

2 E. Do. 114

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



BUSQUEDA DE ANTICUERPOS ANTI - RUBEOLA EN LA
COMUNIDAD UNIVERSITARIA POR EL METODO DE
INHIBICION DE HEMAGLUTINACION, UTILIZANDO
ERITROCITOS HUMANOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE;
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A

CLAUDIA MARTA VALENCIA GOMEZ

MEXICO, D. F.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

	Página
Introducción.....	1
Capítulo I	
Antecedentes históricos.....	5
Características del virus de la rubéola....	6
Manifestaciones clínicas.....	7
Epidemiología y Vacunación.....	9
Respuesta Inmunológica.....	12
Capítulo II	
Técnicas serológicas para la cuantificación de anticuerpos anti-rubéola.....	15
Algunas consideraciones sobre los métodos in munoserológicas utilizados para anticuerpos anti-rubéola.....	20
Generalidades de la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IHA).....	22
Sistemas Indicadores.....	27
Capítulo III	
Material.....	28
Método.....	30
Capítulo IV	
Resultados.....	37
Capítulo V	
Conclusiones.....	41
Bibliografía.....	43

INTRODUCCION

Las mayores consecuencias clínicas que pueden ser causadas por la infección de la rubéola al principio del embarazo son la pérdida fetal y las anomalías del Síndrome de Rubéola Congénita (SRC).

Así, la prevención de la infección en el feto es el objetivo principal de la inmunización contra el virus de la rubéola (1).

En el caso de la rubéola, las pruebas inmunoserológicas para la determinación cuantitativa de anticuerpos son de gran utilidad para conocer los siguientes propósitos:

I.-Conocer el estado inmunitario de un individuo o de un grupo de individuos de una población (muestra representativa). En este caso se determina el título de anticuerpos en una sola muestra de suero de cada individuo, y de esa manera sabemos quienes están inmunes (por infección previa o vacunación) y quienes no lo están, así como la frecuencia de inmunes en la población estudiada. Tal información es de suma importancia en 2 circunstancias particulares:

A) En las mujeres que se encuentran en la etapa reproductiva y por lo tanto pueden embarazarse. Aquí caben a su vez 2 posibilidades: a) Que tengan ya un título protector (1:16 ó mayor) de anticuerpos específicos, en cuyo caso no existe la posibilidad de que puedan reinfectarse durante un embarazo y b) Que carezcan de protección inmunológica humoral (seronegativas) y puedan ser infectadas por el virus de la rubéola en el

transcurso de un embarazo, con los consecuentes riesgos de daño fetal.

La conveniencia de conocer el estado inmunitario de las mujeres fértiles es de tal importancia que en algunos países constituye ya un requisito legal para el matrimonio. Las mujeres seronegativas (título 1:8 ó menor) deben vacunarse y esperar 3 meses antes de iniciar una gestación; las seropositivas no tendrán, por supuesto, ningún problema.

B) Antes de aplicar vacuna anti-rubéola, ya sea a un individuo o a una comunidad.

En el primer caso es conveniente para evitar el desperdicio del biológico en sujetos ya inmunes, puesto que éstos no se benefician en absoluto con la aplicación de la vacuna. Es útil, siempre que sea posible, una determinación de anticuerpos específicos en el suero de personas que van a ser vacunadas, para aplicar la vacuna solamente a quienes no tienen anticuerpos. Idealmente esto debiera hacerse en forma rutinaria en las niñas antes de llegar a la pubertad. La vacunación de individuos del sexo masculino seronegativos también tiene importancia desde el punto de vista epidemiológico, ya que todo individuo no inmune puede convertirse en transmisor. Para la aplicación racional de la vacuna en una comunidad, es indispensable conocer la condición inmunitaria de ésta, lo cual habitualmente se consigue por medio de encuestas seroepidemiológicas, en las que es fundamental la participación del laboratorio. De esa manera se define la proporción de inmunes/susceptibles y, lo más importante, se determina la distribución

de los susceptibles de acuerdo a grupos de edad, en lo cual -
deben basarse las decisiones adecuadas para la aplicación del
biológico.

II.-Demostrar que un individuo ha sufrido una infección
reciente por virus de la rubéola, información de especial im-
portancia en 2 circunstancias:

A) Cuando se sospecha que una mujer embarazada, de quien
se desconoce si está inmune o no a este virus, ha estado en -
contacto con un enfermo de rubéola; en tal caso es necesario
obtener 2 muestras de sangre: una en fase aguda, lo más pron-
to posible, y otra de unos 15 a 20 días después. Si en la com-
paración de los títulos obtenidos para cada muestra, la segun-
da presenta un título 4 o más veces mayor que el título obte-
nido en la primera muestra, se considera que se produjo la in-
fección por el virus de la rubéola. En caso de que haya sido
confirmada serológicamente una infección de rubéola en una mu-
jer embarazada, el médico deberá informar a la paciente los -
riesgos de que el niño llegue a presentar síntomas y secuelas
del Síndrome de Rubéola Congénita (SRC).

B) Cuando se sospecha que una mujer embarazada ha estado
expuesta a la infección por este virus, pero se desconoce en
qué momento ocurrió la probable transmisión, es necesario co-
nocer su estado inmunitario y determinar, cuando se encuen-
tran anticuerpos específicos, si éstos corresponden a una in-
fección antigua o a una infección reciente. Esto es posible -
porque en el primer caso los anticuerpos serían del tipo IgG,
y en el segundo caso del tipo IgM o mezclas de IgG e IgM; en

tal caso es necesario obtener una muestra de sangre y tratarla con DTT para remover los anticuerpos Igm presentes en el suero, indicativos de una infección reciente, confrontándolo con la misma muestra de suero no tratada y observando los títulos obtenidos en ambas muestras, por ejemplo:

SUERO TRATADO	SUERO NO TRATADO	INTERPRETACION
1:128	1:128	Inmunidad antigua
1:16	1:128	Inmunidad reciente.

III.-Cuando se va a determinar la efectividad de una vacuna, se escoge un grupo de individuos de una población, a quienes se les toma una muestra sanguínea, y se determina enseguida el título de anticuerpos individualmente; se seleccionan aquellos que fueren seronegativos al antígeno vacunal y se les administra la vacuna. Después de 15 a 20 días se toma una segunda muestra para una nueva determinación de anticuerpos; la proporción de individuos que han desarrollado anticuerpos específicos, respecto de los seronegativos vacunados, nos indica la efectividad de la vacuna.

CAPITULO I

A) ANTECEDENTES HISTORICOS.

Las primeras diferenciaciones clínicas y epidemiológicas entre la rubéola y el sarampión se atribuyen a Hoffman en 1740 y a Fritsch en 1786. Thomas en 1874 publicó una descripción clara y concisa de la rubéola, separando esta enfermedad de la confusión con otros padecimientos exantemáticos como el sarampión y la escarlatina (2).

Hiro y Tasaka en 1938, sugirieron la etiología viral y la probaron en estudios experimentales en el hombre y en monos, y lograron transferir el virus a niños por medio de secreciones nasofaríngeas de pacientes infectados con el virus de la rubéola, filtrados a través de filtros Seitz EK y Berkerfeld W.

Fue en 1941 cuando el Dr. Norman McAlister Gregg, oftalmólogo australiano, notificó por primera vez la verdadera importancia y riesgo potencial de la rubéola "in útero". En su trabajo "Congenital cataract following German measles in the mother", describe amplia y detalladamente las manifestaciones clínicas de la rubéola congénita. Como oftalmólogo, enfocó su atención principalmente a los problemas de cataratas congénitas; sin embargo, también subrayó la asociación de enfermedades cardíacas congénitas, hemorragias y anomalías renales, todas a consecuencia de la infección de rubéola durante el embarazo (3).

Los experimentos de transmisibilidad de Anderson en 1949

y de Krugman en 1953, en voluntarios humanos, sugirieron la naturaleza viral de la enfermedad; sin embargo, la imposibilidad de cultivar el virus impidió por mucho tiempo un avance definitivo en este campo (3). En 1962, Parkman por un lado y Weller y Neva por otro, casi simultáneamente lograron multiplicar el virus de la rubéola en cultivo de tejidos. Los conocimientos sobre el virus y sus efectos nocivos en el embrión humano, se ampliaron a partir del momento en que se logró el primer cultivo, así como la posibilidad de la demostración de anticuerpos específicos.

B) CARACTERISTICAS DEL VIRUS DE LA RUBÉOLA.

El virus de la rubéola es de tamaño mediano y de morfología variada, generalmente esférico. Su diámetro varía de 150 a 200 nm. El virus de la rubéola contiene ácido ribonucleico (RNA). Preparaciones del virus purificado no revelan huellas de ácido desoxiribonucleico (DNA); el virus contiene una envoltura esencialmente de lípidos. El virus de la rubéola ha sido incluido en el grupo de los Pseudoparamixovirus, pero otros autores lo incluyen en el grupo de los Togavirus. Solo hay un tipo distintivo inmunológicamente del virus de la rubéola. Se inactiva rápidamente a 56°C, a 37°C su vida media dura 1 hora, pero es posible mantenerlo por tiempo indefinido a -70°C. Se inactiva a pH inferior a 6.8 o superior a 8.1 y es lábil a la luz ultravioleta, éter, cloroformo y otras sustancias químicas. Es completamente resistente a los antibióticos y a los desinfectantes ordinarios. A partir de los traba-

jos de Stewart y cols. (4) ha sido posible preparar antígeno y antisueros específicos, los cuales son la base de las pruebas serológicas en uso.

C) MANIFESTACIONES CLINICAS.

C-1) INFECCION POST-NATAL.

La enfermedad adquirida después del nacimiento es benigna y deja inmunidad permanente (5). La vía de entrada son las vías respiratorias (6). El mecanismo de transmisión es por -- contacto directo de persona a persona a través de secreciones nasofaríngeas; otros mecanismos son raros. En 1965 Anderson, Krugman y Sever, determinaron que el período de incubación - fluctúa entre 14 y 21 días, con mayor frecuencia a los 16 -- días.

Generalmente empieza con adenopatías (retroauricular u - occipital) (5), y la erupción aparece hasta que los ganglios han permanecido hipertrofiados durante 24 horas aproximadamente; se inicia en cara y cuello y se disemina rápidamente al - tronco y extremidades. En la mayoría de los casos, durante -- las segundas 24 horas la erupción es más puntiforme; al ter - cer día la erupción desaparece. En la fase aguda de la enfer - medad, la mucosa faríngea está enrojecida y hay conjuntivitis leve; puede haber o no fiebre (38.5°C). Muy frecuentemente es subclínica o pasa inadvertida (7).

C-2) INFECCION CONGENITA.

El Síndrome de la Rubéola Congénita (SRC) está asociado con la infección por virus de rubéola durante los primeros me

ses del embarazo. Como ya se mencionó, en 1941 Gregg observó, en ocasión de una epidemia en Australia, una gran incidencia de cataratas, sordera y cardiopatías en niños cuyas madres habían padecido la infección de rubéola en el primer trimestre del embarazo, y desde 1964 más anomalías han sido asociadas con el SRC. Las más comunes son: bajo peso al nacimiento, enfermedades cardiovasculares, anomalías oftálmicas, defectos neurológicos, neumonía y defectos de huesos largos (5).

Las consecuencias de la rubéola in útero son variadas e impredecibles, y pueden ir desde la muerte fetal, anomalías al nacimiento o aún niños normales sin evidencia clínica de la infección (6). Frecuentemente los defectos ocasionados por el virus de la rubéola pueden no ser evidentes hasta semanas o meses después del nacimiento, como observó Levine (9).

En la mujer embarazada no inmune, el virus de la rubéola atraviesa la placenta y llega a la circulación fetal; en los tejidos fetales tiene un efecto inhibitorio de la mitosis celular y un efecto citopatogénico, lo que explica la génesis de las malformaciones (3). El hecho de que no todos los niños de madres infectadas nazcan con defectos o malformaciones congénitas se puede deber a diferencias en la virulencia de las diversas cepas naturales de virus, a la cantidad de virus que atraviesa la placenta y a la edad del feto al tiempo de su infección. Con base en esto se ha pensado que los defectos y malformaciones congénitas están asociados con el momento de la gestación en que se adquiere la infección por el virus de la rubéola.

Dudgeon (10) esquematizó las alteraciones que se presentan en el feto en relación a la edad gestacional, en casos -- confirmados de la infección in útero (Figura 1).

El riesgo de que se produzcan malformaciones congénitas es alto cuando la infección ocurre a principios del embara -- so (11). Según el Manual Merck ese riesgo es del 10 al 50% -- cuando la rubéola materna ocurre en el primer mes; del 14 al 25% en el segundo mes y del 6 al 17% en el tercer mes. Cuando la rubéola materna ocurre durante el segundo trimestre del em barazo puede dar como resultado muerte fetal o un neonato con secuelas neurológicas, pero el riesgo preciso aún no es conocido (5).

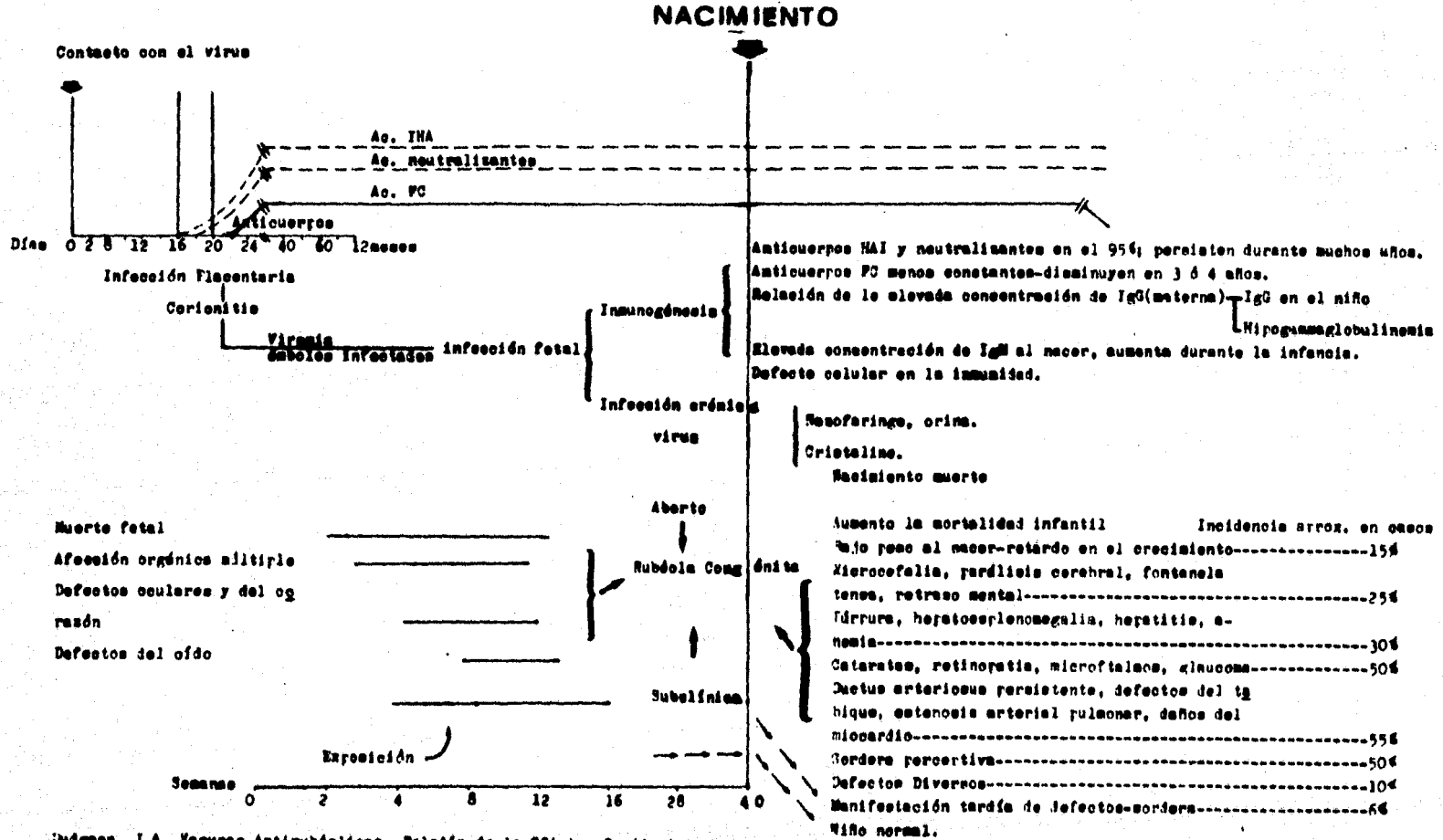
En el afán de prevenir las desastrosas consecuencias de la infección intrauterina se recurrió al uso de la gamma glo bulina para la protección de mujeres embarazadas expuestas a la enfermedad, con resultados muy desalentadores. Se ha logra do que sólo la inmunoglobulina específica y de alto título, -- administrada 24 horas después de la exposición a la rubéola, pueda prevenir la infección, el desarrollo de la viremia y la excreción faríngea del virus; sin embargo, la protección es -- de corta duración y desaparece al cabo de 8 a 12 semanas (3).

D) EPIDEMIOLOGIA Y VACUNACION.

La epidemiología de la rubéola esta dominada por conside raciones acerca de su efecto teratogénico.

La enfermedad presenta una preferencia estacional; en Eu ropa y E.U.A. generalmente se presenta en invierno y princi -

FIGURA 1. Ilustración de las diversas fases de la patogenia de la rubéola en la madre y el feto, y también la reacción clínica e inmunológica del feto en relación con la edad de gestación.



Dudgeon, J.A. Vacunas Antirrubélicas. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. 74: 411, 1973.

plos de la primavera, mientras en México se presenta durante los meses de otoño, invierno y primavera (2).

En la Ciudad de México la infección se inicia desde el primer año de vida, alcanzando su incidencia máxima en la edad escolar.

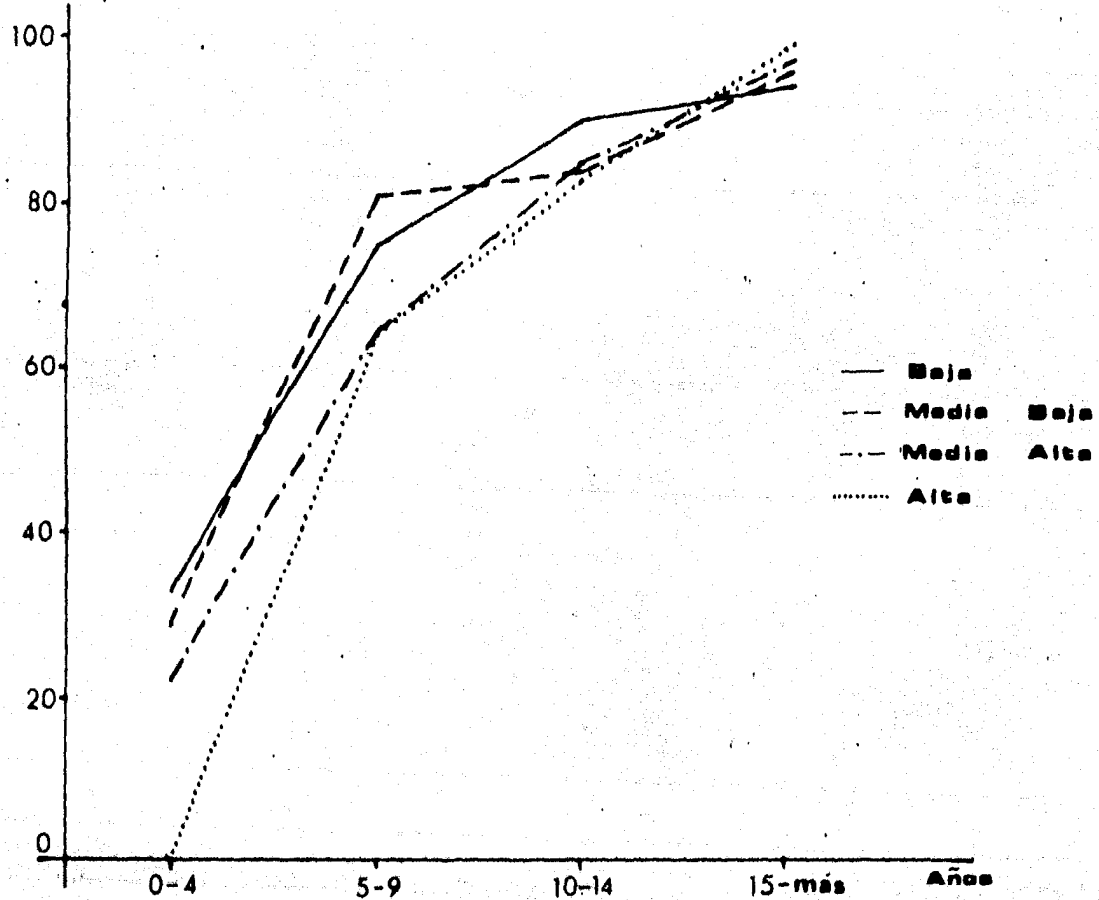
Se ha observado que aproximadamente el 90% de la población entre 5 a 15 años de edad ha tenido contacto con el virus de la rubéola, y es el grupo responsable de la diseminación de la rubéola en la comunidad, por lo que debe merecer la mayor atención en los esfuerzos de control de esta enfermedad (2).

En México la epidemiología de la rubéola no es igual a la de otros países, y aún en regiones distintas en el país (12), puesto que los niveles de vida no son los mismos (13).

En un estudio realizado por Ordóñez en 1969 (12), encontró que el 31.4% de niños de 1 a 4 años de edad ya habían padecido rubéola; entre los 5 y 9 años de edad esta proporción subió al 75.1%; de 10 a 14 años de edad el porcentaje fue de 88%. A partir de los 15 años de edad los niveles de protección en mujeres fueron del 93.5% al 98.6%, niveles que no habían sido observados hasta esa fecha en otros países (Gráfica 1). En México los niños menores de 4 años muestran una marcada diferencia de inmunidad contra la rubéola entre las diferentes clases socioeconómicas (Gráfica 2), pero en la edad escolar todos los grupos de edad tienen la misma probabilidad de infectarse, ya que se favorece la transmisión directa de persona a persona.

Gr. 2. Inmunidad contra la Rubéola según edad y condición económica.

% de protección.



Ordóñez, B.R. Frecuencia de Rubéola en México. Salud Pública de México. 11: 731, 1969.

En el mismo año, De Mucha-Macias (12) en un estudio en Oaxaca señaló que la incidencia de sujetos susceptibles alcanzó un 15-20% en grupos de población femenina cuyas edades oscilaban entre 15 y 45 años de edad.

En 1974, Martín Sosa y Magaña Morán (14) en un estudio realizado en la Universidad Autónoma de Morelos, encontraron una incidencia de 9.1% de mujeres susceptibles, de edades entre 14 y 24 años, y en su estudio concluyeron: "la falta de información estadística que haga posible establecer la magnitud del problema del Síndrome de Rubéola Congénita, no permite llegar a una conclusión sólida sobre la trascendencia epidemiológica de esos resultados".

La rubéola en nuestro país tiene características endémicas, ya que la mayoría de la población tiene anticuerpos contra este virus. Debido a que en nuestro país son seropositivas un alto porcentaje de mujeres en edad "fértil", no se justifica la vacunación masiva, ya que existen otras enfermedades que son verdaderos problemas de Salud Pública, y por lo tanto tienen prioridad en la aplicación de nuestros recursos económicos, por lo que la vacuna debe ser aplicada exclusivamente a personas en edad reproductiva que sean seronegativas (15). De ahí que el procedimiento aconsejable sea determinar primero la susceptibilidad por examen serológico (3) y administrar la vacuna a las mujeres seronegativas, asegurándose de que la persona no esté embarazada y que no lo vaya a estar dentro de los 3 meses después de la vacunación, para evitar un posible efecto teratogénico producido por el virus de

la vacuna, aún cuando ésto no ha sido demostrado (16).

La vacuna ideal contra la rubéola debe reunir ciertos requisitos; entre ellos destacan: 1) que otorgue un alto grado de inmunidad a la población vacunada, produciendo niveles de anticuerpos que persistan por varios años o de por vida 2) que no tenga efectos secundarios severos y 3) que no favorezca la diseminación del virus de la vacuna por vías naturales (17).

De las vacunas existentes hasta la fecha, ninguna cumple todos los requisitos de la vacuna ideal; en la Tabla 1 se presentan las características de algunas de ellas.

En los últimos años se han realizado notables progresos en la elaboración de vacunas, quedando por resolver 3 puntos importantes (10): 1) la selección de sustratos celulares más adecuados en función de inocuidad y antigenicidad 2) se requieren más datos sobre el efecto de las cepas atenuadas del virus de la rubéola sobre el feto y 3) es preciso tener más información sobre los aspectos cualitativos y cuantitativos de la inmunidad posterior a la vacunación.

E) RESPUESTA INMUNOLOGICA.

E-1) ASPECTOS INMUNOLOGICOS EN LA INFECCION POST-NATAL.

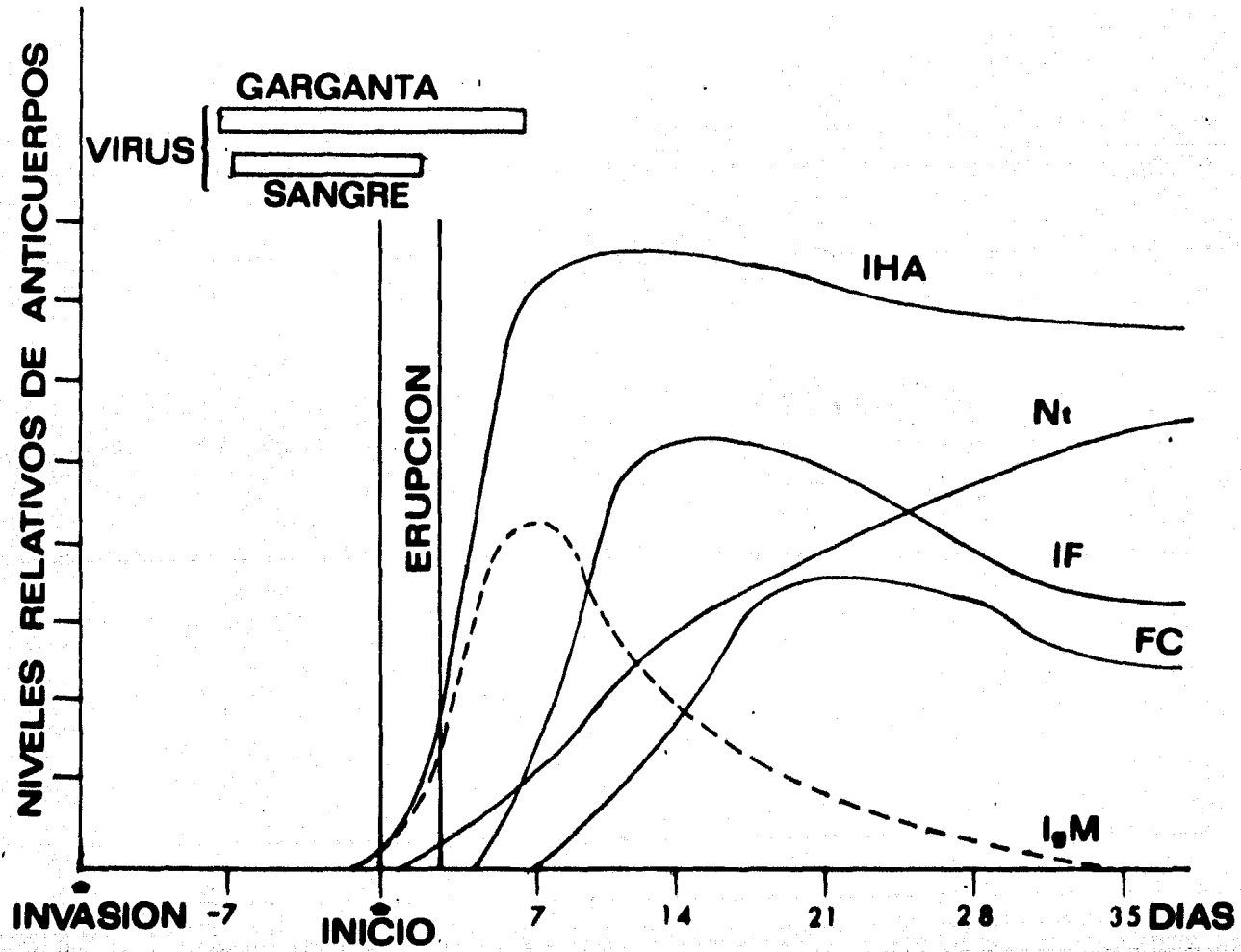
En una infección aguda de rubéola, los anticuerpos aparecen tempranamente después del inicio de la enfermedad (Esquema 1). Inicialmente los anticuerpos IgM e IgG pueden ser detectados. Generalmente, los anticuerpos IgM no persisten más allá de 4 a 6 semanas después del inicio de la enfermedad, mientras que los anticuerpos IgG persisten de por vida. En

TABLA 1

VACUNA	CULTIVO CELULAR	CEPA VIRICA Y ORIGEN	PORCENTAJE CON SERO - CONVERSION	PORCENTAJE CON EXCRE- CION DE VI RUS
HPV77	Riñón de mono verde africano (<i>Cercopithecus aethiops</i>).	HPV77	96	72
HPV120	Riñón de mono verde africano (<i>Cercopithecus aethiops</i>).	HPV77	100	92
HPV77/ DK12	Riñón de perro (DK).	HPV77	100	92
HPV150/ CETC10	Cultivo tisular de embrión de pollo - (CETC).	HPV77	75	65
HPV77/ DETC5	Cultivo tisular de embrión de pato - (DETC).	HPV77	100	100
MERCK A	Fibroblastos de embrión de pato.	Benoit (Merck de rubéola aguda).	100	100
Cende- hill	Cultivo primario de riñón de conejo.	De orina de caso agudo de rubéola.	98	50
Células Diploides hu- manas.	Fibroblastos de pulmón humano embrionario (W1-38).	RA27/3 de feto	100	0

Dudgeon, J.A. Vacunas Antirubélicas. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. 74: 411, 1973.

1. Esquema de la respuesta inmune en infección aguda de Rubéola.



una reinfección, sólo hay un aumento en los anticuerpos IgG - (5).

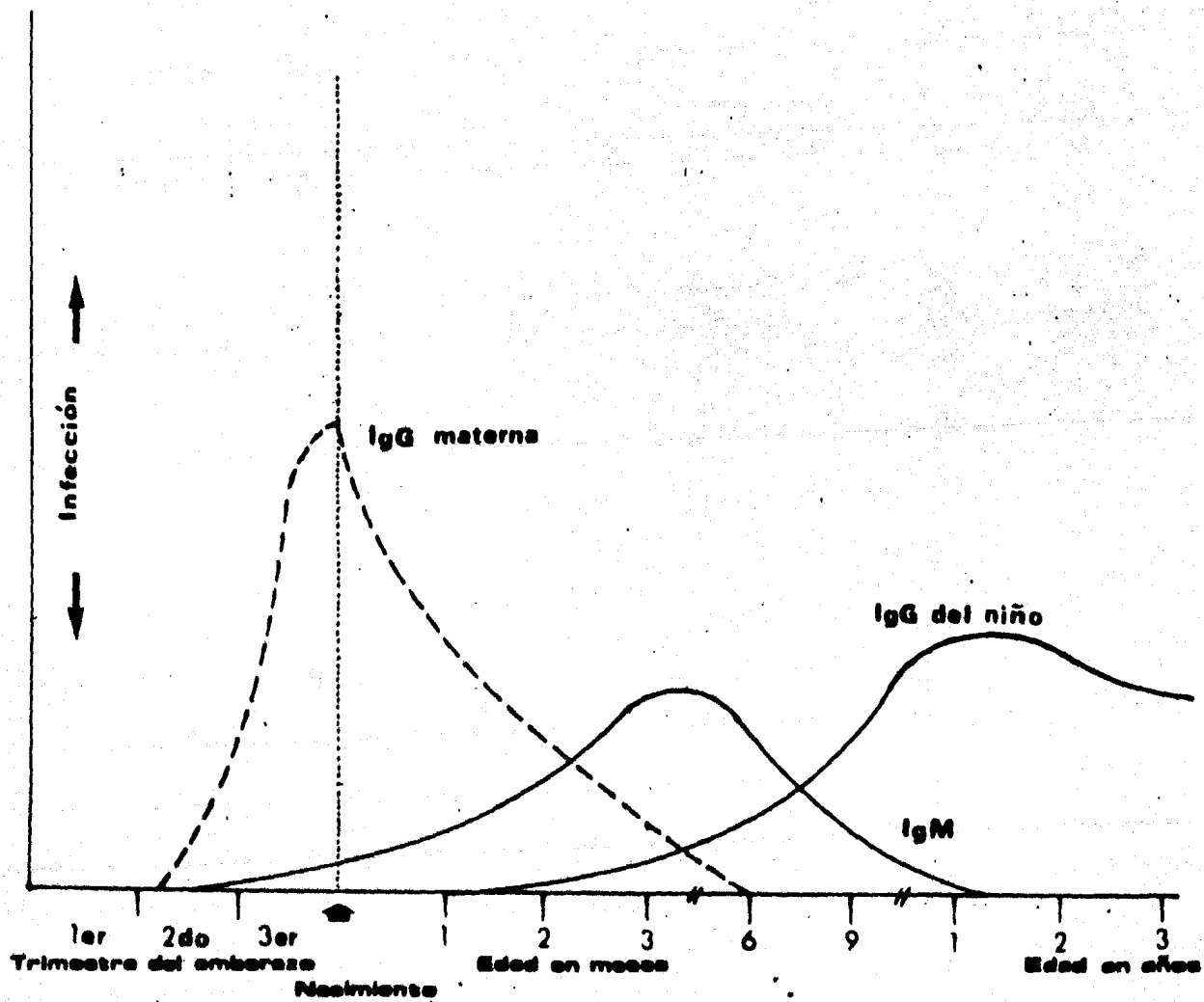
De uno a 2 días después de la fase virémica hay un rápido aumento de anticuerpos circulantes: anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación, anticuerpos neutralizantes y anticuerpos fijadores del complemento. Los anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación y los neutralizantes aparecen tempranamente, cuando la erupción se hace presente y alcanzando sus niveles máximos de 4 a 8 semanas después de la infección (8). Los anticuerpos fijadores del complemento llegan a ser detectables una semana o más después de la aparición de la erupción y no persisten tanto como los anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación.

E-2) ASPECTOS INMUNOLOGICOS DE LA INFECCION CONGENITA.

Otro caracter que distingue la infección prenatal de la post-natal, es la respuesta inmunológica como resultado de la infección in útero. El feto humano infectado con virus de la rubéola es capaz de producir anticuerpos específicos de rubéola antes del nacimiento, que son de la clase IgM. Debido a que los anticuerpos IgM normalmente no atraviesan la placenta, la presencia de anticuerpos IgM en el recién nacido es evidencia de la infección congénita (Esquema 2).

Los anticuerpos específicos de la clase IgG de la rubéola pueden también ser producidos por el niño infectado antes del nacimiento, pero es difícil diferenciarlos de los anticuerpos IgG específicos de la rubéola maternos transferidos pasivamente, los cuales están presentes en cantidad considera

2. Esquema de la respuesta inmune en Rubéola Congénita.



ble al tiempo del nacimiento. La vida media de los anticuerpos maternos transplacentarios es aproximadamente de 1 mes, encontrándose en el niño anticuerpos específicos IgG de rubéola que persisten indefinidamente a los niveles encontrados al nacimiento, lo cual es altamente sugestivo de la infección in útero.

Así, además de la detección de anticuerpos específicos de rubéola en la fracción IgM, la demostración de la persistencia de anticuerpos de rubéola puede ser usada para establecer un diagnóstico retrospectivo de rubéola congénita (8).

CAPITULO II

A) TECNICAS SEROLOGICAS PARA LA CUANTIFICACION DE ANTI - CUERPOS ANTI-RUBEOLA.

Existen diversos métodos para la cuantificación de anticuerpos antirubéola, de los cuales a continuación se describen brevemente sus fundamentos.

1) INMUNOFLUORESCENCIA (IF).

La técnica de fluorescencia se apoya en las propiedades físico-químicas especiales de los colorantes conocidos como fluorocromos. Los fluorocromos son sustancias químicas susceptibles de absorber una luz no visible de pequeña longitud de onda y de emitir instantáneamente una luz de longitud de onda mayor visible.

Los colorantes utilizados para marcar anticuerpos absorben luz ultravioleta y azul corta (entre 200 y 400 $m\mu$) y emiten una luz visible. El espectro de absorción exacto de un fluorocromo, y el de la luz que emite, permiten caracterizar cada compuesto. Los fluorocromos más habituales son: isotiocianato de fluoresceína, rodamina B de lisamina, y el ácido 1-dimetilaminonaftaleno-5-sulfónico (DANSYL). Estas sustancias se unen fácilmente a grupos amino libres de la molécula de anticuerpos.

La microscopía de luz fluorescente es más difícil que la microscopía óptica ordinaria ya que los objetos no son tan luminosos.

Se emplea una fuente de luz U.V. y azul corta, pasando - se por un filtro primario para quitar radiaciones de más de - 450-500 m μ ; suelen también ser necesarios filtros térmicos por el calentamiento que produce la lámpara de mercurio que - genera las radiaciones excitadoras. Se prefiere un condensa - dor de campo oscuro, pues es más fácil ver un punto de luz - coloreada sobre un fondo oscuro.

Cuando la luz pasa por el condensador llega al anticuerpo fluorescente en la muestra, el fluorocromo emite luz visible, pasando ésta por el tubo del microscopio y llegando al observador, después de atravesar un filtro secundario para su primar la luz U.V. peligrosa para la vista.

Existen 2 variantes para este método que son el método - Directo y el método Indirecto.

a) METODO DIRECTO.

En esta técnica se cubre la muestra con anticuerpo marca do y se espera que reaccione con el antígeno; un lavado suave elimina el anticuerpo no combinado y se observa al microscopio. Donde se observe fluorescencia es signo de que hay antígeno; se puede estar seguro de que hay antígeno específico -- siempre y cuando se hayan montado testigos adecuados simultáneamente.

b) METODO INDIRECTO.

Se basa en la técnica de la antiglobulina. Se lleva a cabo en 2 etapas: en la primera se emplea el antígeno y un anticuerpo no marcado procedente de especie conocida, generalmente el conejo.

Después de quitar por lavado el anticuerpo no combinado, la preparación se expone a un antisuero fluorescente contra la globulina de conejo. Este nuevo anticuerpo se fija a la globulina de conejo que a su vez está unida al antígeno, obteniéndose así indirectamente la fluorescencia del antígeno.

El método indirecto tiene ciertas ventajas sobre el directo: 1) es más sensible, pues el anticuerpo no marcado, a la vez que sirve de antígeno para el anticuerpo marcado, suministra muchos más focos de combinación que el antígeno inicial y 2) permite limitar el número de anticuerpos fluorescentes que deben prepararse. Para identificar una gran variedad de antígenos, contra los cuales existen sueros específicos de conejos, el único reactivo fluorescente necesario es el anticuerpo marcado contra la globulina de conejo.

Con las técnicas de inmunofluorescencia también es posible localizar anticuerpos utilizando antígenos fluorescentes (18).

2) HEMOLISIS RADIAL SIMPLE (HRS).

La finalidad de todas las técnicas de inmunodifusión es identificar la reacción antígeno-anticuerpo por la reacción de precipitación. Aunque la formación de complejos antígeno-anticuerpo en un medio semisólido como el agar, depende de electrolitos amortiguadores, pH y temperatura, los determinantes más importantes de la reacción son las concentraciones relativas de antígeno y anticuerpo. La precipitación máxima se forma en la zona de equivalencia con cantidades decrecientes

en las zonas de exceso del antígeno o del anticuerpo. Por lo tanto, la formación de líneas de precipitación en cualquier sistema de inmunodifusión es altamente dependiente de las concentraciones relativas del antígeno y del anticuerpo.

La difusión radial está basada en el principio de que existe una relación cuantitativa entre la cantidad de antígeno colocado en un pozo horadado sobre la placa de agar-anticuerpo y el anillo resultante de precipitación (19).

3) PRUEBA DE NEUTRALIZACION.

Se basa en el proceso por el cual un anticuerpo neutraliza específicamente la infecciosidad de microorganismos, particularmente virus.

El efecto más importante de los anticuerpos neutralizantes es prevenir la adsorción de los viriones a las células susceptibles (19).

Las pruebas de neutralización se llevan a cabo de 2 maneras: inhibición del efecto citopático (ECP) en cultivo de tejido y por disminución en el número de placas en una capa monocelular.

Para estudios de rubéola la técnica usada es la de inhibición del efecto citopático (ECP), en líneas celulares como HK-21, RK-13, LLC-RK-1 y riñón de mono verde africano (AG - MK) (20).

Para realizar esta prueba se preparan diluciones del suero problema y se mezclan con un volumen igual de la suspensión del virus diluida a contener 200 DICT₅₀, de manera que -

la mezcla suero-virus debe contener 100 DICT₅₀; después de dar tiempo a que se produzca la neutralización del virus (1-2 horas), se inocular una cantidad constante (0.1-0.2 ml) de la mezcla suero-virus a un mínimo de 2 tubos con células en monocapa, susceptibles a la infección por este virus y en las que pueda observarse claramente el efecto citopático (ECP).

Se incuban los cultivos celulares a 37 °C y se observan diariamente al microscopio; el título de anticuerpos neutralizantes está dado por la mayor dilución del suero capaz de neutralizar el virus (20).

Weller y Neva (2) estudiaron el fenómeno de interferencia utilizando la cepa de virus Sindbis, observando que los controles inoculados con Sindbis, sin contener el virus de la rubéola, desarrollan el efecto citopático, mientras que en los cultivos inoculados con productos sospechosos de contener el virus de la rubéola no se presenta el efecto citopático, por lo que concluyeron que el efecto citopático característico no se presenta en aquellos tubos donde la acción del virus interferido por la infección viral previa. La presencia del virus de la rubéola ha sido determinada también con el fenómeno de interferencia utilizando el virus ECHO 11. Asimismo, estos autores indicaron que el virus de la rubéola produce efecto citopático regularmente al adaptarse a algunas líneas celulares.

4) FIJACION DEL COMPLEMENTO.

La fijación del complemento ocurre durante la interacción --

ción del antígeno y sus anticuerpos específicos, fenómeno que ha sido utilizado por largo tiempo para identificar y cuantificar anticuerpos, antígenos o ambos. La prueba se realiza en 2 etapas: en la primera el antígeno y el anticuerpo reaccionan en presencia del complemento y este es consumido (fijado); la segunda etapa consiste en demostrar si quedó complemento libre sin fijar en la primera etapa, lo cual se logra agregando eritrocitos de carnero (hemolisina o amboceptor hemolítico); si el complemento ha sido fijado totalmente por el complejo antígeno-anticuerpo, no se producirá la lisis de los eritrocitos, pero si queda complemento libre porque el antígeno y los anticuerpos no son específicos, entonces si se producirá la lisis de los eritrocitos. Una reacción es positiva cuando no hay hemólisis y es negativa cuando hay hemólisis (19).

B) ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE LOS METODOS INMUNOSEROLÓGICOS UTILIZADOS PARA ANTICUERPOS ANTI-RUBEOLA.

La prueba de inmunofluorescencia (IF) presenta las siguientes ventajas:

- 1) La prueba se puede hacer rápidamente.
- 2) No se requiere tratamiento previo del suero.
- 3) Si la prueba se sigue minuciosamente, el peligro de error técnico por el operador es mínimo.

La prueba de inmunofluorescencia presenta a su vez las siguientes desventajas:

- 1) La prueba IF es menos sensible para determinar el esta

do inmune.

2) El microscopio de inmunofluorescencia es de costo elevado y no está al alcance de muchos laboratorios (21).

La prueba de hemólisis radial simple (HRS) presenta las siguientes ventajas:

1) Requiere pequeñas cantidades de suero, el cual no requiere tratamiento previo para quitar inhibidores inespecíficos o aglutininas naturales.

2) Se requiere menor cantidad de eritrocitos que para la prueba IHA, porque la preabsorción no es necesaria (22).

3) Es un método que utiliza muy poca cantidad de Hemaglutinina viral (23).

La prueba de hemólisis radial simple presenta a su vez las siguientes desventajas:

1) El factor reumatoide (FR) puede interferir en la prueba, pero puede ser eliminado con 2-mercaptoetanol o reducida su actividad calentando a 60 °C por 20 minutos (22).

La prueba de neutralización presenta las siguientes ventajas:

1) Máxima sensibilidad y especificidad, que en este caso no es relevante porque el virus de la rubéola no cruza antígenicamente con otros (4).

La prueba de neutralización presenta a su vez las siguientes desventajas:

1) Es una técnica costosa y que requiere bastante tiempo,

sobre todo si se utiliza el fenómeno de interferencia.

2) La mayoría de los cultivos celulares no producen ECP claro y rápido al ser infectados por el virus de la rubéola.

La prueba de fijación del complemento presenta las siguientes ventajas:

1) Es razonablemente rápida; se obtienen resultados en 24 horas.

La prueba de fijación del complemento presenta a su vez las siguientes desventajas:

1) Es relativamente complicada en su ejecución.

2) No es conveniente para determinaciones de interés epidemiológico, debido a que los anticuerpos fijadores del complemento desaparecen después de cierto tiempo, no tienen valor para conocer el estado inmunitario en la población, de ahí que la prueba puede dar "falsas negativas", en individuos inmunes que ya no tienen anticuerpos fijadores del complemento circulantes (4).

C) GENERALIDADES DE LA PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMA -- GLUTINACION (IHA).

Muchos virus tienen la propiedad de aglutinar eritrocitos de diferentes especies. Esta hemaglutinación puede ser inhibida por cierto tipo de anticuerpos, los cuales bloquean los antígenos responsables de este fenómeno en la superficie del virión.

Esta prueba mide solamente aquellos anticuerpos que se

unen directamente a la hemaglutinina viral (presente en las puntas de las proyecciones de los peplómeros de la mayoría de los virus con envoltura) y posiblemente también a aquellos que se unen a otros antígenos tan estrechamente contiguos a la hemaglutinina que el anticuerpo puede inhibir la hemaglutinación por obstáculo estérico. Estos antígenos superficiales son generalmente de tipo específico.

En el caso de la hemaglutinación del virus de la rubéola, el antígeno responsable de este fenómeno fue demostrado por Stewart en 1967 (4), en cultivos de tejidos infectados con el virus de la rubéola. A partir de su trabajo, muchos autores han desarrollado y estudiado la producción de antígeno en diferentes líneas celulares, y han surgido variantes -- que presentan ventajas y desventajas, por lo que resulta interesante y útil describir someramente el procedimiento utilizado por esos investigadores.

El antígeno fue preparado por Stewart en cultivo de células de riñón de hamster recién nacido (BHK), a las cuales se les agregó de 5 a 10 ml de inóculo conteniendo 10^6 y $10^{7.5}$ de dosis infectantes para cultivo de tejidos ($DICT_{50}$), obtenido en células BHK adaptadas al virus. Después de 3 horas de absorción a $35^{\circ}C$, cada cultivo recibió 40 ml de medio de mantenimiento Eagle conteniendo 2% de suero bovino fetal, inactivado por calor, previamente tratado con caolín para remover inhibidores inespecíficos de la hemaglutinación. En el período de 48 a 96 horas después de la inoculación fueron detectados los títulos máximos de infectividad. El material antigénico

se mantuvo a -70°C y fue sometido a pruebas de actividad hemaglutinante utilizando eritrocitos de diversas especies; pollo de 1 día de nacido, pollo adulto, paloma, ganso, carnero, humanos tipo "O", mono rhesus y cobayo, entre otros. Los títulos más altos fueron obtenidos con eritrocitos de pollo recién nacido.

Para eliminar inhibidores inespecíficos y aglutininas naturales, los sueros fueron tratados por lo menos 1 hora con caolín al 25% lavado con ácido y adsorbido con eritrocitos de pollo de 1 día de nacidos; de esta manera se consideró que los sueros estaban listos para ser utilizados en la prueba IHA, la cual se realizó por microtitulación en placas con cavidades de fondo en "U". Estos investigadores usaron siempre 4 unidades hemaglutinantes, e incluyeron una titulación apropiada del antígeno, sueros control positivo y negativo, control de eritrocitos y control de diluyente de eritrocitos. La interpretación de sus resultados fue hecha considerando como título de anticuerpos IHA a la máxima dilución donde se observó una completa inhibición de la hemaglutinación.

A partir de este trabajo se llevaron a cabo estudios para mejorar el método, enfatizando en encontrar un tratamiento más adecuado para los sueros y asegurar que todos los inhibidores inespecíficos y aglutininas naturales fueran removidas, y así dar un máximo de especificidad al método.

En 1969, Liebhaber (24) encontró problemas asociados con el uso del caolín y de la mezcla heparina/ MnCl_2 (Cooper), afirmando que el caolín no es selectivo para remover inhibido

res inespecíficos, ya que adsorbe varias proteínas séricas, y que debe ser empleado en cantidades estequiométricas; si la cantidad de caolín es pequeña, no se eliminan completamente los inhibidores inespecíficos; por el contrario, agregar una cantidad excesiva remueve las inmunoglobulinas del suero, lo que lleva a emplear diferentes cantidades de caolín y hacer imposible la estandarización del método. En cuanto a la mezcla heparina-MnCl₂, encontró que precipitaban los inhibidores de β-lipoproteínas. En base a esto, Liebhaber desarrolló otro tipo de tratamiento utilizando dextrán sulfato-CaCl₂, con el cual obtuvo resultados con 100% de reproducibilidad, pero tiene el inconveniente de requerir más tiempo.

En 1981, Traavik, Spanne y Mennen (25) reportaron los resultados de un estudio comparativo entre 6 diferentes métodos para eliminar inhibidores inespecíficos del suero: aerosil, caolín, dextrán sulfato-CaCl₂, heparina-MnCl₂, flotación por centrifugación y tratamiento de fosfolipasa C. Los 2 métodos que no remueven inmunoglobulinas (flotación por centrifugación y fosfolipasa C), son sumamente laboriosos y costosos, lo cual es poco recomendable para fines prácticos. Según estos autores noruegos, el procedimiento ideal para excluir inhibidores inespecíficos de HA de rubéola debe remover lipoproteínas completamente con una pérdida mínima de inmunoglobulinas, que pueda permitir la detección de títulos bajos de anticuerpos y ser rápida y simple para realizarlo a un costo razonable.

Los inhibidores más potentes son las lipoproteínas de β₂

ja densidad (LBD), aunque también se encuentra actividad en las lipoproteínas de alta densidad (LAD) y fracciones de lipoproteínas de muy baja densidad (LMBD) del suero. Todas las lipoproteínas del suero deben ser eliminadas antes de la prueba IHA.

Traavik y cols. observaron que las combinaciones anión polivalente-cación divalente (heparina- $MnCl_2$ y dextrán sulfato- $CaCl_2$) dejan inhibidores inespecíficos en la mayoría de los sueros, y en cantidades considerables en algunos de ellos.

Otro inconveniente que observaron fue que el dextrán sulfato- $CaCl_2$ de diferentes pesos moleculares y de diferentes fabricantes muestran efectividades variables. El caolín y el aerosil dejan menos inhibidores inespecíficos y LAD que las 2 combinaciones anión polivalente-cación divalente. El tratamiento con aerosil fue el más efectivo, pero es un material difícil de conseguir en nuestro país; estudios recientes han mostrado que, ocasionalmente el caolín puede dejar inhibidores inespecíficos, pero este trabajo comparativo indica que el tratamiento con caolín es más confiable que las dos combinaciones anión polivalente-cación divalente.

Traavik y cols. concluyen que entre los 4 métodos para exclusión de inhibidores inespecíficos, los tratamientos con aerosil y caolín son los métodos de elección, y afirman que no hay duda de que la prueba IHA es un método adecuado para diagnóstico, seroepidemiología e inmunovigilancia de la rubéola.

D) SISTEMAS INDICADORES.

A través del tiempo diversos autores han empleado una gran variedad de eritrocitos de diferentes especies, entre las cuales destacan los eritrocitos de pollo de 1 día de nacidos y los eritrocitos humanos tipo "O" tripsinizados, debido a que presentan un máximo de aglutinación.

Los eritrocitos de pollo de 1 día de nacidos presentan las siguientes desventajas: la crianza de los pollos o la dificultad para conseguirlos y la incertidumbre de su edad, así como su rápido deterioro; además, los sueros requieren la adsorción con células rojas (26).

Los eritrocitos humanos tipo "O" tripsinizados presentan las siguientes ventajas: son fáciles de conseguir, los sueros no requieren la adsorción con células rojas (26), muestran un buen grado de sensibilidad y reproducibilidad en la detección de anticuerpos (27), y son económicos (28).

CAPITULO III

MATERIAL BIOLÓGICO.

Este trabajo se integró con un grupo (cuyas características se encuentran en la Tabla 2) de 200 muestras de suero de estudiantes de las diferentes escuelas y facultades de la Universidad Nacional Autónoma de México, seleccionados aleatoriamente, a quienes les fue explicado de manera breve el problema que puede acarrear una infección de rubéola durante el embarazo y la importancia de conocer la seroprotección de cada individuo.

Una vez conocido el problema por cada uno, voluntariamente aceptaron su participación en el estudio.

Cada paciente fue citado en el Laboratorio de Inmunología de la Dirección General de Servicios Médicos (DGSM), Ciudad Universitaria, en ayunas para obtener su muestra sanguínea de 5 ml por venopunción de las venas basílica o cefálica en la cara anterior del antebrazo.

Cada muestra fue incubada a temperatura ambiente por una hora para obtener la retracción del coágulo; después se separó el suero de las células sanguíneas por centrifugación a 2000 r.p.m. durante 10 minutos y cada muestra de suero fue enumerada siguiendo un orden cronológico y almacenada a -20°C hasta el momento de realizar la prueba de inhibición de la hmaglutinación, que fue la utilizada en este trabajo.

1.-REACTIVOS.

TABLA 2. CLASIFICACION POR FACULTAD O ESCUELA, SEXO Y EDAD

FACULTAD O ESCUELA	H	15-19	20-24	25-34 años
Arquitectura	6	-	3	3
Ciencias	5	-	4	1
Ciencias Políticas y Sociales	4	2	1	1
Contaduría y Admi- nistración	6	-	4	2
Derecho	2	-	2	-
Economía	3	-	1	2
Esc. de Trabajo Social	1	-	-	1
Filosofía y Letras	2	1	-	-
Ingeniería	17	7	7	3
Medicina	3	1	2	-
Psicología	2	-	1	1
Química	5	-	4	1
Veterinaria	3	1	2	-
ENEP. Acatlán	1	-	1	-
ENEP. Aragón	1	-	1	-
ENEP. Cuautitlán	1	-	1	-
ENEP. Zaragoza	1	-	-	1
Esc. Nat. Prep. 7	1	-	1	-
C.C.H. Atzacapotzalco	1	-	1	-
C.C.H. Sur	6	5	1	-
C.C.H. Vallejo	1	1	-	-
Sin Datos	4	-	-	-
TOTAL=	76	18	36	18

TABLA 2. (CONT.)

FACULTAD O ESCUELA	M	15-19	20-24	25-34 años
Arquitectura	2	-	2	-
Ciencias	8	-	7	1
Ciencias Políticas y Sociales	9	3	6	-
Contaduría y Admi- nistración	10	2	8	-
Derecho	8	1	7	-
Economía	1	-	1	-
Esc. de Trabajo Social	12	5	7	-
Filosofía y Letras	15	4	10	1
Ingeniería	1	1	-	-
Medicina	14	8	5	1
Odontología	3	3	-	-
Psicología	7	-	5	2
Química	12	8	4	-
ENEP. Iztacala	1	-	1	-
ENEP. Zaragoza	2	-	2	-
Esc. Nat. Prep. 1	1	1	-	-
Esc. Nat. Prep. 2	1	-	1	-
Esc. Nat. Prep. 5	1	-	-	1
C.C.H. Naucalpan	1	1	-	-
C.C.H. Oriente	1	1	-	-
C.C.H. Sur	4	3	1	-
Sin Datos	10	-	-	-
TOTAL	124	39	69	6

A) El antígeno hemaglutinante para rubéola fue preparado en el Laboratorio de Virología, INCYTAS-DIF y fue proporcionado para el presente estudio. Se utilizaron 2 lotes diferentes cuyos títulos fueron corroborados para poder calcular la dilución apropiada para obtener una cantidad de aglutinina equivalente a 4 unidades de hemaglutinina (4 UHA) por unidad de volumen.

B) DILUYENTES.

B-1) AULETA:

NaCl-----0.9 gr.
CaCl₂ anhidro-----0.1 gr.
MgSO₄ 7H₂O-----0.1 gr.
H₂O dest. c.b.p.-----100 ml.

Disolver todas las sustancias en 50 ml de agua destilada, aforar a 100 ml. Mantener a 4°C hasta su uso.

B-2) CANN:

NaCl-----0.9 gr.
CaCl₂ anhidro-----0.1 gr.
MgSO₄ 7H₂O-----0.1 gr.

Sol. de albúmina bovina al 7.5% -----1 ml.

H₂O dest. c.b.p.-----100 ml.

Disolver todas las sustancias en 50 ml de agua destilada, agregar sol. de albúmina bovina al 7.5% y aforar a 100 ml. Mantener a 4°C hasta su uso.

C) ANTICOAGULANTE EDTA DIPOTASICA, SOLUCION DIPOTASICA AL

EDTA Dipotásica-----1 gr.

H₂O dest. c.b.p.-----100 ml.

La solución así preparada contiene 1 mg por cada 0.1 ml de solución. La concentración apropiada para usarse como anti coagulante es de 1 mg de EDTA para 1 ml de sangre. A esta con centración se evita en forma efectiva la coagulación sin que ocurran cambios en el volumen celular.

D)CAOLIN;

El caolín contiene impurezas que pueden afectar su capa cidad adsorbente; se les puede eliminar por tratamiento con solución de HCl, de la siguiente manera:

- 1)Preparar 500 ml de HCl al 50% en agua destilada.
- 2)Agregar 500 gr. de caolín no tratado.
- 3)Hervir durante 2 horas y dejar que enfríe.
- 4)Dejar en reposo hasta separación completa del caolín y de la fase acuosa, que toma un color amarillento.
- 5)Decantar y descartar el sobrenadante.
- 6)Agregar agua destilada hasta un volumen igual al ini cial. Mezclar muy bien y repetir los pasos 4 y 5.
- 7)Agregar nuevamente agua destilada para lavar el cao lín, y repetir cuantas veces sea necesario para lograr que el sobrenadante resulte completamente limpio (pH constante).
- 8)Separar el caolín ya perfectamente lavado, por centri fugación o filtración, y dejarlo secar en estufa a 37°C.
- 9)Preparar una suspensión al 25% en solución amortiguado q ra de borato, pH 9.

10) Conservar en refrigeración.

E) PREPARACION DE LOS ERITROCITOS HUMANOS TIPO "O" TRIPSINIZADOS AL 0.4%.

Los eritrocitos humanos fueron obtenidos de diferentes lotes de donadores utilizando EDTA como anticoagulante; la sangre así obtenida se mezcla perfectamente agitando el tubo con movimientos rotatorios suaves.

Los eritrocitos de los diferentes lotes de donadores fueron tipificados para seleccionar aquellos que fueren "O" Rh (+). Con 4 de éstos como mínimo se hace una mezcla para dar mayor sensibilidad a la prueba IHA.

Los eritrocitos se lavan 3 veces en Auleta, centrifugándolos cada vez durante 10 minutos a 2500 r.p.m. Al finalizar se descarta el sobrenadante, y el paquete celular es ajustado a una concentración del 10% en Auleta.

La tripsinización se lleva a cabo agregando, por cada ml de la suspensión de eritrocitos al 10%, 0.1 ml de tripsina al 1% en PBS sin iones Ca^{++} - Mg^{++} . La suspensión se mezcla perfectamente y se deja a temperatura ambiente durante 1 hora agitando cada 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se lavan los eritrocitos tripsinizados con Auleta (3 veces) y son nuevamente reajustados a una concentración del 10% con Auleta. Cada vez que se utilicen los eritrocitos, la concentración se deberá ajustar al 0.4% con Canm.

2.-METODO.

Las pruebas se llevaron a cabo en placas de 96 cavidades de fondo en "U" y se utilizaron micropipetas de 0.025 ml y microdilutores de la misma calibración.

A) TITULACION DEL ANTIGENO.

Los 2 lotes de antígeno de rubéola preparados por el Laboratorio de Virología, INCYTAS-DIF, con títulos 1:16 y -- 1:128, fueron titulados por duplicado para corroborar dichos títulos por medio de la técnica que a continuación se describe:

1) Se agregan 0.025 ml de diluyente de Canna a cada una de las 10 cavidades de la placa.

2) Con el microdilutor de 0.025 ml se coloca este volumen de antígeno en la primera cavidad; se mezcla perfectamente - con movimientos rotatorios suaves y se pasa el microdilutor a la siguiente cavidad y así sucesivamente hasta la décima cavidad, descartándose esta última.

3) En 3 cavidades vacías se colocan 0.025 ml de Canna para el control de eritrocitos.

4) Se agregan 0.05 ml de eritrocitos tipo "O" tripsinizados a concentración del 0.4% a cada una de las cavidades, tan to las que contienen el antígeno como las que van a ser usadas como control de eritrocitos.

5) La placa se mezcla perfectamente con golpes pequeños - alrededor de ella y se cubre con papel aluminio. Se deja a - temperatura ambiente durante 1 hora.

6) Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

Una unidad hemaglutinante (UHA) está contenida en la mayor dilución del antígeno capaz de producir hemaglutinación completa.

Después de corroborar los títulos es conveniente utilizar los antígenos inmediatamente o guardarlos en congelación, de preferencia a -60 °C, debido a que se ha comprobado que es termolábil, por lo cual se corre el riesgo de que el título original disminuya si no se conserva en condiciones adecuadas; por esto mismo se recomienda llevar a cabo la titulación en hielo.

B) TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SUERO.

Los sueros deben ser tratados con caolín para eliminar inhibidores inespecíficos de carácter lipoproteico, que afectarían los resultados produciendo "falsas positivas". El tratamiento se lleva a cabo de la siguiente manera:

- 1) Se toman 0.1 ml de suero problema en tubos de 12X75 mm
- 2) Se agregan 0.3 ml de la suspensión de caolín al 25%.
- 3) Los tubos se agitan vigorosamente y se dejan en reposo durante 20 minutos, agitándolos cada 10 minutos.
- 4) Transcurrido este tiempo, los tubos son centrifugados a 3000 r.p.m. durante 15 minutos.
- 5) Se decanta el suero ya libre de inhibidores inespecíficos a tubos de 12X75 mm.
- 6) Los tubos son colocados en baño María de 56 °C durante 30 minutos con el objeto de decomplexar.
- 7) Después de transcurrido este tiempo se procede a non -

tar la técnica.

C) PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION (IHA).

1) Se agregan 0.025 ml de diluyente de Canm a todas las cavidades de la placa formada por 12 hileras, utilizando ésta en forma horizontal.

2) Con los microdilutores se coloca el mismo volumen de cada suero problema en cada una de 8 hileras; se mezcla perfectamente con movimientos rotatorios suaves y se pasan los microdilutores a las siguientes cavidades sucesivamente hasta las últimas cavidades; la última dilución se desecha.

3) Los controles (+) y (-) se tratan de la misma manera que los sueros problema en las hileras 9 y 10; la 11 y 12 se usarán para controles de antígeno y eritrocitos.

4) Se requieren 0.025 ml de antígeno, con concentración de 4 UHA que requiere la técnica, por lo que se hacen los siguientes cálculos:

Título del primer antígeno: 1:16 (1 UHA).

Título del antígeno = 16 = Dilución 1:4 (4 UHA).

Número de UHA deseadas 4

Título del segundo antígeno: 1:128 (1 UHA).

Título del antígeno = 128 = Dilución 1:32 (4 UHA).

Número de UHA deseadas 4

5) Se hace la dilución del antígeno, basado en los cálculos anteriores, con diluyente de Canm.

6) Se agregan 0.025 ml de antígeno a todas las cavidades de las primeras 10 hileras con excepción de la última cavidad

de cada hilera que se utiliza como control de suero problema tratado.

7)Control de antígeno: Se agregan 0.025 ml de antígeno a las 2 primeras cavidades de la hilera 11; con un microdilutor, se hacen las diluciones a partir de la segunda cavidad hasta la quinta cavidad.

8)Se agita la placa como se describió anteriormente y se deja a temperatura ambiente por una hora.

9)Posteriormente se agregan 0.05 ml de eritrocitos humanos tipo "0" tripsinizados a una concentración del 0.4% a todas las cavidades de la placa, incluyendo los controles (+), (-), suero, antígeno y eritrocitos (hilera 12).

10)Se agita la placa, y se cubre con papel aluminio y se deja a temperatura ambiente 1 hora.

Para saber si los resultados son confiables es necesario que los controles tengan las siguientes características:

a)Control positivo: Para este control se utilizó un suero de título conocido (1:32), el cual no debe variar en más de una dilución del título ya conocido.

b)Control negativo: Inicialmente se utilizó como control negativo, solución salina isotónica hasta que se encontró un suero negativo, el cual no debe presentar inhibición de la hemaglutinación en ninguna dilución, o sea debe observarse hemaglutinación completa.

c)Control de antígeno: Las cavidades 1, 2 y 3 deberán presentar hemaglutinación completa ya que con esto se demuestra que se está trabajando con 4 UHA.

d)Control de eritrocitos: No debe haber hemaglutinación, solo deberá formarse un botón compacto en el fondo de la cavidad debido a la sedimentación natural de los eritrocitos.

e)Control de suero: No debe haber hemaglutinación, solo deberá formarse un botón compacto en el fondo de la cavidad, demostrándose así que el suero problema no presenta aglutininas inespecíficas.

f)Lectura del título e Interpretación de Resultados: La dilución más alta del suero que produce completa inhibición de la hemaglutinación se considera el título de anticuerpos presentes en el suero. Los títulos 1:8 ó mayores fueron considerados positivos, y negativos los títulos menores de 1:8.

CAPITULO IV

RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en la investigación serológica de inmunidad para la rubéola, llevada a cabo en un grupo de población de la Universidad Nacional Autónoma de México en sus diferentes escuelas y facultades, se resumen en los cuadros siguientes.

CUADRO 1. Niveles de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación en la población estudiada, por grupos de edad.

H Y M	NEGATIVO	1:8	1:16	1:32	1:64	TOTAL
15-19	8	21	19	8	1	57
20-24	18	33	33	19	2	105
25-34	3	5	12	4	0	24
Sin Datos	2	3	6	3	0	14
TOTAL	31	62	70	34	3	200
%	15.5	31	35	17	1.5	100

Como se puede observar el mayor porcentaje correspondió - al grupo de 20-24 años con 105 participantes (52.5%), y en orden progresivo descendente los siguientes grupos: de 15-19, - con 57 participantes (28.5%); de 25-34 con 24 participantes - (12%) y el grupo cuyos datos se desconocen con 14 participan - tes (7%).

En el cuadro 1 también se presentan los niveles de anti - cuerpos inhibidores de la hemaglutinación que se obtuvieron en este estudio, observándose que los títulos de 1:16 fueron los más frecuentes y se presentaron en 70 personas (35%); y luego

los de título 1:8, de los cuales se encontraron 62 individuos (31%). La proporción de seronegativos fue de 15.5%.

Para poder apreciar de manera distintiva la seroprotección de los participantes en este estudio, se elaboraron 2 cuadros para comparar los resultados de los niveles de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación, de acuerdo al sexo.

CUADRO 2. Estado inmunológico para la rubéola en el grupo de población masculina estudiado en la Universidad Nacional Autónoma de México.

H	NEGATIVO	1:8	1:16	1:32	1:64	TOTAL
15-19	2	7	8	1	0	18
20-24	7	8	14	7	0	36
25-34	3	2	11	2	0	18
Sin Datos	0	1	3	0	0	4
TOTAL	12	18	36	10	0	76
%	15.8	23.7	47.4	13.1	-	100

CUADRO 3. Estado inmunológico para la rubéola en el grupo de población femenina estudiado en la Universidad Nacional Autónoma de México.

M	NEGATIVO	1:8	1:16	1:32	1:64	TOTAL
15-19	6	14	11	7	1	39
20-24	11	25	19	12	2	69
25-34	0	3	1	2	0	6
Sin Datos	2	2	3	3	0	10
TOTAL	19	44	34	24	3	124
%	15.3	35.5	27.4	19.4	2.4	100

En una comparación de los cuadros 2 y 3, se observa que la proporción de seronegativos es muy similar; en cambio, para el título 1:16 se observa una proporción mayor en hombres que en mujeres. No tenemos una explicación para tales diferencias con respecto a las reportadas previamente en la literatura biomédica. Por otra parte, consideramos que la muestra es representativa de la población estudiada, aún cuando es heterogénea por proceder de un gran número de escuelas y facultades.

CUADRO 4. Distribución de Susceptibilidad por grupos de edad del sexo masculino *.

	SUSCEPTIBLES		NO SUSCEPTIBLES	
15-19	2	11.1%	16	88.9%
20-24	7	19.4%	29	80.6%
25-34	3	16.7%	15	83.3%
Sin Datos	0	-	4	100%
TOTAL	12	15.8%	64	84.2%

CUADRO 5. Distribución de Susceptibilidad por grupos de edad del sexo femenino *.

	SUSCEPTIBLES		NO SUSCEPTIBLES	
15-19	6	15.4%	33	84.6%
20-24	11	15.9%	58	84.1%
25-34	0	-	6	100%
Sin Datos	2	20%	8	80%
TOTAL	19	15.3%	105	84.7%

*Proporciones relativas al total de individuos de cada grupo de edad.

Comparando los cuadros 4 y 5, se observa que en el grupo de mujeres hay menos susceptibilidad con respecto al grupo de hombres, aunque la diferencia es muy pequeña. En el grupo de hombres la mayor susceptibilidad se encuentra en el grupo de edad de 20-24 años mientras que en el grupo de mujeres la mayor susceptibilidad se encuentra en los grupos de 15-19 y -- 20-24 años ya que la proporción es muy similar.

CONCLUSIONES

Esta encuesta serológica realizada en un grupo de 200 estudiantes universitarios, muestra un patrón de anticuerpos contra la rubéola que indica una alta inmunidad.

El grupo en estudio quedó comprendido entre los 15 y 34 años de edad, correspondiendo la mayor proporción al grupo de 20-24 años de edad (52.5%).

La proporción de individuos seronegativos (15.5%) es un poco más elevada que la obtenida en otros estudios serológicos similares, lo cual podría explicarse por el tipo de población estudiada. En relación a otros países, la frecuencia de seropositivos (84.5%) en población universitaria es relativamente alta; consecuentemente, la probabilidad de diseminación del virus de la rubéola es baja, como parece desprenderse del hecho de que no se hayan registrado situaciones epidémicas en la comunidad universitaria, sino únicamente casos aislados.

La mayor parte de los seropositivos tuvieron un título de 1:16, utilizando 2 Unidades hemaglutinantes en la prueba.

Si bien solamente el 15.3% de la muestra de la población femenina estudiada resultó susceptible a la infección por este virus, consideramos conveniente que las jóvenes universitarias, todas en edad fértil, conozcan su condición inmunitaria en relación a la rubéola, puesto que las susceptibles (seronegativas) pueden vacunarse oportunamente antes de iniciar un embarazo, eliminando así el riesgo de una infección in útero del embrión, así como sus graves consecuencias: el Síndrome de la

Rubéola Congénita.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Lawless, M.R., Abramson, J.S., Harlan, J.E., Kelsey, D.S. Rubella susceptibility in sixth graders: effectiveness of current immunization practice. *J. Pediatr.* 65: 1086-1089, 1980.
- 2) Calderón Jaimes, E. *Conceptos Clínicos de Infectología*. págs. 13-21. Ed. Francisco Méndez Cervantes. Quinta edición. México, 1978.
- 3) Villarejos, V.M. Notas sobre patogenia, epidemiología y control de la rubéola. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* 59: 511-519, 1970.
- 4) Stewart, G.L., Parkman, P.D., Hopps, H.E., Douglas, R.D., et al. Rubella virus hemagglutination-inhibition test. *N. Engl. J. Med.* 276: 554-557, 1967.
- 5) Merck Manual. Congenital Rubella. pág 1010. 13th. edition. - Rhaway N.J., 1977.
- 6) Kumate, J., Gutiérrez, G. *Manual de Infectología*. págs. 233-239. Ediciones del Hospital Infantil de México. Sexta edición. México, 1978.
- 7) Nelson, W.E. *Tratado de Pediatría*. págs. 559-561. Ed. Salvat. Cuarta edición. México, 1962.
- 8) Lennette, R.H., Schmidt, N.J. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*. págs 720-760. American Public Health Association, Inc. N.Y. 5th. edition. 1979.
- 9) Levine, J.B., Berkowitz, C.D., Geme, J.W. St. Rubella virus re infection during pregnancy leading to late onset congenital rubella syndrome. *J. Pediatr.* 100: 589-590, 1982.

- 10) Dudgeon, J.A. Vacunas Antirubélicas. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana 74: 411-423, 1973.
- 11) Veda, K. Low birth weight and congenital rubella syndrome: effect of gestational age at time of maternal rubella infection. J. Clin. Pediatr. 20: 703-707, 1978.
- 12) Ordóñez, B.R. Frecuencia de Rubéola en México. Salud Pública de México 11: 731-740, 1969.
- 13) Moisés, A., Gutiérrez, G., Garcilazo, J. Estudio Inmunológico de la Rubéola en un grupo de alumnas de la Universidad Iberoamericana, Ciudad de México. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana 71: 402-410, 1971.
- 14) Martín Sosa, S., Magaña, M.C. Encuesta de anticuerpos contra la rubéola en estudiantes universitarias. Bol. Med. Hosp. -- Infant. 31: 1165-1170, 1974.
- 15) Ruiz Gómez, J., Espinosa-Larios, E.L. Seroepidemiología del sarampión, rubéola y parotiditis en la República Mexicana. Salud Pública de México 20: 29-33, 1978.
- 16) Figueroa, M.S., Núñez, D. Evaluación clínico-serológica de una vacuna contra la rubéola. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana 72: 244-249, 1972.
- 17) Villarejos, V.M., Arguedas, J.A., Vargas, O.N., Cortés, M.A. Estudio de la efectividad y seguridad de la vacuna contra la rubéola. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana 70: 174-180, 1971.
- 18) Barret, J.T. Inmunología. págs. 111-115. Ed. Interamericana. Primera edición. México, 1970.
- 19) Fudenberg, H.H., Stites, D.P., Caldwell, J.L., Wells, J.V.

Immunología Clínica. págs. 389-419. Ed. El Manual Moderno. Segunda edición. México, 1980.

20) Furesz, J., Moreau, P., Yarosh, W. A micro tissue culture test for the titration and neutralization of rubella virus. Can. J. Microbiol. 15: 67-71, 1969.

21) Cremer, N.E., Hagens, S.J., Cossen, C. Comparison of the hemagglutination inhibition test and an indirect fluorescent-antibody test for detection of antibody to rubella virus in human sera. J. Clin. Microbiol. 11: 746-747, 1980.

22) Gee, B., Jordan, B.E., Mortimer, P.R. An assessment of radial haemolysis in the detection of rubella antibody. J. Clin. Pathol. 31: 35-39, 1978.

23) Degreé, J. Rubella screening by haemolysis-in-gel-test. Lancet 2: 644-647, 1979.

24) Liebhaber, H. Measurement of rubella antibody by hemagglutination inhibition. II. Characteristics of an improved HAI test employing a new method for the removal of non immunoglobulin-HA inhibitors from serum. J. Immunol. 104: 826-834, 1970.

25) Traavik, T., Spanne, O., Mennen, S. Rubella serology: a comparison of four methods for exclusion of non-specific serum inhibitors. J. Hyg. 86: 315-327, 1980.

26) Bannerman, C.M., Ross, C.A.C. Trypsin-treated human erythrocytes for rubella haemagglutination inhibition tests. J. Clin. Pathol. 26: 807-808, 1973.

27) Schmidt, N.J., Dennis, J. Modified hemagglutination-inhibition test for rubella employing human group O erythrocytes. Appl. Microbiol. 23: 471-475, 1972.

- 28) McCartney, A. A non specific agglutination problem in the rubella haemagglutination-inhibition test using trypsinised human red cells. *J. Clin. Pathol.* 32: 93-95, 1979.
- 29) Preblud, S.P. Rubella hemagglutination inhibition titers. *JAMA.* 247: 1911-1913, 1982.
- 30) Herrman, K.L. Rubella antibody persistence after immunization. *JAMA.* 247: 193-195, 1978.
- 31) Birch, C.J., Glaun, B.P., Hunt, V., Irving, L.G., Gust, I.D. Comparison of passive haemagglutination and haemagglutination-inhibition techniques for detection of antibodies to rubella virus. *J. Clin. Pathol.* 32: 128-131, 1979.
- 32) Morgan-Capner, P. Radial hemolysis for rubella antibody screening. *Lancet* 2: 196-197, 1979.
- 33) Morgan-Capner, P., Pullen, H.J.M., Pattison, J.R., Bidwell, D.E., et. al. A comparison of three tests for rubella antibody screening. *J. Clin. Pathol.* 32: 542-543, 1979.
- 34) Roberts, P.C., Hobbs, S.J. Evaluation of a new test system for rubella haemagglutination inhibiting antibodies. *J. Clin. Pathol.* 30: 1011-1013, 1977.
- 35) Ankerst, J., Christensen, P., Kjellén, L., Kronvall, G.A. A routine diagnostic test for IgA and IgM antibodies to rubella virus: absorption of IgG with *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 130: 268-273, 1974.
- 36) Quirin, E.P., Nelson, D.B., Inhorn, S.L. Use of trypsin-modified human erythrocytes in rubella hemagglutination inhibition testing. *Appl. Microbiol.* 24: 353-357, 1972.
- 37) Mortimer, P.P., Jordan, S.M., Smidt, I.V. Simplified method

for the rubella haemagglutination inhibition screening test. *J. Clin. Pathol.* 30: 623-625, 1977.

38) Polk, F., White, J.A., DeGirolami, P.C., Modlin, J.F. An outbreak of rubella among hospital personnel. *N. Engl. J. Med.* -- 303: 541-545, 1980.

39) Philbrook, F.R., Ingalls, T.H. Risk of contact infection after intranasal rubella vaccination. *Lancet* 2: 147-148, 1980.

40) Orenstein, W.A., Greaves, W.L. Congenital rubella syndrome: a continuing problem. *JAMA.* 247: 1174-1175, 1982.

41) O'Shea, S., Parsons, G., Best, J.M., Banatvala, J.E. How -- do low levels of rubella antibody protect? *Lancet* 2: 1284-1285, 1981.

42) Butler, A.B., Scott, R.M., Schydlower, J., et. al. The immunoglobulins response to reimmunization with rubella vaccine. *J. Pediatr.* 99: 531-534, 1981.

43) Losonsky, G.A., Fishaut, J.M., Strossenberg, J., Ogra, P.L. Effect of immunization against rubella on lactation products. II. Maternal-neonatal interactions. *J. Infect. Dis.* 145: 661-665, 1982.

44) Losonsky, G.A., Fishaut, J.M., Strossenberg, J., Ogra, P.L. Effect of immunization against rubella on lactation products. I. Development and characterization of specific immunologic -- reactivity in breast milk. *J. Infect. Dis.* 145: 654-660, 1982.

45) Ehrlich, L.H. Congenital rubella syndrome. *Arch. Ophthalmol.* 99: 1867-1868, 1981.