia a IgG específica del grupo control por ambos métodos fue de 46,6%, en los pacientes en crisis de 83,3% (IFI) y 66,7% (ELISA), y en los pacientes sin crisis de 68,9% (IFI) y 72,4 % (ELISA); observándose IgM (+) sólo en los pacientes en crisis: 8,3% (IFI) y 29,1% (ELISA). La elevada seroprevalencia (IgG) observada frente al control, podría deberse a una mayor exposición al virus por parte de los pacientes. La concordancia entre ambas técnicas para IgG fue de 81% y para IgM de 93%, sin embargo, ELISA resultó ser más sensible para detectar IgM de P. B19. A pesar de la evidencia serológica y evaluando un sólo espécimen sérico por paciente, se pudo establecer la asociación entre crisis aplástica e infección viral, para IgM ELISA pero no para IgG.

Comparative assay of indirect Immunofluorescence and ELISA techniques for the Parvovirus B19 detection.

Invest Clín 2000; 41(1): 19-27

Key words: Aplastic crisis, Parvovirus B19, IFA, ELISA, IgG, IgM.

Abstract. To determine the seroprevalence of IgG and IgM antibodies against Parvovirus B19 (P. B19), we studied the sera of 53 patients with different hematologic disorders and the sera of 15 controls using indirect immunofluorescence (IFI) and the ELISA method. The prevalence of IgG in the control group was 46.6%, in patients with aplastic crisis was 83.3% (IFI) and 66.7% (ELISA) and, in patients without crisis was 68.9% (IFI) and 72.4% (ELISA). IgM was negative except for patients with crisis: 8.3% (IFI) and 29.1% (ELISA). The higher seroprevalence (IgG) found in patients in comparison with controls might be due to a greater exposure of patients to the virus. The agreement for both techniques was 81% (IgG) and 93% (IgM) however ELISA technique was more sensitive for detecting IgM of P. B19. In spite of serologic evidence and evaluating a simple serum sample per patient, we could establish an association between aplastic crisis and viral infection for IgM ELISA but not for IgG between hematologic disorders and infection for the P. B19.

Recibido: 8-10-98. Aceptado: 15-2-2000.

INTRODUCCIÓN

Existe una gran variedad de desórdenes hematológicos (anemia falciforme, talasemia, esferocitosis hereditaria, etc.) que cursan con episodios de pancitopenia periférica transitoria mejor denominada Crisis Aplástica Transitoria (TAC); se reconoce que además de las anemias hemolíticas, diversos tipos de inmunodeficiencias adquiridas o congénitas, así en como pacientes hemofílicos y leucémicos pueden producirse infección persistente o aplasia roja pura causada por el *Parvovirus B19* (P. B19) (1).

La TAC se define como una reducción transitoria de la hematopo-

yesis, lo que determina que en sangre periférica se encuentren valores casi indetectables de reticulocitos (0-0,1%), con un descenso de la cuenta roja, hemoglobina (Hb) y hematocrito (Hto) por debajo de los valores referenciales, acompañado de leucopenia y trombocitopenia (1, 2, 3).

Hoy en día se acepta que la TAC se presenta como la principal y más grave complicación de la infección por P. B19, en pacientes con diversos desórdenes hemolíticos. Sus rasgos clínicos se caracterizan por fiebre, mialgia, prurito, y en ciertos casos puede cursar con erupción máculopapular, artralgias y artritis. Sin embargo, es importan-

te resaltar que estas crisis, se pueden presentar como consecuencia de una infección bacteriana o posteriores a una terapia antineoplásica (1, 4, 5, 6).

Las crisis aplásticas fueron asociadas por primera vez a infección por P.B 19 humano en 1981, cuando Pattison y col. (7), en un estudio realizado en inmigrantes jamaíquinos con anemia falciforme, lograron determinar que las crisis eran secundarias a infección por este parvovirus.

La infección por P. B19 tiene un período de incubación de 4 a 10 días, de manera tal que la respuesta inmunitaria específica empieza a generarse a los 14 días, con una producción creciente de IgM (detectable hasta 2-3 meses después); entre los 16 a 18 días se inicia una generación sostenida de IgG durante el período de convalecencia, que suele mantenerse por meses o años (8).

Las técnicas de detección serológica de la infección por P. B19 para el análisis de IgG, IgM y antígeno viral más empleadas y aplicables para el estudio de muestras sanguíneas en bancos de sangre son: RIA,

ELISA e Inmunofluorescencia indirecta (IFI) (9, 10).

En este trabajo se determinó la seroprevalencia de IgG e IgM específicas de P.B19 en pacientes con diversas patologías hematológicas, remitidos al Banco de Sangre del Estado Zulia, Venezuela, con el fin de establecer si existe o no asociación entre la infección viral y las crisis aplásticas así como, efectuar un estudio comparativo entre las técnicas serológicas: IFI y ELISA, empleadas en la detección de la infección por P. B19.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se procesaron 53 muestras séricas de individuos con diversos desórdenes hematológicos (A: 24 en crisis aplásticas y B: 29 sin crisis) distribuidos según la patología hematológica de base diagnosticada (Tabla I).

Como controles se analizaron 15 muestras séricas correspondientes a donantes de sangre voluntarios, adultos, hombres y mujeres, clínicamente sanos (Grupo C).

TABLA I
DISTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS CON CRISIS Y SIN CRISIS APLÁSTICAS SEGÚN LA PATOLOGÍA DIAGNOSTICADA

| GRUPOS | PATOLOGÍAS | | | | |
|---------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|------------------|-----------------------------|
| | Citopenias (n) | Hemofilias (n) | A. Hemolíticas (n) | Leucemias (n) | Inmuno- deficiencias (n) |
| A Pacientes en crisis | 11 | 7 | 1 | 1 | 4 |
| B Pacientes sin crisis | 6 | 4 | 14 | 4 | 1 |

(n) Número de casos.

La detección de IgG e IgM de P. B19, se realizó en todas las muestras, empleando las técnicas de Inmunofluorescencia indirecta (IFI-INCSTAR Test System) e Inmunoensayo enzimático (ELISA-IBL Hamburg) (10, 11).

El análisis estadístico se llevó a cabo empleando la prueba de X^2 aplicando el programa estadístico Statistix versión 4.0¹². Se calculó el Riesgo relativo (rr) y el X^2 correspondiente para investigar asociación entre la detección serológica, crisis aplásticas y trastornos hematológicos (13, 14).

RESULTADOS

Immunofluorescencia indirecta (IFI)

De los 24 sueros de pacientes con diversos desórdenes hematológicos en plena crisis aplástica (A), 20 (83,3%) presentaron IgG específica y 2 de ellos (8,3%) resultaron IgM (+) (Tabla II).

De los 29 pacientes del grupo B (sin crisis), 20 (68,9%) mostraron

IgG específica. En el grupo control, 7 de 15 (46,6%) fueron positivos. Las diferencias observadas entre el grupo control y los pacientes del grupo A (en crisis) fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Inmunoensayo enzimático (ELISA)

En el grupo A (en crisis), 16 de 24 (66,7%) fueron positivos para IgG y 7 de ellos (29,1%) resultaron IgM (+). Mientras que en el grupo B (sin crisis), 21 de 29 (72,4%) presentaron IgG específica, y en el grupo control 7 de 15 (46,6%) resultaron IgG (+). Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) para la determinación de IgM entre el grupo A (en crisis) en comparación con el grupo B (sin crisis) y el control (Tabla III).

La IgM de P. B19, no se detectó en pacientes sin crisis (A) ni en el grupo control (C), aplicando tanto IFI como ELISA (Tablas II y III).

Estudios de asociación

En las Tablas IV y V se muestran los resultados de la evaluación

TABLA II
SEROPREVALENCIA PARA EL PARVOVIRUS B19 EN PACIENTES EN CRISIS APLÁSTICAS, SIN CRISIS Y EL GRUPO CONTROL EMPLEANDO INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

| GRUPO | TOTAL | IgG ESPECÍFICA | | | | IgM ESPECÍFICA | | | |
|------------------------|-------|----------------|-------|-----------|------|----------------|-----|-----------|------|
| | | Positivos | | Negativos | | Positivos | | Negativos | |
| | | n | % | n | % | n | % | n | % |
| A Pacientes en crisis | 24 | 20 | 83,3* | 4 | 16,7 | 2 | 8,3 | 22 | 91,7 |
| B Pacientes sin crisis | 29 | 20 | 68,9 | 9 | 31,1 | 0 | 0 | 29 | 100 |
| C Control | 15 | 7 | 46,6 | 8 | 53,4 | 0 | 0 | 15 | 100 |

* $p < 0,05$ entre los grupos A y C. n: Número de muestras.

TABLA III
SEROPREVALENCIA PARA EL PARVOVIRUS B19 EN PACIENTES
EN CRISIS APLÁSTICAS, SIN CRISIS Y EL GRUPO CONTROL
EMPLEANDO INMUNOENSAYOENZIMÁTICO (ELISA)

| GRUPO | TOTAL | IgG ESPECÍFICA | | | | IgM ESPECÍFICA | | | |
|------------------------|-------|----------------|------|-----------|------|----------------|-------|-----------|--------|
| | | Positivos | | Negativos | | Positivos | | Negativos | |
| | | n | % | n | % | n | % | n | % |
| A Pacientes en crisis | 24 | 16 | 66,7 | 8 | 33,3 | 7 | 29,1* | 17 | 70,8 |
| B Pacientes sin crisis | 29 | 21 | 72,4 | 8 | 27,6 | 0 | 0 | 29 | 100,00 |
| C Control | 15 | 7 | 46,6 | 8 | 53,4 | 0 | 0 | 15 | 100,00 |

* p < 0,05 entre los grupos A y B, A y C. n: Número de muestras.

TABLA IV
EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN DE LA INFECCIÓN CON LOS CASOS
CON CRISIS Y SIN CRISIS APLÁSTICAS PARA LA DETERMINACIÓN
DE IgG DE P. B19 POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

| IgG de P. B19 (IFI) | CRISIS APLÁSTICAS | | TOTAL |
|---------------------|-------------------|-----|-------|
| | (+) | (-) | |
| (+) | 20 | 20 | 40 |
| (-) | 4 | 9 | 13 |
| Total | 24 | 29 | 53 |

rr = 2,25. p = ns.

TABLA V
EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN DE LA INFECCIÓN CON LOS CASOS
CON CRISIS Y SIN CRISIS APLÁSTICAS PARA LA DETERMINACIÓN
DE IgM DE P. B19 POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

| IgM de P. B19 (IFI) | CRISIS APLÁSTICAS | | TOTAL |
|---------------------|-------------------|------|-------|
| | (+) | (-) | |
| (+) | 2 | 0,5 | 2,5 |
| (-) | 22 | 29 | 51 |
| Total | 24 | 29,5 | 53,5 |

rr = 3,27. p = ns.

de la asociación de la infección por P. B19 con los casos con crisis y sin crisis aplásticas para las determinaciones de IgG específica, por IFI y ELISA. No se observaron asociaciones significativas para estos dos casos.

En las Tablas VI y VII se evaluó la asociación entre IgM y crisis aplástica por IFI y ELISA, y para esta última se encontró una alta asociación entre ambas variables (rr: 12,64, x^2 : 9,07, p 0,005).

TABLA VI
EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN DE LA INFECCIÓN CON LOS CASOS
CON CRISIS Y SIN CRISIS APLÁSTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE IgG
DE P. B19 POR INMUNOENSAYOENZIMÁTICO

| IgG de P. B19 (ELISA) | CRISIS APLÁSTICAS | | TOTAL |
|--------------------------|-------------------|-----|-------|
| | (+) | (-) | |
| (+) | 16 | 21 | 37 |
| (-) | 8 | 8 | 16 |
| Total | 24 | 29 | 53 |

rr = 0,76. p = ns.

TABLA VII
EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN DE LA INFECCIÓN CON LOS CASOS
CON CRISIS Y SIN CRISIS APLÁSTICAS PARA LA DETERMINACIÓN
DE IgM DE P. B19 POR INMUNOENSAYOENZIMÁTICO

| IgM de P. B19 (ELISA) | CRISIS APLÁSTICAS | | TOTAL |
|--------------------------|-------------------|------|-------|
| | (+) | (-) | |
| (+) | 7 | 0,5 | 7,5 |
| (-) | 17 | 29 | 46 |
| Total | 24 | 29,5 | 53,5 |

rr = 12,64. p < 0,005.

DISCUSIÓN

La seroprevalencia de IgG de Parvovirus B19 para el grupo control de nuestra población, se ubicó en 46,6% con IFI y ELISA. Esta cifra es comparable al reporte de Anderson (4), en el cual se ubica la prevalencia de IgG específica contra este virus en población adulta sana entre el 40 y el 60%. Cuando se comparan los resultados obtenidos en la determinación de IgG e IgM de P. B19 empleando ELISA e IFI en los grupos de pacientes en crisis (A) y sin crisis (B), se observa que por el método de IFI, las cifras obtenidas para ambos grupos (83,3% y 68,9%) son estadísticamente similares. Sin em-

bargo entre el grupo A y el Control (C) hubo diferencias significativas. Esto podría sugerir un nivel elevado de exposición al virus por parte del grupo de pacientes en crisis aplásticas.

Igualmente la seroprevalencia de IgG de P. B19 registrada para los grupos de pacientes A y B por el método de ELISA, fue estadísticamente similar entre ellos (66,7 y 72,4%), coincidiendo con lo descrito para el método de IFI. No se observaron diferencias significativas entre los grupos de pacientes (A y B) y el control (C). La prevalencia de IgG obtenida por ELISA en las muestras estudiadas son comparables a la reportada por Gowda y col. en niños con ane-

mia falciforme con y sin crisis aplás-ticas (70 y 84%) (2).

Por otra parte, pareciera que el método de ELISA fuera más sensible para la detección de IgM de P. B19 que el método de IFI, posiblemente derivado del hecho de que el método de ELISA utiliza el Ag. VP2 para la detección de IgM y no el VP1 empleado para la técnica de IFI (7, 9, 10).

Esta hipótesis tiene su asidero en estudios realizados sobre la res-puesta inmunitaria a P. B19 por Kurtzman y col. (11), en los cuales se determinó que durante la infec-ción aguda los anticuerpos IgM es-pécificos que se producen, poseen una especificidad predominante del antígeno VP2 del virus, a diferencia de los anticuerpos IgG que se gene-ran en la etapa convalesciente, crón-ica o pasada, cuya especificidad predominante es a antígeno VP1.

De manera general, comparan-do los datos obtenidos por ambas técnicas para IgG e IgM de P. B19 en los grupos de estudio, no se ob-servaron diferencias significativas, lo que quiere decir que ambos méto-dos son confiables coincidiendo con lo reportado anteriormente por Cu-bie y col. (10).

En nuestro estudio encontra-mos asociación entre IgM de P. B19 y las crisis aplásticas que afectaron a los pacientes con diversas patolo-gías hematológicas, lo cual concuer-da con lo publicado por Anderson y col. (9), en pacientes con anemia fal-ciforme y talasemia. Estas crisis pa-recen afectar con mayor frecuencia a éstos últimos, en virtud de las al-

teraciones que presentan los eritro-citos, lo cual hace más severa la in-fección por el P. B19, conjuntamen-te con las transfusiones sanguíneas periódicas que los predisponen aún más, en relación con la población sana. Esto, aunado a la presencia de IgM específica de P. B19 sólo en pacientes con crisis aplásticas, su-giere fuertemente que el P. B19 re-presenta uno de los elementos res-ponsables de estas crisis en los pa-cientes con los diferentes trastornos hematológicos evaluados (15, 16).

Sin embargo, se hace necesario evaluar otros parámetros que con-juntamente con el P. B19 puedan desencadenar las crisis aplásticas que afectan a los pacientes con di-versos desórdenes hematológicos.

Por último, se recomienda estu-diar la posibilidad de llevar a cabo el despistaje serológico (ELISA) rutina-rio de IgM de P. B19 en donantes de sangre, de manera de prevenir la po-sible contaminación y administra-ción de productos sanguíneos infec-tados con el virus a pacientes con diversas patologías hematológicas en su fase aguda.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HARRIS J.W.: Parvovirus B19 for the Haematologist. (Review). *Am J Haematol* 1992; 39:119-130.
2. GOWDA N., SREEDHAR P.R., COHEN B., SCOTT T., CLEWLEY J.P., BROWN A.: Human parvovirus infection in patients with sickle cell disease with

- and without hypoplastic crisis. *J Pediatr* 1987; 110:81-83.
3. POTTER C.G., POTTER A.C., HATTON C.S. R., CHAPEL H.M., ANDERSON M.J., PATTISON J.R., TYRERELL D.A., HIGGINS P.J., WILMAN J.S., PARRY H.F., COTES P.M.: Variation of erythroid and myeloid precursors in the marrow and peripheral blood of volunteer subjects infected with human Parvovirus B19. *J Clin Invest* 1987; 79: 1486-1492
 4. ANDERSON L.J.: Human Parvovirus B19. *Pediatr Ann* 1990; 19:509-512.
 5. KURTZMAN G.L., COHEN B., FIELD A., OSEAS R., BLAESE M., YOUNG N.: Immune response to B19 Parvovirus and an antibody defect in persistent viral infection. *J Clin Invest* 1989; 84:1114-1123.
 6. NAIDES S.: Parvoviruses, in *Clinical Virology Manual*. Spector S., Lancz eds Essex. Elsevier Science Publishers 1992. p. 1547-1569.
 7. PATTISON J.R., JONES S.E., HODSON J., DAVIS L.R., WHITE J.M., STROUD C.E., MURTAZA L.: Parvovirus infection and hypoplastic crisis in sickle cell anaemia. *Lancet* 1981: 664-665.
 8. CARLSEN K.: Human Parvovirus. Booklet. Biotrin International. Ltd 1-22.
 9. ANDERSON L.J., TSOU C., PARKER R.A., CHORBA T.L., WULFF H., TATTERSALL P., MORTIMER P.: Detection of antibodies and antigens of human Parvovirus b19 by Enzyme-Linked Immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1986; 24:522-526.
 10. CUBIE H., LESLIE E.E., SMITH S., O'NEILL H.J., HART H., COHEN B.J., INGLIS J.M.: Use of recombinant parvovirus B19 antigens in serological assays. *J Clin Pathol* 1993; 46:840-845.
 11. McOMISH F., YAP P.L., JORDAN A., HART H., COHEN B. J., SIMMONDS P.: Detection of parvovirus b19 in donated blood: a model system for screening by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31:323-328.
 12. DANIEL W.W.: Estadística no paramétrica en: *Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud*. Tercera Edición Editorial Noriega Limusa México 1991 p. 459-637.
 13. FESTENSTEIN H., DÉMANT P.: MHS y Enfermedad en: *Inmunogenética Fundamental, Biología y Aplicaciones Clínicas en HLA y H-2*. Editorial El Manual Moderno, S.A. México, D.F. 1981 pp 230-254.
 14. SVEJGAARD A., RYDER L.P: HLA antigens diseases association detecting strongest association. *Tissue Antigens* 1994; 43(1):18-27.
 15. KURTZMAN G. L., MEYERS P., COHEN B., ADOOR A.: Persistent B19 iparvovirus nfection as a cause of a severe anaemia in children with acute lympho-

16. SAARINEN U.M., CHORBA T.L., TATTERSALL P., YOUNG N.S., ANDERSON L.J., PALMER E., COCCIA P.: Human parvovirus B19-induced epidemic acute red cell aplasia in patients with hereditary hemolytic anemia. *Tissue Antigens* 1994; 43(1):18- 27.