

25



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**



**EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA**

**T E S I S**

**" DETERMINACION DE LA PROTECCION INMUNE  
CONTRA RUBEOLA EN UNA MUESTRA PILOTO  
DE MUJERES EN EDAD DE CONCEBIR "**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**GLORIA CID ACUÑA**

**1987**



## **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 está 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
<b>CAPITULO UNO</b>	
<b>INTRODUCCION</b> .....	1
<b>CAPITULO DOS</b>	
<b>GENERALIDADES</b>	
2.1 Antecedentes históricos.....	4
2.2 Características morfológicas.....	5
2.3 Clasificación.....	5
2.4 Propiedades físicas y químicas.....	6
2.5 Constitución antigénica.....	6
2.6 Patogénesis.....	6
2.7 Respuesta Inmunológica.....	10
2.8 Diagnóstico de Laboratorio.....	11
2.8.1 Técnicas para el diagnóstico de la Rubéola.....	14
2.9 Selección de la técnica en nuestro estudio.....	15
2.10 Técnica de la Inhibición de la Hemaglutinación (IHA)..	16
2.10.1 Fundamento de la IHA.....	16
2.10.2 Factores que tienen influencia sobre la aglutinación viral.....	17
A. Virus	
- Título.....	17
B. Eritrocitos	
- Especie del donador.....	17
- Edad del donador.....	18
- Cantidad de eritrocitos.....	18
C. Suero	
- Aglutininas.....	18
- Inhibidores inespecíficos.....	18
D. Otros factores	
- Temperatura.....	19
- Diluyentes.....	19

	Página
2.11 Nivel de anticuerpos anti-rubéola que confieren protección.....	19
2.12 Control de la Rubéola.....	20
2.13 Políticas de Inmunización.....	22
2.13.1 Inmunización Universal.....	22
2.13.2 Inmunización Selectiva.....	23
2.14 Epidemiología.....	24
2.15 Situación en México.....	27

### CAPITULO TRES

#### MATERIAL Y METODOS

3.1 Población estudiada.....	30
3.2 Muestras Clínicas.....	31
3.3 Estimación del tamaño de la muestra.....	31
3.4 Diagrama de trabajo.....	34
3.5 Materiales requeridos para la prueba.....	35
A. Equipo.....	35
B. Reactivos.....	35
3.6 Obtención de eritrocitos.....	40
3.7 Lavado de las Células.....	42
3.8 Eliminación de aglutininas e inhibidores inespecíficos.	45
3.9 Re-tratamiento de los sueros para retirar las aglutininas e inhibidores inespecíficos.....	45
3.10 Estandarización de la suspensión de eritrocitos.....	46
3.11 Titulación del antígeno.....	49
3.12 Realización de la Inhibición de la Hemaglutinación....	54

### CAPITULO CUATRO

RESULTADOS .....	62
------------------	----

### CAPITULO CINCO

DISCUSION .....	76
-----------------	----

	Página
<b>CAPITULO SEIS</b>	
<b>RESUMEN .....</b>	<b>81</b>
<b>CAPITULO SIETE</b>	
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>83</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>87</b>

## CAPITULO UNO

### INTRODUCCION

La infección por rubéola se considera un problema de salud pública debido al riesgo de infección del feto y a los defectos congénitos subsecuentes que involucran principalmente padecimientos en el ojo, corazón, cerebro y oído. Virtualmente cada órgano del feto es afectado en una u otra forma y las anomalías múltiples son la regla más que la excepción (58).

Cuando una mujer embarazada susceptible sufre un contacto con el virus, el riesgo de infección durante las primeras ocho semanas de gestación es del 83% al 90%, este porcentaje disminuye al 32% cuando la infección ocurre durante las 9-12 semanas de embarazo y de aproximadamente del 16% cuando la infección ocurre entre las 13-20 semanas (2).

La infección es notificable en la mayoría de los países, pero más del 50% de las infecciones son inaparentes o se diagnostican erróneamente; en general, una gran parte de la población se infecta antes de la pubertad, pero aproximadamente el 20% de los adultos pueden permanecer susceptibles (2).

Para conocer los problemas de salud que tiene una comunidad es necesario recurrir a los índices de morbilidad y mortalidad, sin embargo estos índices merecen crédito variable, según el lugar y la enfermedad de que se trate, dadas las dificultades existentes en muchas zonas, tanto en lo referente al diagnóstico, a la notificación de casos, como el registro de muertes. Debido a esto, es necesario recoger otro tipo de información que com-

plemente a la anterior, tal como la que proporcionan las encuestas seroepi-  
demiológicas (22). Estas aportan indicios sobre la actividad pasada o pre-  
sente de una infección y ofrecen una base para evaluar su prevalencia y  
distribución; además proporcionan información sobre las curvas de distribu-  
ción de anticuerpos en las distintas edades y el estado de inmunidad en  
que se encuentra la población en estudio (22).

En nuestro país no existen publicaciones en las que se señale a la ru-  
bóla congénita como un problema serio y considerando que esto puede deber-  
se a la falta de un estudio profundo, puede suponerse que, como otras en-  
fermedades virales, la rubóla se adquiere en su forma clínica o subclíni-  
ca a edades muy tempranas (40).

Para que un país clasifique a la rubóla como problema epidemiológico  
es necesario: a) establecer una relación entre susceptibilidad y el pa-  
trón de edad fértil; b) determinar la incidencia de rubóla congénita y  
c) que los servicios de salud posean la capacidad para desarrollar un pro-  
grama de inmunización y mantener un sistema de vigilancia para determinar  
este impacto (54).

Debido a que la rubóla congénita no parece representar un problema  
serio y que nuestro país enfrenta otras situaciones de salud que adquisi-  
ren prioridad, no se ha recomendado la vacunación masiva anti-rubóla. Lo  
que se ha sugerido es la extensión de la prueba de inhibición de la Hema-  
glutinación (IHA) a un mayor número de laboratorios, con la finalidad de  
determinar si se requiere vacunar a las mujeres susceptibles (40).

La información estadística sobre enfermedades transmisibles en Méxi-  
co, señala que la incidencia de rubóla se ha incrementado en los últimos

años (6, 7).

El objetivo de este trabajo fue determinar en un grupo piloto el porcentaje de mujeres en edad de concebir (18-35 años) susceptibles a la infección por rubéola.

Para realizar esta investigación se utilizó la técnica de la Inhibición de la Hemaglutinación (IMA); la cual es la prueba de elección para realizar encuestas seroepidemiológicas para el virus de la rubéola. Esta técnica ofrece resultados reproducibles si se controla cada parámetro que interviene en la prueba. Los títulos obtenidos se expresan en Unidades Internacionales por mililitro (UI/ml).



## CAPITULO DOS

### GENERALIDADES

#### 2.1. ANTECEDENTES HISTORICOS.

La rubéola fué descrita por primera vez en Inglaterra en 1815 por George Maton, quien señaló las características que la distinguen de la fiebre escarlatina y sarampión (12, 17, 28).

A principios del siglo XIX, médicos alemanes describieron una entidad diferente del sarampión a la que denominaron "Rothein" y fué Veale en 1886 quien propuso el término más eufónico de "Rubella" que en castellano ha pasado como Rubéola (28).

La era contemporánea de la rubéola comienza en 1941, en ese año un oftalmólogo australiano llamado Norman M. Gregg, notó que un alto porcentaje de niños con cataratas congénitas presentaban como dato característico importante, el que sus madres tenían el antecedente de haber presentado un cuadro compatible con rubéola durante el primer trimestre del embarazo (2, 12, 28).

En 1962 dos grupos de investigadores, Parkman y col. y Waller y Neva en forma simultánea pero independientemente, reportaron el aislamiento del virus de la rubéola en cultivos celulares (17, 28).

Una epidemia de rubéola (1963-1965) distribuida en varias partes del mundo, sirvió para comprobar la magnitud del problema y estimuló esfuerzos para desarrollar vacunas seguras y efectivas (17).

En 1967, Stewart desarrolló la técnica de la Inhibición de la Hemaglutinación (INA) la cual ha sido ampliamente utilizada para realizar encuestas seroepidemiológicas y en la actualidad es la técnica de referencia para el diagnóstico de la rubéola (17, 56).

En 1969, tres vacunas de virus de la rubéola atenuados fueron aprobadas para su uso en humanos, estas son: la HPV-77 desarrollada por Parkin y Mayer, la Cendehill desarrollada por Byggsen y Pintermans y la RA27/3 por Plotkin (17).

## 2.2. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS.

El virus de la rubéola es una partícula esférica con envoltura, tiene 50-60 nm de diámetro y simetría icosaédrica. Contiene RNA de una sola cadena con coeficiente de sedimentación de 42S y con un peso molecular de  $3.5 \times 10^6$  daltons. Está constituido por tres proteínas estructurales: E1(60K), E2(47K) y C(33K); dos de estas proteínas. E1 y E2, son glucoproteínas de la membrana, E1 es la responsable de la actividad hemaglutinante del virus, mientras que C está asociada con el RNA del virus (17, 60, 61).

## 2.3. CLASIFICACION.

El virus de la rubéola está incluido dentro de la familia Togaviridae, es el único miembro del género Rubivirus. Hasta la fecha solo se conoce un serotipo (60).

#### 2.4. PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS.

El virus de la rubéola es inactiva rápidamente a pH extremos (<6.8->8.1), luz ultravioleta, éter, cloroformo, óxidos de etileno, beta-propiolactona y el desoxicolato de sodio; su infectividad la pierde calentando a 56°C por 30 min, permanece estable por una semana a 4°C, su título hemaglutinante lo retiene indefinidamente a -60°C y puede ser liofilizado sin que experimente ningún daño (14, 17).

#### 2.5. CONSTITUCION ANTIGENICA.

Estudios sobre la purificación del virus de la rubéola revelan antígenos asociados con la membrana viral y la nucleoproteína. Estos antígenos incluyen la hemaglutinina, antígenos que reaccionan en la prueba de fijación del complemento, antígenos que provocan la agregación de plaquetas y los precipitinógenos. También se ha caracterizado el antígeno responsable de la actividad naturalizante del virus (17, 20).

#### 2.6. PATOGENESIS.

La infección por el virus de la rubéola produce esencialmente dos entidades clínicas, la rubéola congénita y la rubéola adquirida después del nacimiento (23).

Clinicamente la rubéola adquirida es una enfermedad exantemática leve que ocurre principalmente en la infancia pero que puede presentarse a cualquier edad. Aproximadamente un 25% a 50% de las infecciones son subclínicas (9).

La vía de entrada es a través del aparato respiratorio con diseminación hacia tejidos linfáticos y torrente circulatorio. El período de incubación es aproximadamente de 16 a 18 días con síntomas mínimos. El exantema aparece primero en la cara y luego se disemina hacia cuello, tronco y extremidades; precediendo y acompañando al exantema se presenta linfadenopatía que puede involucrar a los ganglios retroauriculares, suboccipitales y cervicales (63).

Las complicaciones mayores son raras, la artralgia y la artritis son las más comunes en los adultos jóvenes, particularmente en mujeres y la frecuencia con que se presentan aumenta con la edad (63).

La infección por rubéola en mujeres embarazadas ocasiona con frecuencia una infección de rubéola congénica (IRC) del embrión originando consecuencias fatales como: abortos, mortinatos o el nacimiento de niños con el síndrome de rubéola congénita (SRC) que se detalla en el Cuadro 2. En algunos países, la infección durante el embarazo se acepta como una razón para realizar un aborto terapéutico (39).

La posibilidad de contraer rubéola congénita depende principalmente del mes del embarazo en que se adquiere la infección. El riesgo para el feto es mayor durante el embarazo temprano, principalmente en el primero y segundo mes, en los cuales se realiza la organogénesis, aunque la infección fetal puede ocurrir también en los siguientes meses del embarazo (26).

El riesgo de daño fetal se estima que es del 85% al 90% cuando la infección ocurre durante las primeras ocho semanas del embarazo, el porcentaje disminuye al 52% cuando la infección ocurre durante las 9-12 semanas de embarazo y es de aproximadamente del 16% cuando la infección ocurre en-

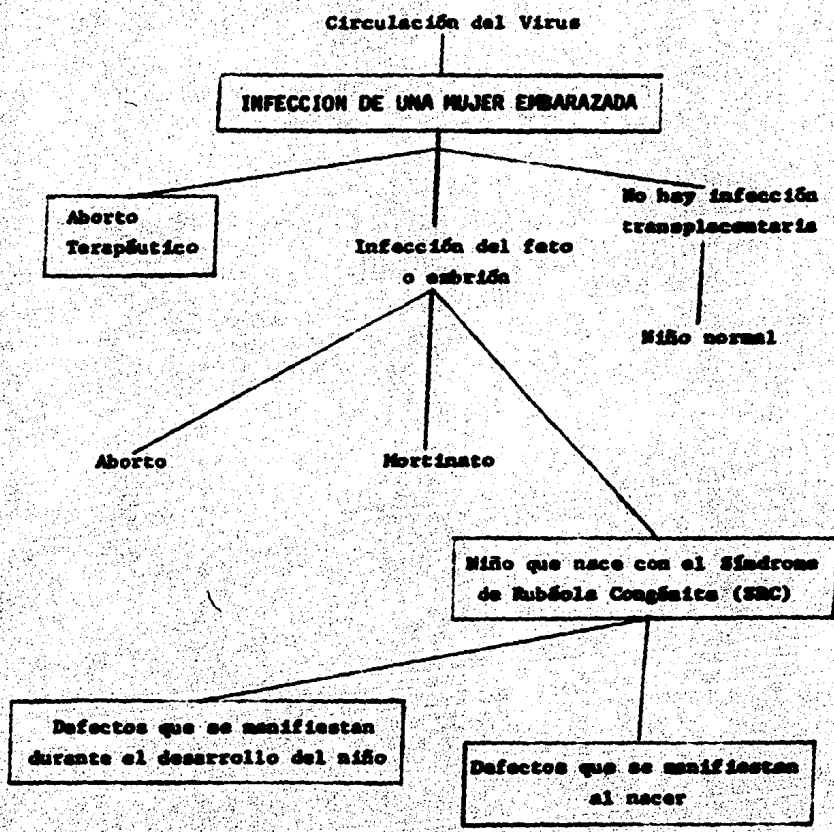
tre las 13-20 semanas (2).

La rubéola adquirida durante el primer trimestre del embarazo, está asociada con anomalías reconocibles en el momento del nacimiento en aproximadamente un 15-20% de los niños. Las manifestaciones posteriores aumentan la proporción de niños afectados a un 30-50%. La historia natural de la rubéola produciendo una infección en mujeres embarazadas así como sus posibles resultados se presentan en el Cuadro N<sup>o</sup> 1 (39).

Quando el virus de la rubéola circula en la comunidad, una mujer embarazada susceptible puede llegar a infectarse clínicamente o subclínicamente. Si la infección es reconocida clínicamente, ella puede elegir por un aborto terapéutico, llevar el embarazo a término puede originar varios resultados como: a) el embrión o feto no es infectado y es normal al nacer; b) el feto es infectado y puede ser abortado, nacer muerto (mortinato), o presentar el Síndrome de Rubéola Congénita (SRC) (39).

Comúnmente los estudios que se han realizado en niños que nacen con SRC, sólo enfatizan las anomalías que son aparentes durante los primeros meses de vida. Sin embargo, algunos de los defectos asociados con el síndrome pueden aparecer meses o años después. Las manifestaciones clínicas de la rubéola congénita se pueden agrupar dentro de tres categorías, las cuales reflejan los diferentes mecanismos patogénicos (34):

1. Anomalías presentes en el recién nacido (ej. púrpura trombocitopénica).
2. Manifestaciones que pueden estar presentes al nacer o convertirse en aparentes durante el primer año de vida (ej. cataratas).



Cuadro Nº 1

3. Anormalidades que aparecen durante la niñez o en la edad adulta temprana (ej. diabetes). Estas tres categorías se detallan en el Cuadro Nº 2.

### SÍNDROME DE RUBÉOLA CONGENITA

Anormalidades manifiestas en el recién nacido

Bajo de peso al nacer, sordera ligera, enfermedad congénita del corazón, cataratas, coriorretinitis, microftalmía, microcefalia, púrpura trombocitopénica, hepatoesplenomegalia, hepatitis, ictericia, lesiones de huesos, meningococcalitis, anemia hemolítica, linfadenopatía generalizada, hernia inguinal.

Anormalidades que se manifiestan en los primeros años de vida

Retardo mental, sordera ligera, parálisis cerebral, incapacidad para aprender, desórdenes en el lenguaje central, cirrosis hepática, desórdenes inmunológicos y retardo en el crecimiento.

Anormalidades posteriores de la rubéola congénita

Diabetes mellitus, enfermedad de la tiroides, crecimiento hormonal deficiente, sordera, glaucoma, precipitados queratinicos, retinopatía, miopía severa, cornes nebulosa, estenosis pulmonar y estenosis arterial.

Algunas anomalías pueden estar incluidas en dos o más grupos.

Cuadro Nº 2. Anormalidades causadas por el SRC y agrupadas según el tiempo en que aparecen (54).

## 2.7. RESPUESTA INMUNOLÓGICA.

Los eventos que ocurren cuando un individuo susceptible está expuesto al virus de la rubéola son los siguientes:

Antes de aparecer el exantema, cesa la viremia y aparecen los primeros anticuerpos. Sin embargo el virus puede ser aislado a partir de secre-

ciones nasofaríngeas desde siete días antes de la aparición del exantema hasta siete días después, también puede ser aislado de la sangre durante uno o dos días después de la aparición del exantema (16, 14).

Los patrones en la respuesta de anticuerpos en una infección de rubéola aguda varían según las pruebas utilizadas. Los anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación y los anticuerpos neutralizantes son los primeros en aparecer; varios días después, aparecen los anticuerpos fijadores del complemento (17).

Cuando se analizan las inmunoglobulinas del suero, se ha observado que después de un estímulo antigénico, las primeras que aparecen son las de clase IgM, alcanzando un título máximo durante los 7-10 días después del exantema y posteriormente declinan. Las IgM son raramente detectables por un lapso mayor de 4-5 semanas después de una enfermedad aguda (23, 25).

La respuesta de IgG es un poco más tardía, alcanzan un nivel máximo aproximadamente durante la tercera semana después del exantema, posteriormente el título disminuye ligeramente para mantenerse de por vida. El patrón de la respuesta inmunológica se muestra en la Gráfica 2.1 (23, 25).

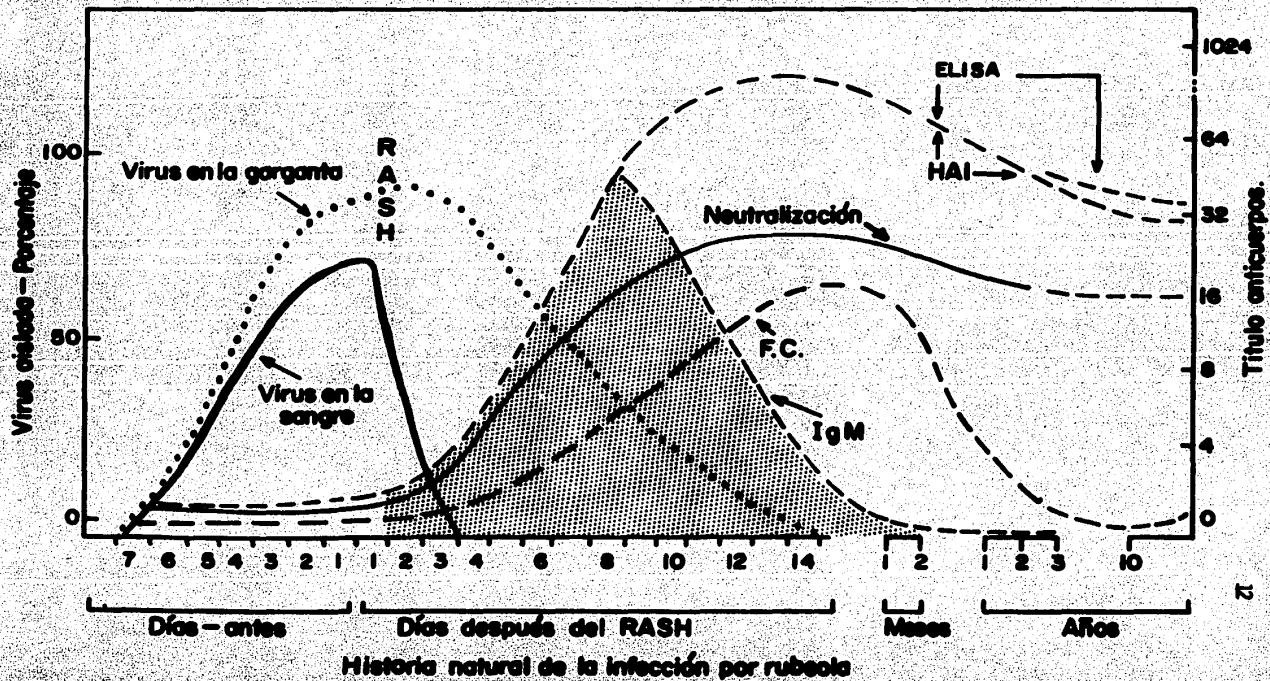
## 2.8. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO.

El diagnóstico de rubéola puede establecerse con certeza solamente por métodos virológicos o serológicos específicos. Los primeros comprenden el aislamiento viral y en los serológicos se demuestra una respuesta significativa de anticuerpos específicos contra el virus (16, 35).

Con el avance en el desarrollo de técnicas serológicas, ha disminuido



Gráfico 2.1



la necesidad del aislamiento viral, debido a que este proceso es caro y consume demasiado tiempo; además es necesario contar con cultivos celulares y por lo tanto con todos los requerimientos necesarios como medios de cultivo controlados, estufa con atmósfera de  $CO_2$  y campanas de flujo laminar entre otros (18).

El aislamiento viral es útil solamente en casos de desafíos con el virus y en la demostración de la presencia de éste en fluido amniótico, placenta, cordón umbilical, etcétera (18).

El diagnóstico de rubéola está basado principalmente en el hallazgo de un aumento significativo en el título de anticuerpos IgG o en la respuesta específica de IgM. Para lograr lo anterior se recogen sueros pareados; la primera muestra de suero (fase aguda) se toma tan pronto como es posible, después de descubrir los primeros síntomas; la segunda (fase convaleciente) se recoge 2-3 semanas después. Un aumento de 4 diluciones en el título de anticuerpos entre los sueros de la fase aguda y la fase convaleciente se considera como diagnóstico positivo (10, 16, 18, 35).

Las muestras para el aislamiento viral deben inocularse al sistema elegido tan pronto como sea posible después de su obtención. Las muestras deben mantenerse a  $4^{\circ}C$  si no se inoculan en un lapso de 24 horas (10).

En la actualidad existen varios métodos con fines de diagnóstico o para evaluar el sistema inmune. La primera técnica utilizada fue la neutralización del virus y la fijación del complemento, que más tarde fueron reemplazadas por la técnica de la Inhibición de la Hemaglutinación (IHA), la cual se considera como la técnica de referencia (18).

Otras técnicas que se han desarrollado son la Inmunofluorescencia (IF), la Hemólisis en Gel (HG), Aglutinación en el Latex (AL), Ensayos Inmunoensimáticos (ELISA) y el Radioinmunoensayo (RIA) entre otros. La selección de una de las técnicas depende de la sensibilidad que esta ofrece, de la situación clínica y del propósito para la cual fué desarrollada (23, 24).

### 2.8.1. TÉCNICAS PARA EL DIAGNOSTICO DE LA RUBEOLA.

- Neutralización (Nt).- Requiere de la propagación del virus y es técnicamente laboriosa; por lo general esta prueba aunque es sensible no se utiliza con frecuencia. Los anticuerpos neutralizantes son considerados generalmente como protectores, pero debido a los problemas que presenta la técnica su uso ha sido muy relativo (32).

- Inmunofluorescencia Indirecta (IF).- La técnica es rápida, más sensible que la IHA pero es muy inespecífica; permite la cuantificación de IgG e IgM, pero requiere de equipo costoso y personal especializado (22).

- Fijación de Complemento (FC).- Es una técnica poco sensible, los anticuerpos fijadores de complemento aparecen más tarde que los anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación, por tal motivo no es una técnica útil para determinar el estado inmune de rubéola, ni para realizar un diagnóstico relativamente rápido (13, 23).

- Hemólisis en Gel (HG).- La hemólisis en gel o hemólisis radial es ampliamente utilizada en Europa por ser un método simple y sensible para detectar anticuerpos contra rubéola. El desarrollo comercial de esta prueba no ha sido posible debido a la vida media corta de los reactivos (24, 62).

- **Aglutinación de Latex (AL).**- Esta prueba es sensible, segura para el diagnóstico y para evaluar el estado inmune, es simple y rápida, no requiere de personal especializado ni de equipo sofisticado. Sin embargo la IHA es un poco más sensible, razón por la cual su uso es limitado (24, 37).

- **Ensayo inmunoenzimático (ELISA).**- Esta técnica es sencilla, rápida, específica y más sensible que la IHA. Sin embargo la interpretación de valores bajos es difícil debido a que la especificidad de dichos valores no puede asegurarse por el ruido de la prueba. Por otra parte podemos detectar niveles de IgM con mayor facilidad que en IRA (24, 55).

- **Radioinmunoensayo (RIA).**- Es una técnica rápida, sensible y específica, pero requiere de elementos radioactivos y equipo especializado por lo que no puede ser adoptada para encuestas seroepidemiológicas (24, 62).

## 2.9. SELECCION DE LA TECNICA EN NUESTRO ESTUDIO.

La técnica utilizada en este trabajo fue la técnica de la Inhibición de la Hemaglutinación (IHA), la cual es la prueba de laboratorio que se utiliza con más frecuencia para cuantificar los anticuerpos contra el virus de la rubéola. Puede ser utilizada como técnica de diagnóstico o para evaluar el sistema inmune, es por esto que ha sido ampliamente usada para realizar encuestas seroepidemiológicas, además de que es la técnica de referencia (18, 24, 36).

La IRA es una técnica menos sensible que la neutralización, pero existe una buena correlación entre las dos pruebas. Los anticuerpos detectados por la IHA persisten por muchos años, así que el estado inmune para rubéola puede ser determinado por esta prueba (35).

La IHA consume tiempo y el suero requiere un tratamiento previo. La eliminación incompleta de las beta lipoproteínas del suero (inhibidores inespecíficos) ha sido la razón principal de error en esta prueba, sin embargo el tratamiento del suero con heparina y cloruro de manganeso ha dado resultados satisfactorios (37).

Una de las ventajas de esta prueba es que el virus utilizado no requiere estar muy puro; a pesar de que reportan desventajas para la IHA, pueden lograrse resultados reproducibles en el mismo laboratorio si se utiliza una técnica bien estandarizada (18).

## 2.10. TÉCNICA DE LA INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACION.

En 1967, George L. Stewart publicó la técnica de la Inhibición de la Hemaglutinación (IHA) y desde entonces constituye un medio muy importante para realizar encuestas en grupos de población y de esta forma proyecta la epidemiología de la rubéola (56).

En ese mismo año, la Organización Mundial de la Salud (OMS) realizó un estudio que tuvo como objetivo determinar la confiabilidad de la IHA y se encontró que no había diferencias significativas en la variabilidad de los títulos obtenidos por diferentes laboratorios cuando fueron comparados con los resultados de un laboratorio de referencia. La OMS estableció desde entonces a la IHA como la prueba de elección para realizar estudios seroepidemiológicos de rubéola (18).

### 2.10.1. FUNDAMENTO DE LA IHA.

El virus de la rubéola tiene la capacidad de aglutinar eritrocitos de

ciertas especies animales. Si hacemos reaccionar el virus con anticuerpos específicos, esta capacidad se inhibe debido a que éstos bloquean los sitios de interacción con los eritrocitos (25).

## 2.10.2. FACTORES QUE TIENEN INFLUENCIA SOBRE LA AGLUTINACION VIRAL.

Se han realizado varios estudios para definir las condiciones óptimas de la prueba y para estandarizar los parámetros de la técnica. Cada una de las variables del sistema tiene un marcado efecto sobre la sensibilidad de la prueba de la IHA; estas variables incluyen el tipo de eritrocitos, el tipo y la cantidad de antígeno, la composición del diluyente, los métodos utilizados para retirar las aglutininas e inhibidores inespecíficos del suero y la temperatura de incubación (25, 31, 51).

### A. VIRUS.

Título. Se necesita un número mínimo de partículas virales para observar la hemaglutinación. Para cuantificar los anticuerpos anti-rubéola por la técnica de la IHA, el antígeno utilizado deberá tener un título mínimo hemaglutinante de 1:64 y el antígeno dosificado en la prueba deberá contener 4 unidades hemaglutinantes, un exceso de antígeno da como resultado títulos bajos de anticuerpos, sin embargo insuficiente antígeno origina títulos altos (25, 31).

### B. ERITROCITOS.

Especie del donador. Una amplia variedad de especies de eritrocitos pueden ser aglutinados por el virus de la rubéola; sin embargo, los eritrocitos de pollo de 24 horas de nacidos y los eritrocitos humanos tipo O han

sido los más utilizados (25, 31, 51).

Edad del donador. Los eritrocitos del donador deben ser altamente sensibles para la aglutinación por el virus; si se utilizan eritrocitos de baja sensibilidad, se requiere más antígeno y este exceso de antígeno en el sistema puede dar títulos bajos (25, 51).

Cantidad de eritrocitos. Una suspensión de eritrocitos al 0.25% es la concentración que se requiere para la técnica de la Hemaglutinación viral e Inhibición de la Hemaglutinación. Esta suspensión de eritrocitos debe prepararse por espectrofotometría para evitar las variaciones en las preparaciones hechas por pipeteo del paquete celular (25).

### C. SUERO.

Agglutininas. Con frecuencia los sueros contienen agglutininas inespecíficas para los eritrocitos heterólogos y algunas veces de especies homólogas; antes de que el suero sea probado por la técnica de la IHA dichas agglutininas deben retirarse, ésto se logra adsorbiendo el suero con la suspensión de eritrocitos que se utilizará en la prueba de la IHA (25, 45).

Inhibidores inespecíficos. Una de las principales causas de error en la cuantificación de anticuerpos anti-rubéola por la técnica de la IHA, se debe a la presencia de inhibidores inespecíficos. Estos inhibidores se eliminan tratando el suero con heparina- $MgCl_2$  o con dextrán sulfato- $CaCl_2$ , que precipitan selectivamente las beta lipoproteínas del suero (25, 45).

La adsorción del suero con kaolín se usaba anteriormente para retirar los inhibidores inespecíficos, pero este método no es satisfactorio debido a la tendencia del kaolín para adsorber cantidades de anticuerpos específi

cos, particularmente inmunoglobulinas de la clase IgM (25, 45).

#### D. OTROS FACTORES.

Temperatura. La reacción anticuerpo-antígeno es generalmente realizada a 4°C, algunos virus aglutinan solamente o mejor a esta temperatura. Para la mayoría de las especies de eritrocitos, incluyendo eritrocitos de pollo, la temperatura óptima para la actividad hemaglutinante del virus de la rubéola es de 4°C (25).

Diluyentes. El pH óptimo para la prueba de la IHA del virus de la rubéola es de 6.2 y la reacción es favorecida en presencia de iones calcio a una concentración de 0.001M. Varios diluyentes se han utilizado para la prueba de la IHA; algunos de ellos tienen un pH final de 6.2, sin embargo otros tienen un pH final de 7.1 a 7.3. El diluyente Hapes-Salino-Albúmina-Gelatina (HEAG) con un pH final de 6.2 es el óptimo para la IHA del virus de la rubéola (25).

#### 2.11. NIVEL DE ANTICUERPOS ANTI-RUBEOLA QUE CONFIEREN PROTECCION.

El criterio que se sigue para determinar que nivel de anticuerpos anti-rubéola es el que confiere protección, es el desafío con el virus en personas voluntarias seropositivas, observándose si hay o no viremia (3, 41, 42).

El desafío se realiza en voluntarios seropositivos con títulos altos (>15 UI/ml); títulos bajos (<15 UI/ml) y en voluntarios seronegativos, los cuales no tienen anticuerpos detectables por hemólisis radial, inhibición de la hemaglutinación o radioinmunoanálisis. Algunas investigaciones re-



portan que un título mínimo de anticuerpos de 15 UI/ml, se considera indicativo de una respuesta satisfactoria para el virus de la rubéola y por lo tanto es protector. Sin embargo este criterio todavía no ha sido aceptado como una política universal (41, 42).

## 2.12. CONTROL DE LA RUBEOLA.

El objetivo principal de la inmunización contra la rubéola es la protección de un futuro feto del daño producido por una infección intrauterina. Persiguiendo el objetivo anterior, tan pronto como el virus fue aislado en cultivo de tejidos en 1962, comenzaron los esfuerzos para desarrollar una vacuna; en 1966 Mayer desarrolló con éxito una vacuna de virus vivos, la HPV-77 (High Passage Virus 77), el virus fue atenuado por 77 pases en células de riñón de mono verde africano (GMK), cinco pases adicionales en células de embrión de pato originó la vacuna HPV-77 DR-5 que obtuvo su licencia en 1969 en los Estados Unidos de Norteamérica (26, 27).

Después apareció la vacuna Condehill desarrollada por Huygelen y col., aislada en células GMK y con 51 pases en células de riñón de conejo para ser aprobada. Una tercera vacuna, la RA27/3 fue atenuada con 25 pases en células diploides humanas WI-38 (44, 46).

El virus de la vacuna RA27/3 fue aislado directamente en células diploides humanas WI-38 de una biopsia de riñón de un feto infectado con rubéola. En la HPV-77, el virus fue recuperado de un adulto joven y el virus de la vacuna Condehill fue aislado de la orina de un niño (44).

Las vacunas Condehill y la RA27/3 se utilizan actualmente a gran escala

la en varias partes del mundo; en los Estados Unidos de Norteamérica desde 1969 la RA27/3 es la única vacuna disponible, en Inglaterra cuentan con dos vacunas, la Cendehill y la RA27/3. Las tres vacunas mencionadas inducen la seroconversión en aproximadamente el 95% de las personas susceptibles (44).

La vacuna RA27/3 tiene las ventajas sobre las otras, de que retiene la capacidad de infectar por una ruta natural (intranasalmente) y además se ha demostrado que la respuesta inicial de anticuerpos por la inmunización con la RA27/3 es mayor que la respuesta obtenida por la HPV77-DE5 o la Cendehill (44, 46).

Los requisitos que debe reunir una vacuna para ser aprobada y autorizada por la Organización Mundial de la Salud, es producir una infección atenuada, idealmente subclínica de rubéola, que tenga las siguientes características (28, 44):

- a) Ausencia de viremia o duración muy limitada.
- b) No eliminación de virus por las secreciones nasofaríngeas o por lo menos reducción importante de la cantidad de virus presente en nasofaringe (en relación con la enfermedad natural).
- c) Estimulación de anticuerpos protectores y su permanencia por el tiempo que dura el período fértil de una mujer 14-30 años.
- d) Incapacidad para atravesar la placenta.
- e) Carencia de las manifestaciones indeseables de la rubéola: artralgias, encefalitis, exantema y adenitis.

Algunas vacunas no han sido bien toleradas, tal es el caso de la HPV77-

DK12, esta vacuna originó una alta incidencia de artritis, artralgia y neuropatías, aunque estos síntomas son más frecuentes en mujeres adultas que en niños (44).

La respuesta de anticuerpos después de la inmunización por vacunación es menor a la respuesta obtenida por infección natural. Sin embargo la mayoría de las vacunas han mantenido niveles adecuados de anticuerpos hasta por 16 años. Con la vacuna RA27/3 los anticuerpos persisten hasta por 17 años después de la vacunación (44, 46, 50).

En las campañas de vacunación seguidas por los Estados Unidos de Norteamérica en las cuales se inmuniza a la población escolar o preescolar, se requiere que la inmunidad se prolongue por 30 años como mínimo, de otro modo, si la circulación del virus no se interrumpe, la declinación de los títulos de anticuerpos tendría como resultado la acumulación de una población en edad fértil cada vez menos protegida (28).

## 2.13. POLITICAS DE INMUNIZACION.

Según las políticas de inmunización se tienen dos patrones seroepidemiológicos: Los países que cuentan con programas de inmunización a gran escala y los países que no realizan programas de inmunización. En los países que siguen una inmunización a gran escala, se tienen dos tipos de estrategias; una que es la inmunización universal practicada por el sistema norteamericano y la inmunización selectiva que es el modelo europeo (5).

### 2.13.1. INMUNIZACION UNIVERSAL.

La inmunización universal tiene como propósito eliminar la circula-

ción del virus y proteger de esta manera a las mujeres no-inmunes en edad de concebir. Este sistema es el adoptado por el gobierno norteamericano que decide inmunizar a la población escolar y pre-escolar (masculina y femenina). La elección de este sistema de inmunización por los Estados Unidos de Norteamérica, se basa principalmente en el hecho de que el principal reservorio para la diseminación del virus son los niños que se encuentran en educación elemental, y se pensó que la vacunación masiva de niños daría una rápida reducción en la transmisión. También se apoyó la vacunación de mujeres susceptibles en edad de concebir, debido a que representan el grupo de mayor riesgo, pero esto solo se realizó después de establecer la susceptibilidad por pruebas serológicas y controlando el embarazo (5).

### 2.13.2. INMUNIZACION SELECTIVA.

Este modelo estimula la adquisición de la inmunidad por medio de la infección natural durante la niñez. Este sistema es el aprobado por el signto europeo que decide vacunar a las niñas de 10-14 años y a las mujeres no-inmunes en edad de concebir. Esta estrategia no elimina la transmisión del virus, su objetivo es eliminar la infección de rubéola congénita (5, 15).

Los países como México, no cuentan con programas de inmunización debido que a muy temprana edad se alcanza la inmunidad por infección natural, y donde se opta por vacunar selectivamente a las mujeres en edad de concebir no-inmunes que lo solicitan (28).

Los efectos de las campañas de vacunación pueden ser evaluadas por la disminución de:

- a) La incidencia de la enfermedad adquirida.
- b) El número de casos de rubéola congénita.
- c) El número de abortos debidos a la infección intrauterina (39).

## 2.14. EPIDEMIOLOGIA.

En los países miembros de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la rubéola es una enfermedad notificable, pero las estadísticas oficiales no dicen la historia real, los factores que contribuyen a esto son los siguientes (2):

1. La enfermedad es generalmente tan ligera, que los cuidados médicos no son solicitados.
2. El síndrome clínico no es altamente específico, por tal motivo ca sos esporádicos con frecuencia pasan sin ser reconocibles ni diagnosticados.
3. Excepto en casos de mujeres embarazadas, el reporte de un caso diagnosticado tiene poca importancia.
4. Son frecuentes infecciones completamente inaparentes, se estima que uno o más casos inaparentes ocurren por cada caso clínico.

La incidencia de la infección por rubéola depende de la periodicidad del ciclo epidémico, del grado de exposición dentro de un grupo o comunidad y del número de personas susceptibles en riesgo (26).

Un patrón general de incidencia puede describirse de la siguiente forma:

En climas templados, la rubéola es endémica durante el año, con una

temporada pico durante la primavera; en áreas tropicales, las epidemias de rubéola se reportan difícilmente debido principalmente a las características leves de la enfermedad. En las poblaciones de las islas, no se tiene un estado endémico de rubéola, un alto porcentaje de personas, especialmente adultas son susceptibles (2).

En los Estados Unidos de Norteamérica, antes de la introducción de la vacunación las epidemias ocurrían cada 6-9 años. En algunos países europeos las epidemias fueron más frecuentes; en Polonia, Hungría y Yugoslavia se reportaron epidemias cada cuatro años. En Inglaterra las epidemias mayores se tuvieron cada 8-9 años (2, 23).

En Europa la mayoría de los casos ocurren a los 9 años de edad, presentándose raramente durante el primer año de vida. En los Estados Unidos de Norteamérica durante la era de la prevacunación el rango de incidencia mayor se presentaba en niños de 5-9 años, después de la vacunación se notó un cambio en la edad de incidencia máxima presentándose un número de epidemias localizadas en Colegios, Universidades e Instalaciones Militares, es decir, la mayor incidencia cambió a grupos de mayor edad (2).

Los estudios serológicos realizados en E.U.A. y Canadá antes de que fueran instituidos los programas de inmunización, demostraron un perfil inmunológico en el cual más del 60% de las mujeres prepúberes y más del 80% de las mujeres en edad de concebir fueron seropositivas (3, 19).

En casi todos los países latinoamericanos, la infección se presenta en la infancia temprana y el pico de incidencia se alcanza antes de la pubertad, después la meseta se mantiene al mismo nivel que el encontrado en

Europa y en Norteamérica, quedando un 10-20% de mujeres susceptibles en edad de concebir (2, 23).

En Europa la frecuencia de individuos con anticuerpos ha variado desde un 40% en Inglaterra (antes de la vacunación) a un 80% en Polonia y Checoslovaquia en niñas prepúberes (10-14 años). Sin embargo en mujeres adolescentes (15-19 años) se reportó el 55% de inmunidad en Suecia y más del 90% en la URSS y Polonia. En Asia un alto grado de seropositividad (más del 70%) se tiene a la edad de 15 años y más del 90% en la edad adulta (2).

Un rango relativamente alto de susceptibilidad (30-60%), se presenta entre mujeres jóvenes en edad de concebir en pequeñas comunidades rurales, en pequeñas ciudades y en cierto número de islas. La baja densidad de población, el clima tropical, la baja concentración de "propagadores inherentes" y factores genéticos se han involucrado para explicar los bajos niveles de seropositividad, pero uno solo de estos factores no explica la precedencia epidemiológica de la rubéola (2).

Se han observado mayores niveles de inmunidad en grupos socioeconómicamente bajos que en grupos de nivel socioeconómico elevado. Estos niveles de seropositividad elevada se han encontrado en áreas urbanas, un estudio realizado en Nueva Delhi mostró que, en las zonas urbanas, al 50% de las mujeres adquieren su inmunidad a los 9 años de edad y a los 25-34 años el 88% de las mujeres son seropositivas. En la zona rural, el nivel más bajo de inmunidad fue de 36.8% a los 5-9 años de edad y el más alto de 73.8% a los 25-30 años. Parece ser que aunque las mujeres de ambos grupos (urbano y rural) están expuestas a la infección a edad temprana, la posi-

bilidad a exposiciones en áreas rurales es menor que en áreas urbanas (27, 53).

## 2.15. SITUACION EN MEXICO.

En nuestro país no se menciona a la rubéola congénita como un serio problema y debido a que el país enfrenta otras situaciones de salud que adquieran prioridad, no se recomienda la vacunación masiva anti-rubéola (40).

En México se reporta que la rubéola se adquiere en su forma clínica o subclínica a edades muy tempranas, por lo que puede tenerse una proporción reducida de mujeres adultas susceptibles (39, 40).

En una investigación realizada por Ordoñez de la Mora en 1970, se encontró que la tercera parte de los niños de 1-4 años de edad han tenido ya rubéola; entre los 5-9 años de edad esta proporción es del 73% y del 88% de los 10-14 años. En mujeres de 15-45 años los niveles de inmunidad ascendieron de 93.5% a 98.6% (40).

En la ciudad de Guadalajara se investigó solamente a un grupo de mujeres en edad reproductiva (12-32 años) y se encontró un promedio de 87% de protección. Además un estudio realizado en estudiantes universitarios de ambos sexos, reveló una protección del 83.3% en mujeres y del 76% en hombres (34, 38).

Por otro lado se han realizado estudios para evaluar la vacuna contra la rubéola HPV-77, DK12 en la ciudad de México, con el fin de conocer la respuesta antigénica y la posible transmisibilidad de la cepa vacunal. Además se ha estudiado la administración simultánea de las vacunas de vi-



rus atenuados contra sarampión, parotiditis y rubéola (47, 48).

El lugar que ocupa la infección por rubéola entre las enfermedades transmisibles en México, según los datos reportados, ha variado del 17o. lugar en 1976 al 15o. lugar en 1984 y en el año de 1985, la incidencia aumentó a niveles tales que la infección ocupó el 6o. lugar dentro de las enfermedades transmisibles. Esto puede implicar dos situaciones: que la incidencia de rubéola en México ha aumentado o que la vigilancia epidemiológica ha mejorado en los últimos años (1, 6, 7). Observar la Tabla 2.1.

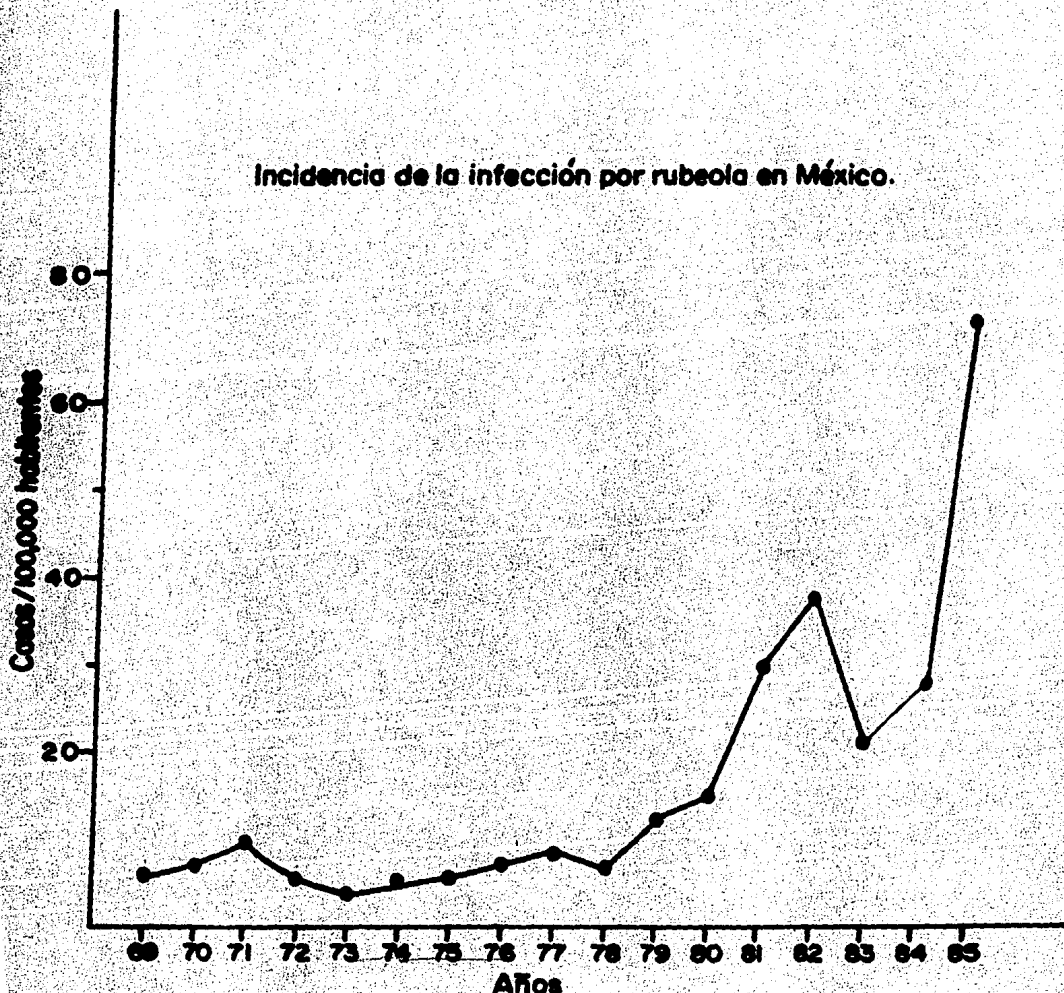
AÑO	TASA	LUGAR QUE OCUPA
1969	6.2	-
70	7.0	15o.
71	9.8	16o.
72	5.8	17o.
73	3.6	17o.
74	5.0	15o.
75	5.4	15o.
76	7.3	15o.
77	8.8	15o.
78	6.5	13o.
79	12.2	13o.
80	14.5	13o.
81	29.7	13o.
82	37.2	12o.
83	20.9	13o.
84	27.8	15o.
85	69.6	6o.

por 100,000 hab.

Tabla 2.1. Incidencia de la infección por rubéola en México desde 1969 a 1985 y el lugar que ocupa la infección dentro de las enfermedades transmisibles (1, 6, 7).

La incidencia de la infección por rubéola se esquematiza en la gráfica 2.2.

Incidencia de la infección por rubeola en México.



## CAPITULO TRES

### MATERIAL Y METODOS

#### 3.1. POBLACION ESTUDIADA.

El grupo estudiado en este trabajo está formado por 130 mujeres que acudieron al servicio de consulta externa del Hospital Dr. Manuel Gaa González, del 30 de enero al 18 de marzo de 1986.

El criterio que se siguió para la selección del grupo piloto, fue el trabajar con la población que presente el porcentaje más alto de protección inmune contra rubéola. La población llena las siguientes características:

1. Población Urbana. En estudios realizados en diversos lugares se ha encontrado que la población urbana tiene mayores porcentajes de protección inmune contra rubéola, en comparación con la población rural (2, 33).
2. Población que pertenece a un nivel socioeconómico bajo. Se ha encontrado, que en poblaciones que pertenezcan a niveles socioeconómicos bajos hay una mayor transmisión del virus, por lo cual los niveles protectores se alcanzan a una edad muy temprana (26, 27).
3. Población de un grupo de edad específica. Mujeres de 18 a 35 años de edad, estimándose que la mayoría de las mujeres se encuentran en edad fértil.

### 3.2. MUESTRAS CLINICAS.

De cada paciente se obtuvo sangre venosa; se separó el suero y cada suero se transfirió a un pequeño frasco con tapón de rosca, como conservador se utilizó timerozal al 0.001% y los sueros se guardaron en congelación (-20°C) hasta su posterior titulación.

La toma de muestra fue realizada por el personal del Laboratorio de Patología Clínica del Hospital Dr. Manuel Gaa González, bajo la dirección de la Dra. Laura Elena Cortés.

### 3.3. ESTIMACION DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA.

En la planeación de una encuesta por muestreo, siempre se alcanza un punto en el cual se debe tomar una decisión acerca del tamaño de la muestra. La decisión es importante, una muestra demasiado grande implica un desperdicio de recursos y una muestra demasiado pequeña disminuye la utilidad de los resultados (11, 30).

Las principales ventajas del muestreo cuando es comparado con la enumeración completa son:

- a) Costo reducido
- b) Mayor rapidez
- c) Mayores posibilidades
- d) Mayor exactitud

Existe una gran variedad de planes para seleccionar una muestra. Por cada plan que es considerado, se pueden hacer estimaciones del tamaño de la muestra, partiendo de un conocimiento del nivel de precisión deseado. Los

costos relativos y el tiempo involucrados para cada plan son también comparados antes de tomar una decisión (11).

Considerando que la muestra en estudio tiene una distribución normal, el tamaño se calculó utilizando un muestreo aleatorio simple para proporciones, el cual consiste en extraer una muestra de tamaño  $n$  de una población de tamaño  $N$ , de tal manera que toda muestra posible de tamaño  $n$  tenga la misma posibilidad de ser seleccionada.

Las fórmulas correspondientes al muestreo aleatorio simple para proporciones son (11):

$$n = \frac{n_0}{1 + \frac{n_0 - 1}{N}} \quad \dots\dots 1$$

$$n_0 = \frac{Z^2 (1 - \frac{\alpha}{2}) PQ}{d^2} \quad \dots\dots 2$$

Donde:

$d$ : Precisión de muestreo

$Z^2 (1 - \frac{\alpha}{2})$ : Coeficiente de confiabilidad

$P$ : Casos favorables (tienen la característica deseada)/casos totales

$Q$ : Casos no favorables/casos totales

$n_0$ : Primera aproximación del tamaño de la muestra

$N$ : Población en la cual se realiza la inferencia

Datos:

$d$ : 5%

$Z^2 (1 - \frac{\alpha}{2})$ : Confianza del 95% (igual a 1.96 en tablas)

$N$ : 130 sueros

$P = \frac{a}{n_1}$ , donde  $a = 14$  (sueros con título menor o igual a 7.8 UI/ml,

datos obtenidos de la Tabla 4.7 y 4.8)

$n_1 = 87$  sueros (tamaño de la muestra base)

$$P = \frac{14}{87} = 0.161$$

$$Q = (1 - P)$$

$$Q = 0.839$$

$$n_0 = \frac{(1.96)^2 (0.839) (0.161)}{(0.05)^2}$$

$n_0 = 208$  (primera aproximación del tamaño de la muestra)

Si  $n_0/N$  es despreciable,  $n_0$  es una aproximación satisfactoria de la

a. Si no es así utilizar la fórmula 1.

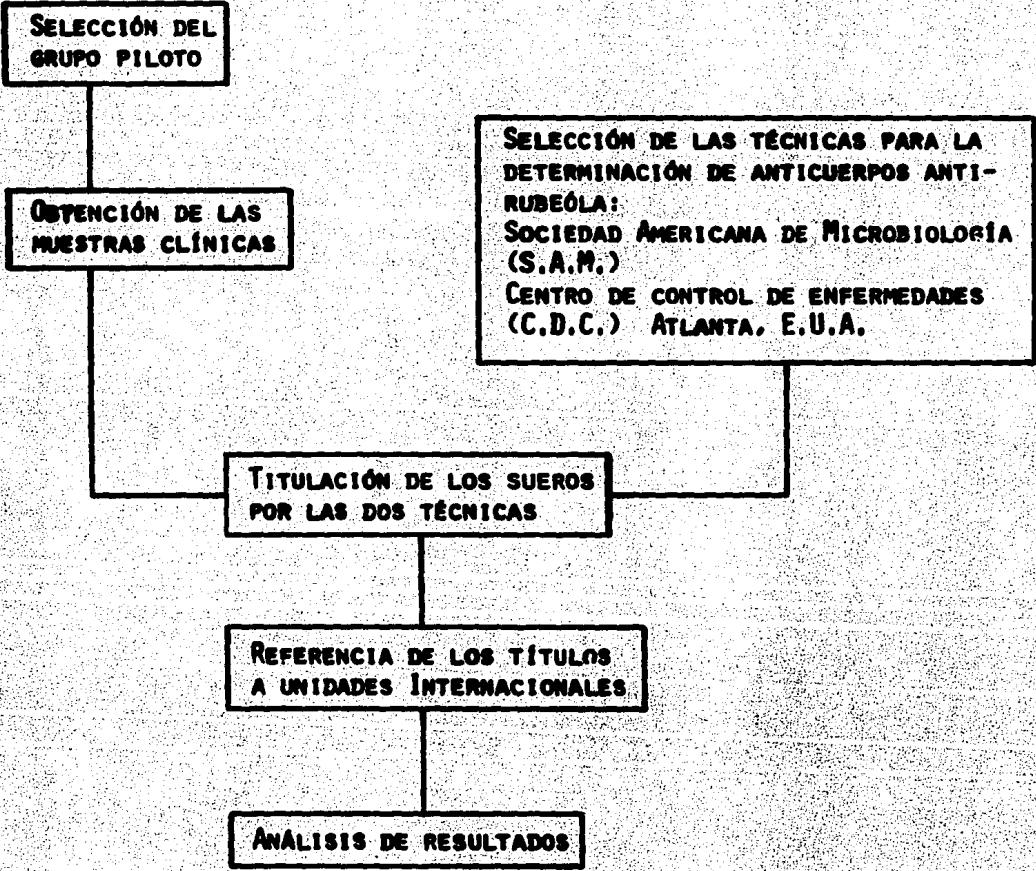
$$n = \frac{208}{1 + \frac{208 - 1}{130}}$$

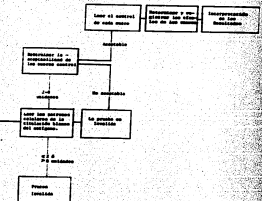
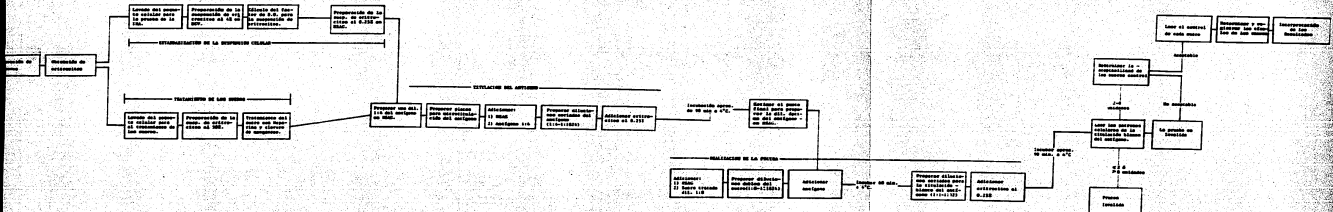
$$n = 80.23$$

$$n = 80$$

El mínimo de sueros a titular son 80, con los resultados obtenidos al titular estos sueros, haremos inferencia sobre nuestra población en estudio.

### DIAGRAMA DE TRABAJO







### 3.5. MATERIALES REQUERIDOS PARA LA PRUEBA.

#### A. Equipo.

- a.1. Refrigerador
- a.2. Congelador
- a.3. Autoclave
- a.4. Centrífuga refrigerada
- a.5. Espectrofotómetro
- a.6. Material de vidrio (diverso)
- a.7. Equipo para microtitulación:
  - placas para microtitulación en fondo V.
  - micropipetas (0.025 ml y 0.05 ml)
  - microdilutores (0.025 ml)
- a.8. Filtros Millipore y membranas de 0.22 micras

#### B. Reactivos.

- b.1. Antígeno de rubéola que contenga un título mínimo hemaglutinante de 1:64.

El antígeno utilizado fue el virus de la Rubéola Cepa Therman donado por el M.D. Olli Mearman del Departamento de Virología de la Universidad de Turku, Finlandia. La adaptación a la línea celular Vero (Células de riñón de mono verde), fue realizada por el M. en C. Enrique Ortega S. y la propagación del virus por la Q.F.B. Yolanda Varela Benitez y la Q.F.B. Teresa Montero Cañibe.

- b.2. Sueros Control. Antes de utilizarse como controles, deben de estar bien caracterizados, determinar sus respectivos títulos en

repetidas ocasiones por la prueba de la Inhibición de la Hemaglutinación. Una vez que el título de cada suero control ha sido establecido y estandarizado con un suero positivo de referencia, pueden ser utilizados como controles en pruebas subsiguientes.

Sueros control requeridos:

- a) "Alto" suero control positivo con un título de 1:256
  - b) "Bajo" suero control positivo con un título de 1:16-1:32
  - c) Suero control "Negativo", no debe tener anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra rubéola
- b.3. Sangre de pollos (de 1-3 días de nacidos) para la Inhibición de la Hemaglutinación (INA).
  - b.4. Sangre de pollos (de 1-3 días de nacidos o más grandes) para el tratamiento de los sueros.
  - b.5. Agua destilada desmineralizada.
  - b.6. Cloroformo.
  - b.7. Alcohol etílico.
  - b.8. Patrón y reactivo de cianomstahemoglobina.
    - a) Reactivo de cianomstahemoglobina:
      - Obtener un vial certificado del reactivo de cianomstahemoglobina
      - Revisar la fecha de caducidad marcada en el vial
      - Disolver el contenido del vial en agua destilada y aforar al volumen indicado
      - Mantener el reactivo a temperatura ambiente y protegido de la luz

**b) Patrón de cianometahemoglobina.**

- Obtener un patrón de cianometahemoglobina que tenga una concentración de 80 mg %

**b.9. Soluciones:**

**a) Solución de Heparina-MnCl<sub>2</sub>**

Heparina de Sodio, USP 5000 U/ml

(Si la heparina está más concentrada 10000 U/ml o más, diluir a 5000 U/ml con agua destilada). La solución puede ser almacenada indefinidamente a 4°C

MnCl<sub>2</sub> 1M

- Pesar 39.6 g de MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O
- Aforar a 200 ml con agua destilada
- Esterilizar por filtración con membranas Millipore de 0.22 micras
- Guardar la solución en la oscuridad, descartar si aparece un precipitado café

Combinar partes iguales de heparina (5000 U/ml) y MnCl<sub>2</sub> 1M.

La solución debe ser almacenada a 4°C; es útil hasta por dos semanas

**b) Solución de Alsever (modificada)**

- Dextrosa                    20.5 g
- Citrato de sodio        8.0 g
- Cloruro de sodio        4.2 g
- Acido cítrico            0.55g

Aforar a un litro con agua destilada desmineralizada

- Determinar el pH:

El pH debe ser de 6.1; si el pH está por abajo de 6.0, ajustar con NaOH 1N; si el pH está arriba de 6.2 ajustar con HCl 1N.

- Esterilizar por filtración con membranas Millipore de

0.22 micras

- Almacenar a 4°C

c) Solución de Dextrosa-Gelatina-Veronal (DGV).

Solución A:

- Acido barbitúrico 0.38 g

- Gelatina 0.60 g

Disolver en 250 ml de agua destilada desmineralizada y calentar casi a ebullición para disolver el ácido barbitúrico y la gelatina, retirar de la flama.

Solución B:

- Barbiturato de sodio 0.38 g

-  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.026 g

-  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.12 g

- NaCl 8.30 g

- Dextrosa 10.0 g

Disolver en 700 ml de agua destilada desmineralizada, combinar la solución A y B, aforar a 1 litro

- Determinar el pH:

El pH debe ser de 7.3; si el pH está por abajo de 7.2 ó arriba de 7.4, descartar la solución y preparar más.

- Esterilizar por filtración con membrana Millipore de 0.22 micras

d) Solución Hepes-Salino-Albúmina-Gelatina (HSAG).

Hepes salino 5X

- Hepes 29.8 g
- NaCl 40.95 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.74 g

aforar a un litro

- Determinar el pH:

El pH debe ser de 6.5; si está abajo de 6.4 ajustar con

NaOH 1N, si está arriba de 6.6 ajustar con HCl 1N

- Esterilizar por filtración a través de membranas Millipore de 0.22 micras
- Almacenar a 4°C. Se puede utilizar hasta por 2 meses si permanece estéril

Albúmina sérica bovina 2X

- Albúmina sérica bovina 20.0 g

aforar a un litro

- Esterilizar por membranas de 0.22 micras
- Mantener a 4°C. Si permanece estéril se puede utilizar hasta por dos meses

Gelatina 10X

- Gelatina 25.0 mg

aforar a un litro

Disolver la gelatina y esterilizar en autoclave por 15 min a 120°C, guardar a 4°C

Preparar la solución de HSAG (en condiciones asépticas)

Combinar:

- Hepes 5X 200 ml
- Albúmina sérica bovina 2X 500 ml
- Gelatina 10X 100 ml
- Agua destilada estéril 200 ml

Determinar el pH a 25°C

El pH debe ser de 6.2; si está abajo de 6.15 ajustar con NaOH 1N, si está arriba de 6.25, ajustar con HCl 1N

- Mantener la solución a 4°C en pequeñas alícuotas, se puede utilizar hasta por 2 meses si permanece estéril

### 3.6. OBTENCION DE ERITROCITOS.

Obtener en forma aséptica la sangre de seis pollos de 1-3 días de nacidos (sin que hayan ingerido alimento) en la forma siguiente:

1. Preparar un recipiente que contenga seis torundas de algodón empapadas de alcohol etílico al 70% que se usarán para aseptizar la zona de punción de los pollos.
2. Tener un recipiente con cloroformo para usarlo en forma de eutanasia de los pollos después de sangrarlos.
3. Asépticamente, llenar un frasco con tapón de rosca con 20 ml de solución de Alsever, rotular el frasco y colocarlo a un lado como reservorio para llenar la jeringa con 3 ml cada vez que se puncio a un pollo.
4. De la misma forma llenar otro frasco con tapón de rosca con 20 ml de solución Alsever y rotularlo como: "Pool de sangre" y colocar-

lo a un lado para recibir la sangre.

5. Practicar la posición correcta de sostener al pollo para sangrarlo, de acuerdo a la Figura N° 3.1.

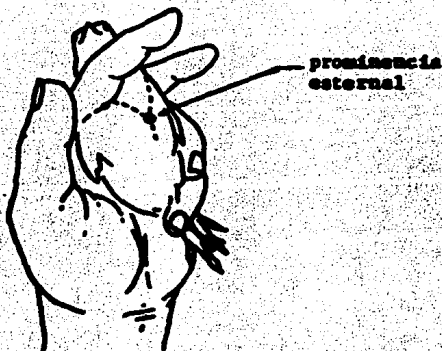


Figura 3.1

6. Usando una jeringa de 5 ml con aguja No. 19, tomar 3 ml del reservorio que contiene la solución de Alsever.
7. Cuando se tenga localizada la ligera prominencia donde la aguja será insertada, sangrar al primer pollo por punción cardíaca directa siguiendo las siguientes instrucciones:
  - a) Introducir la aguja por el lado derecho de la prominencia esternal (1 cm arriba), dirigiendo la aguja hacia la izquierda de dicha prominencia
  - b) Introducir la aguja aproximadamente 0.5 cm, tan pronto como la piel es puncionada, jalar el embolo de la jeringa con el dedo pulgar
  - c) Cuando la aguja entra al corazón, la sangre (0.5-1.5 ml por pollo) empezará a fluir dentro de la jeringa
  - d) Quitar la aguja y transferir el contenido de la jeringa dentro de la botella rotulada como: "Pool de sangre"

- e) Si el corazón no se encuentra en el primer intento, sacar la aguja y volver a puncionar, el sangrado correcto de los pollos se logra con la práctica
8. Después de sangrar al pollo, ponerlo en un recipiente conteniendo una atmósfera rica en cloroformo.
  9. Repetir los pasos 7 y 8 para los 5 pollos restantes (usar una aguja diferente para cada pollo).
  10. La sangre en solución de Alsever puede ser almacenada a 4°C por un tiempo no mayor de 2 semanas después del día de su obtención. Los mejores resultados se obtienen cuando las células se conservan en solución de Alsever mejor que si se mantienen como una suspensión de células lavadas.

### 3.7. LAVADO DE LAS CELULAS.

1. Determinar el volumen requerido de paquete celular:
  - a) Para la prueba de la IHA, es necesario solamente 0.5 ml de paquete celular (para preparar una suspensión al 0.25%, lo cual es suficiente para titular 200 sueros y la titulación del antígeno).
  - b) El volumen de paquete celular requerido para el tratamiento del suero se obtiene multiplicando por 0.1 el número de sueros a ser tratados.

Nota: Para la IHA deben usarse eritrocitos de pollo de 1-3 días de nacidos, para el tratamiento del suero pueden usarse eritrocitos de pollo de 1-3 días de nacidos o mayores.



2. Filtrar la sangre de pollo preservada a través de dos capas de gasa en un tubo de centrifuga graduado de 50 ml con el fin de eliminar cualquier coágulo.
3. Centrifugar la sangre filtrada a 900ng/10 min.
4. Leer el volumen de paquete de células en el tubo y comparar con el volumen total de paquete celular requerido. Usar esta información para determinar el volumen total de sangre preservada que deberá lavarse.
5. Resuspender el paquete celular en la solución de Alever.
6. Regresar cualquier volumen de sangre preservada que no se necesite y mantenerla a 4°C.
7. Adicionar el volumen necesario de sangre preservada para obtener 0.5 ml de paquete celular en un tubo de centrifuga graduado de tamaño apropiado para realizar la prueba de la IHA.
8. Hacer lo mismo para obtener el volumen necesario de paquete celular para el tratamiento de los sueros.
9. Llenar cada tubo de centrifuga hasta la marca tope con DGV (Amortiguador Dextrosa-Gelatina-Varecal).
10. Centrifugar a 900ng/5 min.
11. Retirar con cuidado el sobrenadante por medio de succión con pipeta Pasteur.
12. Llenar los tubos con DGV hasta la marca tope.
13. Resuspender las células y centrifugar a 900ng/5 min.
14. Retirar con cuidado el sobrenadante.
15. Llenar los tubos con DGV hasta la marca tope.

- 16. Resuspender las células y centrifugar a 900xg/5 min.
- 17. Observar si el sobrenadante está incoloro, si no es así, las células están frágiles y deben descartarse. Obtener nueva sangre y regresar al paso No. 2.
- 18. Retirar el sobrenadante.
- 19. Resuspender las células en DGV a un volumen total de 10 ul, hacer esto con los eritrocitos que se usarán para la IHA y los eritrocitos para el tratamiento de los sueros.
- 20. Centrifugar la sangre a 900xg/10 min.
- 21. Leer y registrar el volumen de paquete celular en cada tubo y retirar el sobrenadante.

**Células para la prueba de la IHA**

- 22. Multiplicar por 24 el volumen de paquete celular para utilizarse en la IHA. Esto dará el volumen de DGV necesario para tener una suspensión aproximada de eritrocitos al 4%.
- 23. En un matraz Erlenmeyer, resuspender las células en el volumen calculado de DGV.
- 24. Mantener a 4°C la suspensión de células al 4%, de esta manera puede utilizarse hasta por tres días.

**Células para el tratamiento del suero**

- 25. En un tubo apropiado, resuspender las células para el tratamiento de los sueros en el volumen apropiado de amortiguador HSAG (Hepes-Salino-Albúmina-Gelatina) para obtener una suspensión de eritrocitos al 50%.

### 3.8. ELIMINACION DE AGLUTININAS E INHIBIDORES INESPECIFICOS.

#### Método Heparina-MnCl<sub>2</sub>

1. Preparar la solución de heparina-MnCl<sub>2</sub>
2. Rotular tubos de 12 mm para cada suero a ser tratado.
3. Adicionar 0.3 ml de NSAG a cada tubo rotulado.
4. Adicionar 0.2 ml de suero y mezclar por agitación suave.
5. Adicionar 0.2 ml de heparina-MnCl<sub>2</sub> y mezclar.
6. Incubar por 15 min a 4°C.
7. Adicionar 0.2 ml de la suspensión de eritrocitos al 50% y agitar.
8. Incubar por 1 hora a 4°C.
9. Adicionar 0.8 de NSAG a cada tubo y mezclar suavemente antes de centrifugar (esto dará una dilución 1:8 del suero).
10. Centrifugar a 900xg/20 min.
11. Recuperar el sobrenadante con cuidado de no remover el precipitado y el paquete de eritrocitos. Mantener los tubos a 4°C.

El suero tratado puede guardarse a 4°C por una semana, y a -20°C por períodos más largos. Si se observa algún precipitado, centrifugar el suero y recuperar el sobrenadante.

Nota: El suero no necesita ser inactivado por calor.

### 3.9. RE-TRATAMIENTO DE LOS SUEROS PARA RETIRAR LAS AGLUTININAS E INHIBIDORES INESPECIFICOS.

#### Método: Heparina-MnCl<sub>2</sub>

1. Rotular tubos de 12 mm para cada suero a ser re-tratado.
2. Adicionar 0.3 ml de NSAG a cada tubo rotulado.

3. Adicionar 0.2 ml de cada suero, mezclar suavemente.
4. Adicionar 0.2 ml de heparina- $\text{PbCl}_2$  y mezclar.
5. Incubar por 15 min. a  $4^\circ\text{C}$ .
6. Adicionar 0.4 ml de la suspensión de eritrocitos al 50% y agitar.
7. Incubar los tubos por 1 hora a  $4^\circ\text{C}$ .
8. Adicionar 0.7 ml de NEAG a cada tubo y mezclar antes de centrifugar (el suero queda diluido 1:8).
9. Centrifugar a  $900\text{g}/20$  min.
10. Recuperar el sobrenadante con cuidado de no remover el precipitado y el paquete de eritrocitos. Mantener los tubos a  $4^\circ\text{C}$ .

### 3.10. ESTANDARIZACION DE LA SUSPENSION DE ERITROCITOS.

El método utilizado para la estandarización de la suspensión de eritrocitos es el reportado por el Centro para el Control de las Enfermedades (C.D.C.) (8).

1. Encender el espectrofotómetro.
2. Observar que el reactivo de cianometahemoglobina no presente turbidez o precipitación (si hay turbidez o precipitación preparar nuevo reactivo).
3. Preparar una curva patrón de acuerdo al siguiente cuadro:

	1	2	3	4	5
Concentración de cianometahemoglobina (mg X)	80	60	40	20	0
Volumen del estándar de 80 mg X (ml)	4	3	2	1	0
Volumen del reactivo de cianometahemoglobina (ml)	0	1	2	3	4

- 4. Tapar los tubos.
- 5. Agitar para mezclar los reactivos.
- 6. Calcular el factor del espectrofotómetro de la siguiente manera:
  - a) Leer las densidades ópticas (absorbancia) de cada uno de los tubos a 540 nm
  - b) Realizar la suma de las concentraciones de cianocetahemoglobina de todas las diluciones (200 mg X)
  - c) Realizar la suma de las D.O. leídas de todas las diluciones.
  - d) Calcular el factor, dividiendo la suma de las concentraciones entre la suma de las D.O. leídas:

$$\text{factor} = \frac{\text{Iconc. de cada dil. de la curva patrón}}{\text{D.O. leídas}}$$

7. Cálculo del factor de densidad óptica.

Con el factor antes obtenido, calcular el factor de D.O. del espectrofotómetro para la suspensión de eritrocitos al 0.25%.

Para eritrocitos de pollo:

$$\text{factor de D.O.} = \frac{2.746 \text{ mg } \frac{1}{2} \text{ cmg}}{\text{factor}}$$

- 8. Resuspender la suspensión de eritrocitos al 4% preparada anteriormente.
- 9. Pipetar 1 ml de la suspensión de eritrocitos al 4% en un matraz aforado de 25 ml.
- 10. Aforar con el reactivo de cianocetahemoglobina.
- 11. Mezclar invirtiendo el matraz varias veces.
- 12. Dejar en reposo 20-45 min a temperatura ambiente para que se lisen todas las células.

13. Centrifugar a 900mg/10 min una porción del volumen (suficiente para llenar una celda) de la muestra de células lisadas, para retirar el estroma y los restos celulares.
14. Leer la D.O. de la muestra contra el reactivo blanco (0 mg%) a 540 nm. Esta será la D.O. de la prueba.
15. Calcular el volumen al que tendremos que llevar la suspensión de eritrocitos al 4%, para obtener una suspensión al 0.25% de la siguiente manera:

$$\text{Volumen final} = \frac{\left[ \begin{array}{l} \text{D.O. de la} \\ \text{prueba} \end{array} \right] \left[ \begin{array}{l} \text{vol. original de la} \\ \text{susp. de erit. al 4\%} \end{array} \right] - 1.0 \text{ ml}}{\text{Factor D.O. para la susp. erit. al 4\%}}$$

Nota: Si no planes terminar la prueba de la IHA en un día, parar aquí el experimento.

16. Diluir la suspensión con el amortiguador H2AC, al volumen final calculado. Esta suspensión al 0.25% deberá usarse el mismo día de su preparación.

El factor calculado anteriormente puede usarse para preparaciones posteriores de eritrocitos al 0.25%, esto siempre y cuando que se esté utilizando el mismo espectrofotómetro y, que dicho instrumento no haya tenido ninguna reparación posterior al cálculo del factor, si esto se cumple, se podrá hacer lo siguiente:

- a) Leer únicamente la dilución que tiene la concentración de 40 mg% de cianomstahemoglobina a 540 nm
- b) Comparar la lectura obtenida con la lectura previa para la dilución de 40 mg % de la curva patrón, si la lectura da una va-

riación de  $\pm 3\%$  respecto a la lectura anterior, preparar nuevas diluciones y calcular un nuevo factor.

### 3.11. TITULACION DEL ANTIGENO.

Para determinar la cantidad aproximada de hemaglutininas del antígeno de rubéola, se recomienda hacer lo siguiente:

- A. Realizar la titulación por triplicado.
- B. Prediluir el antígeno y dejarlo en reposo 15 minutos, antes de diluirlo en la placa.
- C. Interpretar el título en base a las variaciones observadas en las tres titulaciones.

Nota: El antígeno utilizado debe tener un título mínimo hemaglutinante de 1:64.

1. Hacer una dilución 1:4 del antígeno en amortiguador NSAG frío, combinando 0.1 ml del antígeno y 0.3 ml de NSAG. Esperar a que la solución se estabilice a 4°C por 15 minutos.
2. Trabajar con placas para microtitulación con fondo "V" de la siguiente manera:
  - a) Marcar las nueve diluciones que se probarán (1:4 - 1:1024) directamente en los pozos de la placa de microtitulación. Observar la Fig. 3.2.
  - b) Marcar dos pozos en la parte superior derecha para usarlos como el control de células (C.C.). Observar la Fig. 3.2
3. Utilizando una micropipeta, adicionar 0.025 ml de NSAG frío del segundo al noveno pozo de cada una de las tres filas y 0.025 ml

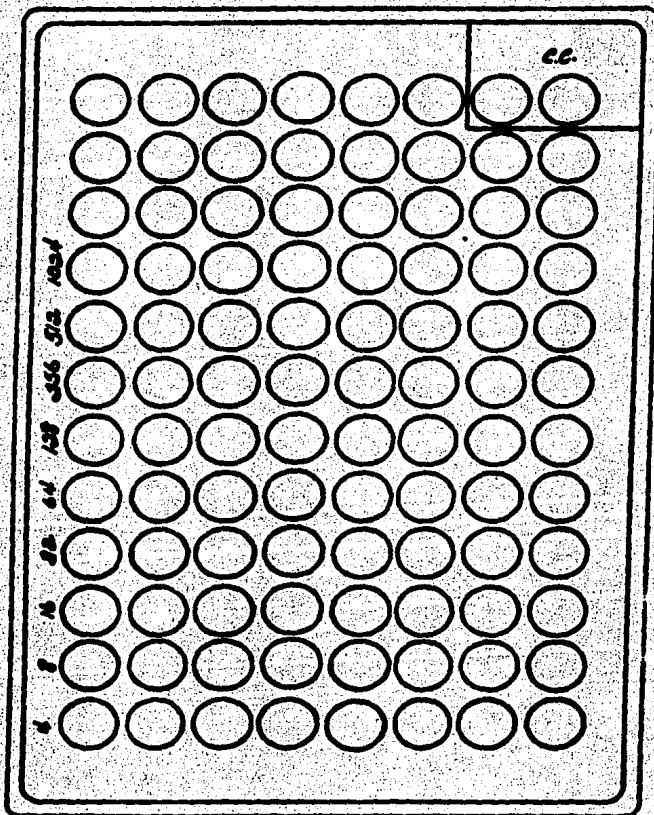


Figure 3.2



- a los pozos del control de células. Observar la Fig. 3.3.
4. Con una pipeta de 0.2 ml adicionar 0.05 ml del antígeno (diluido 1:4) al primer pozo de cada una de las tres filas, para hacer las diluciones del antígeno. Observar la Fig. 3.3.
  5. Con microdilutores de 0.025 ml, hacer las diluciones seriadas del antígeno.
  6. Poner la placa sobre baño de hielo por 5 min o en refrigerador por 15 min.
  7. Adicionar 0.05 ml de la suspensión de eritrocitos estandarizada al 0.25X a cada uno de los pozos de la titulación del antígeno y al control de células.

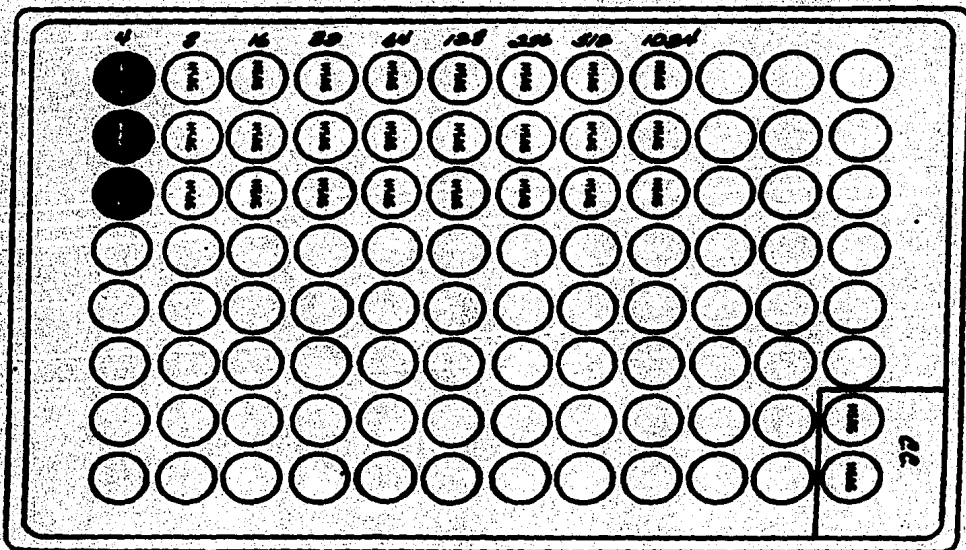


Figura 3.3

8. Tapar la placa e incubar a 4°C hasta que, por lo menos uno (de preferencia los dos) de los posos que contienen el control de células presenten un botón compacto (negativo) como el que se muestra en la figura siguiente:

(esto tomará aproximadamente 60-90 minutos)



9. Mientras la placa se está incubando, estudiar los dibujos de los patrones celulares mostrados en la Fig. 3.4.






<p><b>Aglutinación Completa</b></p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">   </div> <p>Cél. Aglutinadas formando una mancha</p> <p>Cél. formando un ligero anillo (debido a las rayaduras hechas por los microdilutores)</p>	<p style="text-align: center;">+</p>
<p><b>Aglutinación Parcial</b></p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">   </div> <p>Cél. formando anillos moderados</p>	<p style="text-align: center;">+</p> <p style="text-align: center;">-</p>
<p><b>No aglutinación (Completa Inhibición de la Hemaglutinación)</b></p>	<div style="text-align: center;">  </div> <p>Células formando un anillo compacto</p> <p>(Las células aglutinadas pueden deslizarse originando un botón incompleto. Si existe alguna duda, colocar la placa con un ángulo de inclinación (30°) por 15-30 segundos, las células no aglutinadas resbalarán por la pared del pozo formando una línea)</p>	<p style="text-align: center;">-</p>

Figura 3.4

10. Si al terminar los 90 minutos de incubación, solamente uno de los controles de células presenta un botón compacto, continuar la incubación por otros 15 min. a temperatura ambiente hasta que, los botones celulares se observen claramente.
11. Cuando ha terminado el tiempo de incubación leer los resultados de los controles celulares y la titulación del antígeno. Hacer un cuadro similar al que se muestra en la Figura 3.5, para recordar las lecturas de la titulación del antígeno.

	Titulación del Antígeno									Fecha <u>16-IV-86</u>
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	C.C.
# 1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
# 2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
# 3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Figura 3.5

12. El punto final para la titulación del antígeno, está definido como la dilución más alta del antígeno que presente una aglutinación completa de los eritrocitos.

Como la titulación se realiza por triplicado, pueden ocurrir algunas variaciones en los títulos (son aceptables variaciones de + una dilución). El título del antígeno se estima de la siguiente manera: El título es la dilución más alta del antígeno que muestra una aglutinación completa en por lo menos dos de los ensayos de la titulación.

13. Una vez que el título ha sido determinado, es necesario completar la dilución del antígeno para tener 4 unidades hemaglutinantes por 0.025 ml. Para esto dividir entre 4 el recíproco de la dilución:

Ejemplo:

Título del antígeno estimado por triplicado: 1:128

Dividir el título estimado entre 4:  $\frac{128}{4} = 32$

La dilución del antígeno que deberá hacerse para utilizarse en la prueba de la INA será: 1:32

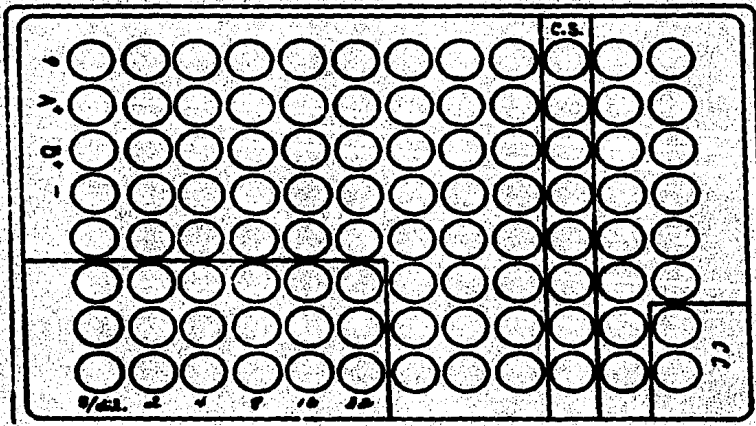
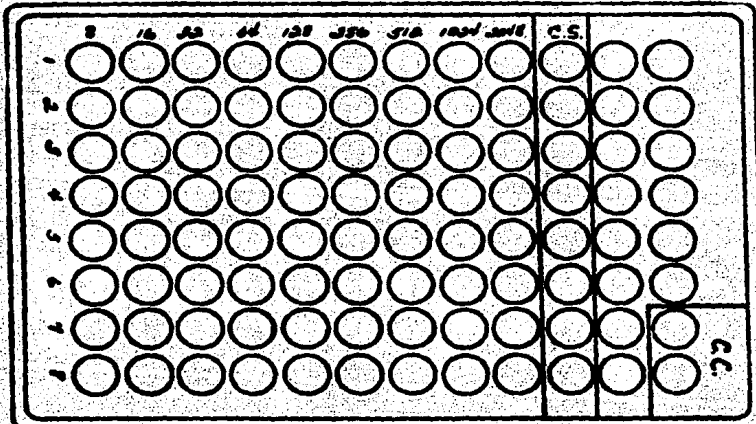
14. Para calcular el volumen de antígeno diluido a preparar, hacer lo siguiente:
- Multiplicar por 0.025 el número de sueros a probar, al resultado adicionar 0.15 ml, necesario para verificar la dilución del antígeno.
  - Al volumen determinado en a), adicionar un volumen extra para permitir un adecuado pipeteo.
15. Hacer la dilución del antígeno en el amortiguador NEAG.

### 3.11. REALIZACION DE LA INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION (INA).

Todos los reactivos deben mantenerse a 4°C, antes de usarlos en la prueba de la INA.

- Utilizar placas para microtitulación con fondo "V"
  - Rotular las diluciones seriadas que se probarán (1:8-1:1024)
  - Rotular los sueros de los pacientes y asignar a cada suero una línea horizontal (fila). Observar la Fig. 3.6

- c) Asignar el pozo No. 10 para el control del suero (C.S.)
  - d) Rotular dos pozos en la parte superior derecha de cada placa para usarlos en el control de células (eritrocitos)
  - e) En la última placa, rotular solamente, las diluciones del antígeno (previamente ajustado a 4 unidades HA), hacerlo por triplicado. Observar la Fig. 3.7
2. Para cada suero a ser probado, colocar 0.025 ml de HSAG frío del pozo No. 2 al 10. También adicionar 0.025 ml de HSAG a los últimos 3 pozos de cada una de las filas de la verificación de la dilución del antígeno. Observar la Fig. 3.8.
  3. Adicionar 0.025 ml de HSAG frío en cada uno de los dos pozos del control de células de cada una de las placas.
  4. Usando una pipeta de 0.2 ml para cada suero, adicionar 0.05 ml del suero tratado (dil. 1:8) al primer pozo de la fila marcada para ese suero y 0.025 ml al pozo No. 10, que es el control del suero (C.S.). Observar la Fig. 3.8.
  5. Con microdilutores de 0.025 ml preparar diluciones seriadas de cada suero hasta el pozo No. 9.
  6. Adicionar 0.025 ml del antígeno de rubéola conteniendo 4 unidades hemaglutinantes, a cada una de las diluciones de los sueros (excepto al control del suero, pozo No. 10) y 0.025 ml al primero y segundo pozo de cada de las tres filas de la titulación blanco del antígeno, para verificar las 4 unidades hemaglutinantes.
  7. Mezclar el contenido de las placas, dándole ligeros golpecitos o colocarla en un vibrador mecánico por un minuto.



Figuras 3.6 y 3.7

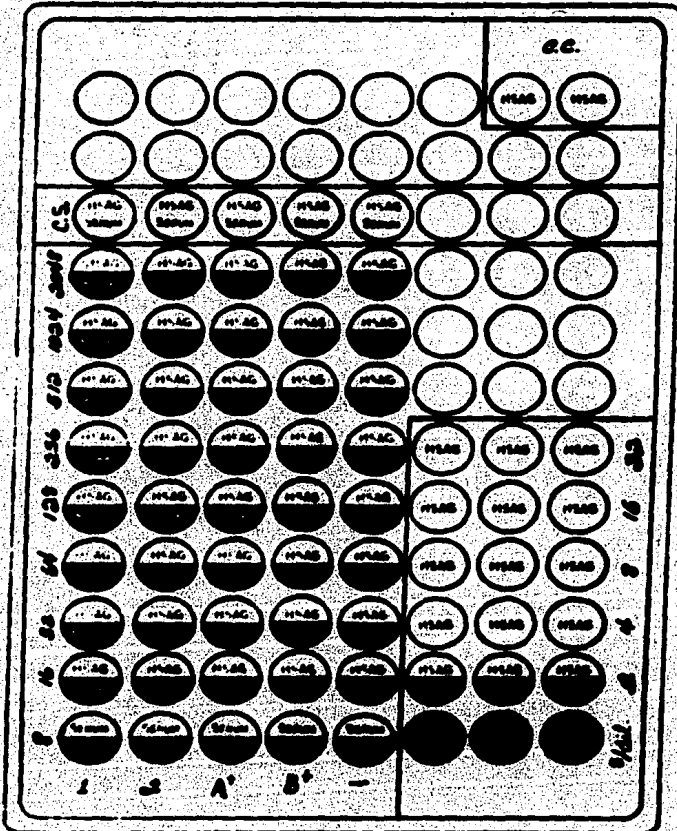


Figure 3.8

8. Incubar a 4°C por una hora; retirar del refrigerador.
9. Hacer las diluciones seriadas de la titulación blanco del antígeno.
10. Adicionar 0.05 ml de la suspensión de eritrocitos estandarizada al 0.25% a todos los pozos de cada suero, a la titulación blanco del antígeno, los controles del suero y los controles de los eritrocitos.
11. Tapar las placas e incubar a 4°C hasta que por lo menos, uno (de preferencia los dos) de los pozos que contienen el control de eritrocitos presente un botón compacto (negativo). Esto tomará aproximadamente 60-90 minutos.
12. Si al término de los 90 minutos de incubación, solamente uno de los controles de eritrocitos de la placa de la titulación blanco del antígeno, presenta un botón compacto, continuar la incubación por otros 15 minutos a temperatura ambiente hasta que los botones celulares se observen claramente.
13. Cuando la placa que tiene la titulación blanco del antígeno, ha tenido un tiempo suficiente de incubación, retirar del refrigerador.
14. Leer los resultados con ayuda de los dibujos mostrados en la Fig. 3.4.

Con frecuencia la titulación del antígeno que se hace por triplicado tiene patrones idénticos. Si ocurre una diferencia mayor de una dilución, debe sospecharse de un problema mecánico.

15. Estimación del punto final de la titulación blanco del antígeno:  
El punto final es la dilución más alta del antígeno que muestra



una aglutinación completa (+), en por lo menos dos de las filas.

16. Al efectuar la titulación blanco del antígeno en la prueba, sabemos que, desde 4 unidades hemaglutinantes (UHA) por 0.025 ml es la dosis requerida:

Un punto final de 1:4 es el ideal:

Sin diluir	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
+	+	+	-	-	-
(4 UHA)	(2 UHA)	(1 UHA)			

Un punto final de 1:2 es aceptable:

Sin diluir	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
+	+	-	-	-	-
(2 UHA)	(1 UHA)				

Un punto final de 1:8 es también aceptable:

Sin diluir	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
+	+	+	+	-	-
(8 UHA)	(4 UHA)	(2 UHA)	(1 UHA)		

Por lo tanto, para que una prueba sea aceptable, el antígeno dosificado a las diluciones del suero debe estar entre 2 y 8 unidades determinadas en una titulación hecha por triplicado.

17. Revisar el control positivo alto, el control positivo bajo y el control negativo de la siguiente manera:

- a) Revisar el peso del control del suero antes de leer el título de cada suero control. Si no se observa aglutinación inespecífica leer los controles, si se observa aglutinación inespecífica no leer la prueba, y todos los sueros debería repetirse en otra prueba.

- b) El suero control positivo deberá alcanzar su título (la dilución más alta del suero que da una inhibición de la hemaglutinación completa).
  - c) El suero control negativo no debe mostrar inhibición de la hemaglutinación en ningún paso de las diluciones del suero.
18. Revisar los sueros de los pacientes de la siguiente manera:
- a) Para cada suero revisar su control, si no presenta aglutinación inespecífica leer su título. Si se observa aglutinación inespecífica el suero debe ser re-tratado para remover las aglutininas antes de ser incluido en otra prueba (instrucciones para el re-tratamiento en la sección 3.9 de este capítulo).
  - b) El punto final para designar la cantidad de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación presentes en el suero de un paciente, es la dilución más alta del suero que presente una completa inhibición de la hemaglutinación (-).

En la figura 3.9 se muestra la forma de presentar los resultados de una titulación.

Fecha 16-IV-86  
 Obtención de células 13-IV-86  
 Lavado de células 15-IV-86  
 Tratamiento del suero Heparina-MnCl<sub>2</sub>

**Titulación blanco del Antígeno**

S/dil.	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
# 1					
# 2					
# 3					

	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	C.S.	C.C.
A+										
B+										
-										
1										
2										
3										

**C.C.:** Control de Células

**C.S.:** Control del Suero

**A+:** Suero control positivo alto (1:256)

**B+:** Suero control positivo bajo (1:16)

**-:** Suero control negativo (<1:8)

**S/dil.:** Sin diluir

**Figura 3.9. Forma de presentar los resultados.**

## CAPITULO CUARTO

## RESULTADOS

## 4.1. ESTANDARIZACION DE LA TECNICA.

Los parámetros de la técnica que necesitaron establecerse fueron los siguientes:

## 4.1.1. PREPARACION DE LA SUSPENSION DE ERITROCITOS.

La suspensión de eritrocitos al 0.25% se preparó por el método espectro fotométrico, en el cual se mide la cantidad de hemoglobina que se transforma a cianometahemoglobina leyéndose a 540 nm. Se parte de una suspensión de eritrocitos al 4% y se calcula el volumen total al que hay que diluir esta suspensión para obtener una concentración al 0.25%.

Para preparar la suspensión de eritrocitos al 0.25%, se realizó una curva patrón de cianometahemoglobina, las densidades ópticas a 540 nm fueron las siguientes:

	1	2	3	4	5	6
Concentración de cianometahemoglobina (mg %)	80	60	40	20	0	(Probl.) -
Densidades Ópticas (D.O.) a 540 nm	0.24	0.18	0.12	0.06	bico.	0.15

Para calcular el volumen al que tenemos que llevar la suspensión de eritrocitos al 4%, para obtener una suspensión al 0.25%, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen final} = \frac{\text{D.O. de la prueba} \times \left[ \frac{\text{Volumen original de la susp. de erit. al 4\%}}{\text{Factor D.O. para la susp. de erit. al 4\%}} - 1.0 \text{ ml} \right]}{\text{Factor D.O. para la susp. de erit. al 4\%}}$$

Factor D.O. para la susp. de erit. al 4%

$$\text{Factor D.O. susp. al 4\%} = \frac{2.746 \text{ mg\% cmg}}{\text{factor}}$$

2.746 mg % es la cantidad de cianometahemoglobina de una suspensión de eritrocitos de pollo al 0.25%

El factor del espectrofotómetro se calcula sumando las concentraciones de cada uno de los puntos de la curva patrón (80+60+40+20), y dividiendo entre la suma de las D.O. obtenidas de cada una de las diluciones de la curva.

$$\text{factor} = \frac{\Sigma \text{conc. de cada dil. de la curva patrón}}{\text{D.O. leídas}}$$

Cálculo del factor del espectrofotómetro:

$$80 + 60 + 40 + 20 = 200 \text{ mg\%}$$

$$0.24 + 0.18 + 0.12 + 0.06 = 0.605$$

$$\text{factor} = \frac{200 \text{ mg\%}}{0.605} = 330.57 \text{ mg\%}$$

$$\text{Factor D.O. de la susp. erit. al 4\%} = \frac{2.746 \text{ mg\%}}{330.57 \text{ mg\%}} = 0.00830$$

$$\text{Vol. final} = \frac{0.15 (10-1) \text{ ml}}{0.00830} = 162.65 \text{ ml}$$

Por lo tanto la suspensión de eritrocitos al 4% (9 ml), se lleva a un volumen total de 162.65 ml de HIAG para obtener la suspensión al 0.25%. Como 162.65 ml de eritrocitos al 0.25% es un volumen muy grande, de tal manera que si se prepara toda cada vez que se titula se desperdicia mucho reactivo, por tal motivo, se calcula el volumen de la suspensión de eritrocitos necesarios para titular en ese día la cantidad deseada de sueros y la titulación del antígeno.

La primera vez que se preparó esta suspensión de eritrocitos al 0.25% fue necesario leer todos los puntos de la curva patrón de cianometahemoglo

bina, después cada vez que se preparó esta suspensión únicamente se leyó un punto medio de la curva (tubo No. 3), si la lectura de este punto daba una variación de  $\pm 3\%$  respecto a la lectura anterior, se preparaba otra curva y se leía nuevamente para calcular un nuevo factor del espectrofotómetro.

#### 4.1.2. SUELOS UTILIZADOS COMO CONTROLES.

Para poder utilizar sueros humanos como controles, se titularon muestras en repetidas ocasiones por la técnica estandarizada y en presencia de un suero control positivo de referencia, donado amablemente por el Dr. Michel Trudel del Instituto Armand-Frappier de la Universidad de Quebec, Canadá. Dicho suero control positivo de referencia tenía un título de 1:256 por inhibición de la Hemaglutinación de acuerdo al método.

Una vez establecidos los títulos de los sueros para utilizarse como controles secundarios, éstos se corrieron en cada una de las titulaciones realizadas.

Los sueros control utilizados fueron:

un suero control positivo con un título de 1:256

un suero control positivo con un título de 1:16

un suero control negativo con un título de <1:8

#### 4.1.3. SUERO DE REFERENCIA CON TÍTULO EXPRESADO EN UNIDADES INTERNACIONALES POR MILILITRO (UI/ML).

Se tituló un suero de referencia (Canadian IgG anti-Rubella Reference; Provisional L.C.D.C., titre: 500 i.u./ml) donado por el Laboratorio de Salud Pública de Quebec Canadá. Este suero se tituló en dos ocasiones por la técnica de la Inhibición de la Hemaglutinación estandarizada en el labo

torio, para lo cual se prepararon 8 diluciones del suero y cada una de éstas se probó por la técnica de la INA para tener una relación del título expresado en dilución con el título expresado en UI/ml. El suero sin diluir (300 UI/ml) dió un título de 1:1024; diluido 1:2 un título de 1:512 y así sucesivamente como se muestra en la Tabla 4.1.

Título (UI/ml)	Título (dilución)
300	1:1024
250	1:512
125	1:256
62.5	1:128
31.2	1:64
15.6	1:32
7.8	1:16
3.9	1:8
<3.9	<1:8

Tabla 4.1. Titulación del suero de referencia por la técnica de la INA reportada por el C.D.C. Se presenta la relación que existe entre el título expresado en dilución y el título expresado en UI/ml.

Con estos datos se trazó la curva patrón que se muestra en la Gráfica 4.1.

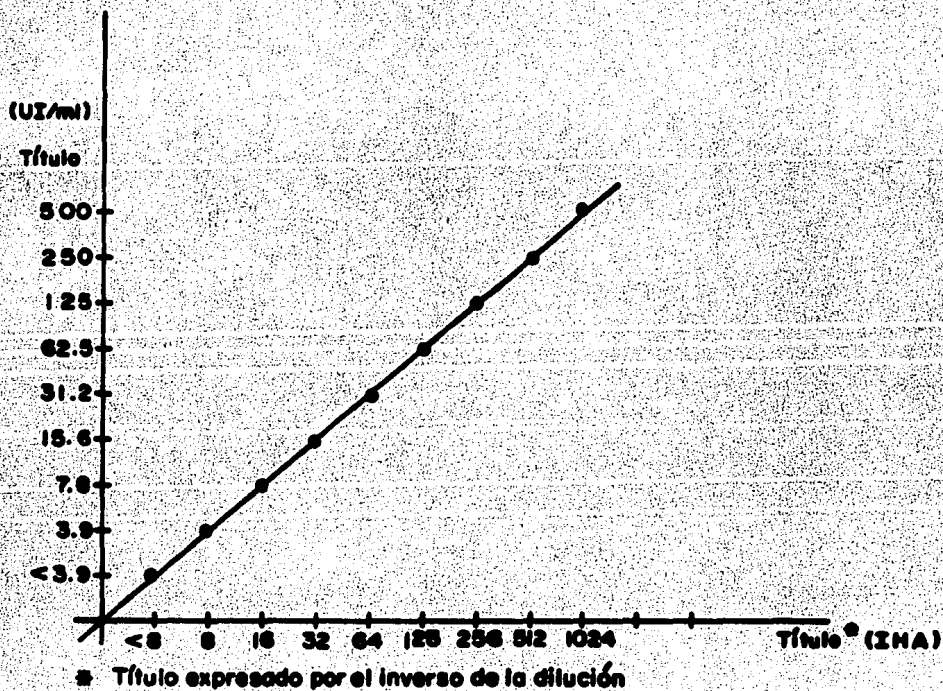
#### 4.2. TITULACION DE SUEROS.

La cuantificación de anticuerpos antirubéola, se realizó titulado 87 sueros por la prueba de la INA. Se hicieron dos titulaciones, la primera se llevó a cabo con la técnica propuesta por la Sociedad Americana de Micro

Gráfica 4.1

Relación del Título en UI/ml y el Título por IHA.

Curva Patrón





biología (S.A.M.) y la segunda titulación se realizó con la técnica reportada por el Centro para el Control de Enfermedades (C.D.C.) (8, 23).

En la prueba de la IMA reportada por el C.D.C., los inhibidores inespecíficos se retiran tratando el suero con Heparina-MnCl<sub>2</sub>, se utilizan amortiguadores orgánicos y la suspensión de eritrocitos al 0.25% se prepara por un método espectrofotométrico. La técnica incluye un control para verificar el tratamiento de los sueros, una titulación blanco del antígeno en la que se verifica que el antígeno dosificado en la titulación de los sueros sea de 4 unidades hemaglutinantes, además se titulan 3 sueros control con títulos de <1:8, 1:16 y 1:256 los cuales se utilizan como controles secundarios (8).

La técnica propuesta por la S.A.M., retira los inhibidores inespecíficos con Heparina-MnCl<sub>2</sub> y utiliza también amortiguadores orgánicos, pero la preparación de la suspensión de eritrocitos al 0.25% se hace añadiendo el paquete celular (23).

#### 4.2.1. TITULACION DE SUEROS POR LA TECNICA PROPUESTA POR LA SOCIEDAD AMERICANA DE MICROBIOLOGIA (S.A.M.).

El primer punto en la ejecución de este trabajo fué la cuantificación de anticuerpos antirubéola en 87 sueros, la técnica que se siguió fué la IMA reportada por la S.A.M. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.2.

Título (dilución)	No. de sueros	X
<1:8	8	9.2
1:8	3	3.4
1:16	3	3.4
1:32	14	16.1
1:64	19	21.9
1:128	15	17.2
1:256	9	10.3
1:512	3	3.4
1:1024	13	14.9

Tabla 4.2. Titulación de sueros por la técnica reportada por la Sociedad Americana de Microbiología (S.A.M.).

#### 4.2.2. TITULACION DE SUEROS POR LA TECNICA REPORTADA POR EL CENTRO PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES (C.D.C.) DE LOS ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMERICA.

Después de estandarizada en el laboratorio la técnica de la IHA reportada por el C.D.C., se prosiguió a titular 10 de los 87 sueros titulados anteriormente por la técnica propuesta por la S.A.M. Los resultados de esta titulación se presentan en la Tabla 4.3.

No. de suero	1a. Titulación (S.A.M.)	2a. Titulación (C.D.C.)
1	<8	32
2	32	32
3	1024	64
4	8	16
5	32	32
6	64	32
7	1024	256
8	64	64
9	64	64
10	1024	64

Tabla 4.3. Titulación de sueros por la técnica de la S.A.M. y la técnica de la C.D.C.

Comparando los resultados obtenidos después de realizar la titulación de 10 sueros por ambas técnicas, se observaron diferencias importantes en los títulos, especialmente en los sueros No. 1, 3, 7 y 10. Tabla 4.3.

#### 4.3. REPRODUCIBILIDAD DE LA TÉCNICA.

Con la finalidad de determinar la reproducibilidad de los resultados obtenidos por la técnica reportada por el C.D.C., se realizaron dos titulaciones a diferentes intervalos de 15 sueros; los resultados obtenidos fueron todos reproducibles, obteniendo variaciones de  $\pm$  una dilución, lo cual indicó que la técnica realizada en nuestro laboratorio era reproducible (Tabla No. 4.4).

No. de suero	1a. Titulación (C.D.C.)	2a. Titulación (C.D.C.)
1	128	256
2	256	256
3	256	256
4	32	32
5	256	256
6	64-128	64
7	64	32-64
8	256	512
9	32	32
10	16	32
11	32	32
12	128	64
13	1024	1024
14	<8	<8
15	256-512	256

Tabla 4.4. Titulación de sueros por la técnica del C.D.C., donde se observa la reproducibilidad de la técnica. El título está expresado por el inverso de la dilución.

#### 4.4. COMPARACION DE RESULTADOS POR AMBAS TECNICAS.

Al comparar los resultados obtenidos en las titulaciones por la técnica de la S.A.M. y la del C.D.C. (Tabla 4.3), se observó que la mayor variación se presentó en los sueros que dieron títulos negativos (<1:8), títulos bajos (1:8) y títulos altos 1:1024 por la técnica de la S.A.M., y se decidió titular los sueros que constituían estos grupos, utilizando la técnica del C.D.C. estandarizada. Los resultados se presentan en la Tabla 4.5.

No. de sueros	1a. Titulación (S.A.M.)	2a. Titulación (C.D.C.)
3	<8	<8
3	<8	16
1	<8	32
2	<8	64
1	8	16
1	8	256
3	1024	512
2	1024	256
3	1024	128
3	1024	64
1	1024	32
1	1024	16
<hr/> 24		

Tabla 4.5. Titulación de los 24 sueros que representan a los grupos de sueros con un título de <1:8, 1:8 y 1:1024 por la técnica de la S.A.M. y comparación del título obtenido por la técnica reportada por el C.D.C. estandarizada. El título está expresado por el inverso de la dilución.

De los 24 sueros titulados por la técnica reportada por el C.D.C., solamente 7 sueros tuvieron el mismo título de la primera titulación (S.A.M.); los 17 sueros restantes tuvieron cambio en su título. Debido a estas variaciones, se decidió titular el resto de los 87 sueros (en total 63), por la técnica del C.D.C. estandarizada. Los resultados de esta titulación se presentan en la Tabla 4.6.

No. de sueros*	1a. Titulación (S.A.M.)	2a. Titulación (C.D.C.)
1	16	16
2	16	32
3	32	16
8	32	32
2	32	64
2	32	128
2	64	<8
3	64	32
8	64	64
5	64	128
3	128	64
4	128	128
7	128	256
1	128	1024
1	256	64
2	256	128
4	256	256
2	256	512
1	512	256
2	512	512
63		

\*No. de sueros que tuvieron un determinado título por la técnica de la S.A.M. y su respectivo título por técnica del C.D.C.

Tabla 4.6. Titulación de los 63 sueros por ambas técnicas. Los sueros se agrupan por el título obtenido en la primera titulación (S.A.M.) y se comparan con la segunda titulación (C.D.C.). El título se expresa por el inverso de la dilución.

Como se observa en la Tabla 4.6, de los 63 sueros titulados, 57 sueros mostraron el mismo título (+ una dilución) al realizar la titulación por la técnica del C.D.C.; únicamente 6 sueros registraron cambio en su título.

En la Gráfica 4.2 se muestra la dispersión de los títulos de los 87 sueros titulados por ambas técnicas (S.A.M. y C.D.C.). En dicha gráfica observamos la correlación que exista entre ambas técnicas; los puntos encerrados en un círculo corresponden al valor esperado assuming una correlación del 100% en tanto que, las líneas indican el grado de dispersión para cada uno de los valores graficados; vale decir que entre más grande sea esta línea, menor es la correlación entre ambas técnicas.

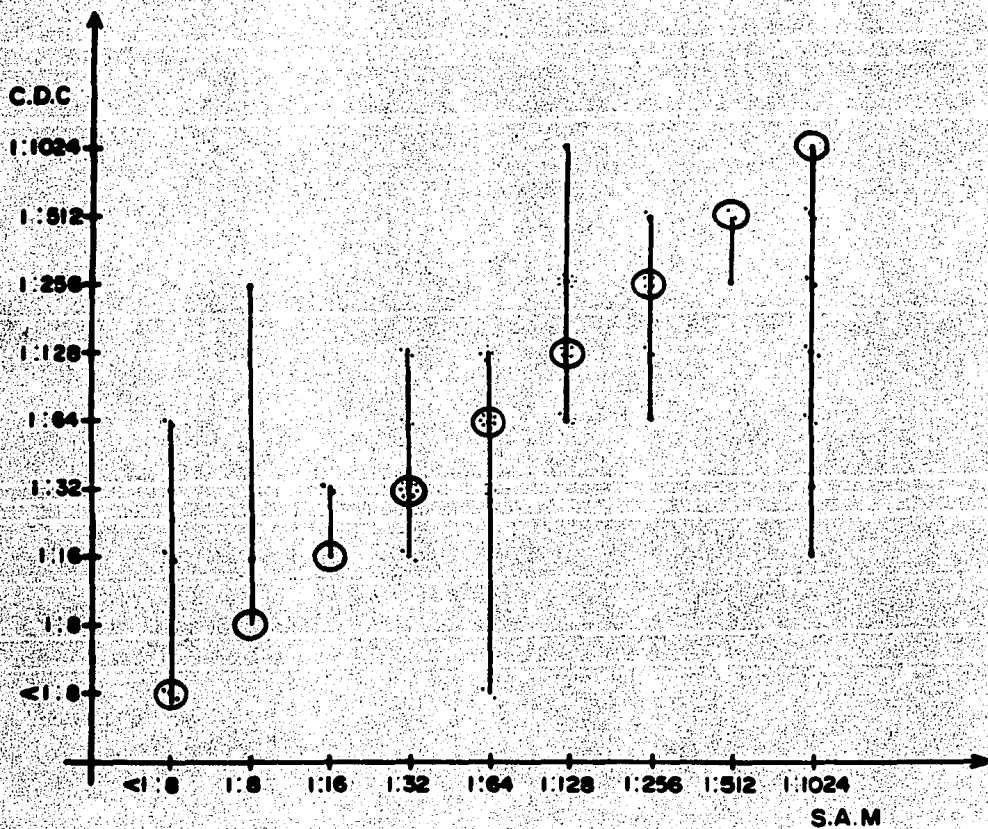
En la Tabla 4.7 se muestra la titulación de los 87 sueros por la técnica del C.D.C. estandarizada, los resultados se presentan distribuidos en porcentajes según el título obtenido.

Título	No. de sueros	%
<1:8	5	5.7
1:8	-	-
1:16	9	10.3
1:32	15	17.2
1:64	18	20.7
1:128	18	20.7
1:256	14	16.2
1:512	7	8.0
1:1024	1	1.1

Tabla 4.7. Titulación de los 87 sueros por la técnica reportada por el C.D.C.

Gráfica 4.2

Gráfica de dispersión de los 87 sueros titulados por ambas técnicas (S.A.M y C.D.C.)





#### 4.5. EXPRESION DE LOS TITULOS EN UI/ml.

Independientemente de los sueros controles utilizados en la técnica reportada por el C.D.C., se contó con un suero de referencia con un título de 500 UI/ml, que utilizamos como control primario. En la Tabla 4.8 se muestra la distribución por grupos de los 87 sueros titulados por la técnica estandarizada, el título obtenido se reporta en UI/ml.

Título (UI/ml)	X (C.D.C.)
<3.9	9.7
3.9	-
7.8	10.3
15.6	17.2
31.2	20.7
62.5	20.7
125.0	16.2
250.0	8.0
500.0	1.1

Tabla 4.8. Distribución por grupos de los 87 sueros según el título obtenido por la técnica reportada por el C.D.C. y expresión del título en UI/ml.

## CAPITULO CINCO

## DISCUSION

La técnica de la Inhibición de la Hemaglutinación (IHA) se considera como la prueba de elección para realizar encuestas seroepidemiológicas, esta prueba tiene el problema de dar resultados que varían de un laboratorio a otro. Este problema puede eliminarse si se estandarizan los parámetros que intervienen en la prueba; persiguiendo este objetivo al Centro para el Control de Enfermedades (C.D.C.), reporta la estandarización de la técnica, en la que incluye controles para cada parámetro de la prueba. Estos parámetros son:

a) La preparación de la suspensión de eritrocitos al 0.25% por un añ todo espectrofotómetro, donde se mide indirectamente la concentración de células, por la concentración de hemoglobina que se libera al lisis los eritrocitos y que se transforma posteriormente a cianomatahemoglobina, la cual se lee a 540 nm.

b) La verificación del tratamiento de los sueros, se incluye un control del tratamiento de los sueros, este control únicamente lleva suero del paciente (tratado), amortiguador y los eritrocitos al 0.25% preparados por espectrofotometría. En este caso no debemos observar aglutinación de los eritrocitos, si se observa aglutinación, el tratamiento estuvo mal realizado y el suero deberá tratarse de nuevo.

c) La titulación blanco del antígeno, en la que se verifica que el an tígeno dosificado en la titulación de los sueros sea de 4 unidades hemaglu-

tinantes.

d) Sueros control, la técnica incluye el uso de 3 sueros control cuyos títulos (<1:8, 1:16 y 1:256) se establecieron al titularlos en repetidas ocasiones por la técnica estandarizada. Estos sueros se utilizaron como controles secundarios.

Una vez estandarizada la técnica en el laboratorio, se confirmó que esta fuera reproducible, para lo cual se titularon 15 sueros y la reproducibilidad de la técnica fue buena, obteniéndose los mismos resultados en las dos titulaciones realizadas.

La necesidad de estandarizar los reactivos que se utilizan en la técnica de la IHA, se ve reflejada en las diferencias observadas al comparar los títulos obtenidos por ambas técnicas; una sin estandarizar (S.A.M.) y la otra estandarizada (C.D.C.). De dicha comparación (Tabla 5.1) se destacan los siguientes puntos:

- a) Las mayores diferencias se observaron en los sueros que presentan un título por la técnica de la S.A.M. de 1:1024, 1:16, 1:256, 1:512, 1:8 y <1:8.
- b) Comparando los resultados obtenidos al titular los sueros por la técnica del C.D.C., observamos que los porcentajes disminuían para los grupos de <1:8, 1:8 y 1:1024; en cambio aumentaron para los grupos de 1:16, 1:128, 1:256 y 1:512. Lo anterior tomando como referencia la técnica propuesta por el C.D.C.
- c) Con respecto a los grupos de sueros con título de 1:32 y 1:64, los porcentajes obtenidos al titularlos por ambas técnicas correlacionaron, no así con los demás grupos.

Título (dilución)	% (S.A.M.)	% (C.D.C.)
<1:8	9.2	5.7
1:8	3.4	-
1:16	3.4	10.3
1:32	16.1	17.2
1:64	21.9	20.7
1:128	17.2	20.7
1:256	10.3	16.2
1:512	3.4	8.0
1:1024	14.9	1.1.

Tabla 5.1. Comparación de la titulación de los sueros por la técnica reportada por la S.A.M. y el C.D.C.

En México se han realizado varias encuestas seroepidemiológicas sobre rubéola (21, 22, 34, 36, 38, 40), en estos estudios existe una variación respecto a los títulos que se consideraran como indicativos de inmunidad; en un estudio realizado por Majía Laguna, Martín Sosa y col. (34), se considera un suero positivo aquel que tiene un título de 1:16 ó más y encuentra que un 83.3% son seropositivos.

En la encuesta serológica realizada en 1968-1969 por Pedro Michel Lozano y col. (38) en la ciudad de Guadalajara, considera un título 1:10 ó más como protector y en base a esto encuentra un 87% de inmunidad en mujeres en edad reproductiva.

En el estudio realizado por la Dra. Ordoñez en 1968 (40), un suero con un título de 1:8 ó mayor, lo considera como indicativo de protección y encuentra niveles de protección del 93.5% al 98.6% en mujeres adultas.

El título mínimo que confiera protección, hasta el momento no ha sido aceptado como política universal; sin embargo, varios estudios sobre la presencia de viremia precedida por el desafío experimental de personas voluntarias, han reportado que 15 UI/ml. es el título mínimo inmune, que se considera indicativo de una respuesta satisfactoria para el virus de la rubéola (3, 41, 42).

Con el fin de referir nuestros resultados al criterio anterior y con la ayuda de un patrón internacional, expresamos nuestros resultados en UI/ml.

Nosotros encontramos que 15.6 UI/ml equivalen a una dilución de 1:32 por la técnica de la IMA estandarizada (sección 4.1.3). Esta dilución es la que se consideró como punto de referencia para definir un suero como positivo o negativo, es decir, cualquier suero que tenga un título de 1:32 ó más por la técnica de la IMA reportada por el C.D.C., se considera que tiene suficiente cantidad de anticuerpos antirubéola para conferir protección.

De acuerdo al criterio anterior, encontramos que en la muestra piloto estudiada, el 84% de las mujeres tienen un título mayor de 15 UI/ml, y solo el 16% son susceptibles a la infección. Estos porcentajes fueron iguales al realizar la titulación por la técnica reportada por la S.A.M. y por la técnica propuesta por el C.D.C. Las diferencias por la titulación con una y otra técnica se observan cuando se realiza el análisis individual de los títulos de los sueros, Tablas 4.5 y 4.6.

En el presente trabajo se tituló un total de 87 sueros; se decidió ti

ricular este número de sueros al realizar la estimación del tamaño de la muestra.

Al iniciar el trabajo experimental se tuvo un total de 130 sueros, realizamos una estimación del tamaño de la muestra y encontramos que la mínima cantidad de sueros a titular era de 80; por esta razón solo titulamos 87 sueros y con los resultados obtenidos realizamos inferencia sobre el grupo de población estudiado.

## CAPITULO SEIS

### RESUMEN

En este trabajo se determinó la protección inmune conferida por los anticuerpos antirubéola en 87 sueros, utilizando la técnica de la Inhibición de la Hemaglutinación (IHA) la cual constituye la base para realizar encuestas seroepidemiológicas y para establecer el diagnóstico de la rubéola.

El grupo piloto estudiado presenta las siguientes características: mujeres que pertenecen a una población urbana, de un nivel socioeconómico bajo y cuyas edades fluctúan de los 18 a 35 años de edad, estimándose que la mayor parte de ellas se encuentran en edad reproductiva.

La rubéola es una enfermedad exantemática leve, que por lo general se presenta en la infancia, pero que se torna en grave problema de salud cuando la persona que la sufre es una mujer embarazada susceptible, originando el síndrome de Rubéola Congénita.

Con el propósito de realizar una actividad más eficiente, en el menor tiempo posible y el más bajo costo; se realizó la estimación del tamaño de la muestra para conocer el número de sueros a titular. El cálculo se hizo considerando un total de 130 sueros y se encontró que 80 sueros era la mínima cantidad de sueros a titular; como ya se tenían titulados 87 sueros, ya no era necesario titular más; de esta forma y con los resultados obtenidos de la titulación de los 87 sueros, se realizó la inferencia sobre la muestra piloto constituida por 130 sueros.

Se realizaron dos titulaciones de los 87 sueros; la primera se hizo por la técnica reportada por la Sociedad Americana de Microbiología (S.A. M.) y la segunda por la técnica propuesta por el Centro para el Control de Enfermedades (C.D.C.). Esta última incluye varios controles que hacen de la IHA una técnica más reproducible; estos controles son: la preparación de la suspensión de eritrocitos al 0.25% por espectrofotometría, un control para verificar el tratamiento de los sueros, una titulación blanco del antígeno y la titulación de 3 sueros control con títulos pre-establecidos de 1:8, 1:16 y 1:256.

La reproducibilidad de la técnica reportada por el C.D.C. y estandarizada en el laboratorio fue buena, obteniendo los mismos resultados al titular 15 sueros.

Al comparar los resultados obtenidos por ambas técnicas se encontró que las mayores discrepancias se presentaron en los sueros con altas y bajas concentraciones de anticuerpos.

Los títulos de los sueros se expresan en UI/ml, esto se logró utilizando un suero de referencia con un título de 500 UI/ml, el titulario por la técnica de la IHA reportada por el C.D.C., encontramos que 15.6 UI/ml equivalen a una dilución de 1:32.

Considerando que 15 UI/ml es el título mínimo inmune que se considera indicativo de una respuesta satisfactoria para el virus de la rubéola, tenemos que la muestra piloto estudiada constituida por 130 sueros de mujeres en edad reproductiva, el 16% son susceptibles a la infección.



## CAPITULO SIETE

## CONCLUSIONES

La determinación de la protección inmune en los 87 sueros que forman parte de la muestra piloto estudiada en este trabajo, se realizó utilizando la técnica de la Inhibición de la Hemaglutinación (IHA), la cual se considera como la prueba de elección para realizar estudios seroepidemiológicos.

Se realizó una estimación del tamaño de la muestra, partiendo de 130 sueros se obtuvo que solo era necesario titular 80 sueros; por lo tanto no había necesidad de titular mas sueros, ya que hasta ese momento se tenían titulados 87 sueros, de tal manera que con una precisión del 3% y una confiabilidad del 95% podíamos esperar el mismo comportamiento para los 130 sueros.

Los 130 sueros que constituyeron el total de la muestra piloto, pertenecieron a mujeres en edad de concebir, cuyas edades fluctuaban de los 18 a 35 años.

La primera titulación de los sueros se hizo por la técnica reportada por la S.A.M., y la segunda titulación se realizó por la técnica reportada por el C.D.C. La diferencia esencial entre ambas técnicas fue la preparación de la suspensión de eritrocitos al 0.25%, ya que las aglutininas e inhibidores inespecíficos se retiran de igual forma, además que la técnica propuesta por el C.D.C. reporta otros controles que hacen la prueba más reproducible.

Una vez estandarizada la técnica del C.D.C. en el laboratorio, se confirmó que ésta fuera reproducible; para lo cual se titularon 15 sueros y la reproducibilidad de los resultados fue buena, obteniéndose para los 15 sueros los mismos resultados en las dos titulaciones realizadas.

Los sueros con bajas y altas concentraciones de anticuerpos presentan las mayores discrepancias; mientras que en los grupos de sueros con títulos de 1:32 y 1:64 se obtuvo una buena correlación por ambas técnicas, así mismo la menor dispersión en los títulos se observó en estos dos grupos de sueros.

Los títulos de los sueros se expresan en UI/ml, la titulación del suero de referencia por la técnica de la IHA estandarizada dió un título de 15.6 UI/ml a una dilución de 1:32. Se sabe que 15 UI/ml se considera la cantidad mínima de anticuerpos para proteger contra una infección, en base a esto se determinó que todo suero con un título de 1:32 ó mayor es indicativo de inmunidad, con este criterio se encontró que el 84% de las mujeres de la muestra piloto estudiada están protegidas y el 16% son susceptibles a la infección.

Estos resultados son comparables a los obtenidos en otras investigaciones realizadas en nuestro país, esto es, según el título que consideramos como protector, es decir 1:8, 1:16 ó 1:32. Si se considera que un suero con un título de 1:8 ó mayor es el título mínimo inmune, encontramos que la muestra piloto estudiada tiene un 94.3% de seropositividad, este resultado es similar al obtenido en el estudio seroepidemiológico realizado por la Dra. Ordoñez en 1968 en mujeres mayores de 15 años, consideradas como madres reales o en potencia (40).

Niveles de protección del 82% se encontraron en Brasil en mujeres en edad de concebir y en donde no se ha implementado la vacunación. En Israel se ha encontrado una reducción progresiva de más del 20% a menos del 10% en los niveles de seronegatividad debido a los programas de inmunización selectiva. En Inglaterra y E.U.A., también se han reducido a menos del 10% los niveles de seronegatividad debido a las intensas campañas de vacunación (5, 15, 49, 57).

Debido a que México presenta otras prioridades de salud, las autoridades de Salud Pública de nuestro país, no han considerado que se justifique en la actualidad una campaña de vacunación a nivel nacional, solo se realiza la inmunización selectiva de mujeres mayores de 12 años, cuando se demuestra que tienen anticuerpos IHA menores de 1:8.

Según las estadísticas de enfermedades transmisibles en la República Mexicana, la rubéola en 1985 registró una incidencia de 54,215 casos, más del doble que en 1984 en el cual se tuvo una incidencia de 21,250 casos. Dicho aumento en la incidencia puede implicar que la incidencia anual ha aumentado o que la vigilancia epidemiológica ha mejorado en los últimos años (6, 7).

La muestra piloto estudiada tiene aproximadamente un 16% de mujeres susceptibles a la rubéola, por tal motivo es un grupo en el que potencialmente existe el peligro de síndrome de rubéola congénita, de tal forma que sería muy acertado que toda mujer próxima a embarazarse se le practicara la prueba de la IHA y si se encuentra un título inferior al inmune debería ser vacunada, recordando en todo caso, que esta vacunación debe efectuarse cuando menos 3 meses antes de la fecha de la concepción; así se evitaría

la incertidumbre que muchas futuras madres sufren al tener un contacto con un caso de rubéola.

## BIBLIOGRAFIA

1. Anuario estadístico 1984. Dirección General de Información y Evaluación, Secretaría de Salud. Méx., D.F. nov. 1985.
2. Assaad F., Ljungars-Estaves K. Rubella-World Impact. Rev. Infect. Dis. 1985; 7(Suppl. 1): 829-36.
3. Banatvala J.E., Best J.M. Persistence of Rubella Antibodies After Vaccination: Detection After Experimental Challenge. Rev. Infect. Dis. 1985; 7(Suppl. 1): 886-90.
4. Banatvala J.E., Rubella Vaccination: Remaining Problems. British Medical Journal 1982; 6325: 1285-1286.
5. Bart K.J., Orenstein W.A., Preblud S.R. Universal Immunization to Interrupt Rubella. Rev. Infect. Dis. 1985; 7(Suppl. 1): 8177-184.
6. Boletín de Epidemiología 1986; Vol. 4 nos. 14-15, 16 julio-15 agosto de 1984.
7. Boletín de Epidemiología 1986; Vol. 1 nos. 1-8, enero-agosto de 1985.
8. Center for Disease Control. Standardized Rubella Hemagglutination Inhibition Test. Immunology No. 2 Atlanta: Center for Disease Control, August 1980.
9. Center for Disease Control. Rubella Prevention. Recommendation of the Immunisation Practice Advisory Committee. Atlanta, Georgia, Annals of Internal Medicine. 1984; 101: 505-513.
10. Center of Disease Control. Basic Laboratory Methods in Virology U.S. Department of Health and Human Services. Feb. 1981.
11. Cochran W.C. Técnicas de Muestras. 6ta. Ed. Compañía Editorial Continental. México, D.F. 1976.
12. Cooper L.E. The History and Medical Consequences of Rubella. Rev. Infect. Dis. 1985; 7 (Suppl. 1): 82-10.
13. Greiner M.E., Hagans S.J., Fucuchi R. Improved Serological Diagnosis of Rubella. Journal of Clinical Microbiology 1983; 18: 743-744.
14. Davis Bernard D., Dulbecco. Tratado de Microbiología 2a. Ed. Salvat Editores, S.A. Barcelona 1983 pág. 1376-1382.
15. Dudgeon J.A. Selective Immunization: Protection of the Individual. Rev. Infect. Dis. 1985; 7(Suppl. 1): 8185-190.

16. Fenner F., White D.O. *Virología Médica*. 2a. Ed. La Prensa Médica, S. A. México 1979 pág. 411-420.
17. Fields B.N. et al. (Ed.) *Virology*. Raven Press, New York 1985 pág. 1003-1020.
18. Foragreen M. Standardisation of Techniques and Reagents for the Study of Rubella Antibody. *Rev. of Infect. Dis.* 1985; 7(Suppl. 1): 8129-132.
19. Fureas J., Varughese P., Acres S.E. Rubella Immunisation in Canada. *Rev. Infect. Dis.* 1985; 7(Suppl. 1): 8191-197.
20. Gross K., Dorosett P.H. Rubella Virus Antigens: Localization of Epitopes Involved in Hemagglutination and Neutralization by Using Monoclonal Antibodies. *J. Virol.* 1986; 57: 893-898.
21. Golobjantnikov R., Lapla L., Filloy L. Anticuerpos Inhibidores de la Hemaglutinación para Sarampión, Parotiditis y Rubéola. *Salud Pública de México*. 1970; 12: 603-609.
22. Gutiérrez G., Ruiz-Gómez J. Seroepidemiología de diez Padecimientos Infecciosos en Niños de la ciudad de México. *Cac. Méd. (Méx.)* 1973; 105: 529-540.
23. Herrmann K.L. Rubella Virus. Lennette E.H., Schmidt N.J., Balows A. and Hauster W. (Ed.) *Manual of Clinical Microbiology*, 4th Ed. American Society for Microbiology. 1985; 779-784.
24. Herrmann K.L. Available Rubella Serologic Test. *Rev. Infect. Dis.* 1985; 7(Suppl. 1): 8108-112.
25. Herrmann K.L. Rubella Virus. Lennette E.H. and Schmidt (Ed.) *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*, 5th. Ed. American Public Health Association, Washington D.C. 1979: 725-766.
26. Horstmann D.M. Rubella. In: Evans A.S. Ed. *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control*. 2nd. Ed. N.Y.: Plenum Medical Book Co. 1982: 519-539.
27. Horstmann D.M. Rubella. The Challenge of Its Control. *J. Infect. Dis.* 1971; 123: 640-654.
28. Kumate, J. *Inmunidad, Inmunización y Vacunas* 2da. Ed. Eds. Médicas del Hospital Infantil de México. México, D.F. 1979.
29. Kono R., Miyayama M., Sugihita Ch. Epidemiology of Rubella and Congenital Rubella Infection in Japan. *Rev. Infect. Dis.* 1985; 7(Suppl. 1): 856-63.
30. Kreyssing Ervin. *Introducción a la Estadística Matemática*. 5th Ed. Editorial Limusa Méx. D.F. 1981.

31. Leon Rosen. Hemagglutination with Animal Viruses. In Habel Karl (Ed.) *Fundamental Techniques in Virology*. Academic Press, N.Y. 1969; 276-287.
32. Liebhaber H. Measurement of Rubella Antibody by Hemagglutination Inhibition. I. Variables affecting rubella hemagglutination. *J. Immunol.* 1970; 4: 818-825.
33. Liebhaber H. Measurement of Rubella Antibody by Hemagglutination Inhibition. II. Characteristic of an Improved HAI Test Employing a New Method for Removal of Non-immunoglobulin MA Inhibitors from Serum. *J. Immunol.* 1970; 4: 826-834.
34. Laguna-Majía J., Martín Sosa S. y col. Investigación de Anticuerpos Antivirus del Sarampión y Antivirus de la Rubéola en Pacientes de la Población Universitaria. Memorias, IV Jornadas Internas de Trabajo y Ier. Congreso Nacional de Salud Escolar y Universitaria. Dir. Gral. de Servicios Médicos de la UNAM. Dic. 1979.
35. Mandell G., Douglas G. *Principles and Practice of Infectious Diseases* 2a. Ed. John Wiley Ed. New York 1985.
36. Martín Sosa S., Magaña M.C. Encuesta de Anticuerpos contra la Rubéola en Estudiantes Universitarias. *Bol. NEd. Hosp. Inf.* 1974; 31: 1165-1170.
37. Meegan J.M. Comparison of Latex Agglutination Test with the Hemagglutination Inhibition Test, Enzyme Linked Immunosorbent Assay and Neutralisation Test for Detection of Antibodies to Rubella Virus. *J. Clin. Microbiol.* 1972; 4: 644-649.
38. Michel L.P. Encuesta Serológica para Detectar Anticuerpos contra la Rubéola en Cd. de Guadalajara. *Rev. Invest. Salud Pública (Méx.)* 1970; 30: 51-62.
39. Orenstein W.A. Methods of Assessing the Impact of Congenital Rubella Infection. *Rev. of Infect. Dis.* 1985; 7(Suppl. 1): 222-28.
40. Ordoñez B.R. Frecuencia de la Rubéola en México. *Investigación Epidemiológica. Cac. NEd. Méx.* 1969; 99: 1163-1175.
41. O'Shea S., East J.M. Viremia, Virus Excretion and Antibody Response After Challenge in Volunteers with Low Levels of Antibody to Rubella Virus. *J. Infect. Dis.* 1983; 148: 639-640.
42. O'Shea S., Parsons G. How Well do Level of Rubella Antibody Protect. *Lancet* 1981; 2: 1282.
43. Peckham C. Congenital Rubella in the United Kingdom before 1970: The Prevaccine Era. *Rev. of Infect. Dis.* 1985; 7(Suppl. 1): 811-16.

44. Perkins E.T. Lincod Vaccines. *Rev. Infect. Dis.* 1985; 7(Suppl. 1): 573-76.
45. Plotkin S.A. A Simple Method for Removal of Rubella Hemagglutination Inhibitors from Serum Adaptable to Finger Tip Blood. *J. of Epidemiology* 1968; 8: 301-304.
46. Plotkin S.A., Buser F. History of RA27/3 Rubella Vaccine. *Rev. Infect. Dis.* 1985; 7(Suppl. 1): 577-78.
47. Ramos-Alvarez M., Bessudo L., Kenny M. Administración Simultánea en Diferentes Dosificaciones de las Vacunas de Virus Vivos Atenuados contra Sarampión, Parotiditis y Rubéola. *Bol. Méd. Hosp. Inf.* 1976; 875-886.
48. Ruiz Gómez J., Gutiérrez G. Evaluación de la Vacuna de la Rubéola NPV,DK12 en la ciudad de México. Posible Transmisión de la Cepa Vacunal. *Arch. Invest. Méd.* 1971; 19: 491-504.
49. Schatzmayr H.G. Aspects of Rubella Infection in Brasil. *Rev. Infect. Dis.* 1985; 7(Suppl. 1): 553-55.
50. Schiff M., Young C.B. Challenge with Rubella Virus after loss of Detectable Vaccine-Induced Antibody. 1985; 7(Suppl. 1): 5157-163.
51. Schmidt J. Variables of Rubella Hemagglutination Inhibition Test System and their Effect on Antigen and Antibody Titers. *Appl. Microbiol.* 1970; 19: 491-504.
52. Schuenderberg A., Horstmann D.M. Neutralizing and Hemagglutination Inhibition to Rubella Virus as Indicators of Protective Immunity in Vaccines and Naturally Immune Individuals. *J. Infect. Dis.* 1978; 138: 877-883.
53. Seth P., Manjunath N. Rubella Infections: The Indian Scene. *Rev. Infect. Dis.* 1985; 7(Suppl. 1): 5164-169.
54. Sever L.J., South N. Delayed Manifestations of Congenital Rubella. *Rev. Infect. Dis.* 1985; 7(Suppl. 1): 164-169.
55. Sheechari I.C. Comparison of Hemagglutination Inhibition Test Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Determining Antibody to Rubella Virus. *J. Clin. Microbiol.* 1981; 13: 850-854.
56. Stewart C.L., Parkman P.D. Rubella-Virus Hemagglutination Inhibitions Test. *The New England Journal of Medicine* 1969; 10: 554-557.
57. Swartz T. et al. Epidemiology of Rubella and Congenital Rubella Infection in Israel. A Country a Selective Immunisation Program. *Rev. Infect. Dis.* 1985; 7(Suppl. 1): 542-46.



58. **Symposium Summary: Prevention of Congenital Rubella Infection. Rev. Infect. Dis. 1985; 7(Suppl. 1): S212-215.**
59. **Tobin J., Sheppard S. Rubella in the United Kingdom, 1970-1983. Rev. Infect. Dis. 1985; 7(Suppl. 1): S47-52.**
60. **Trudel M., Madon F. Identification of Rubella Virus Structural Proteins by Immunoprecipitation. J. Virol. Methods 1982; 5: 191-197.**
61. **Trudel M. et al. El Glicoproteín de Rubella Virus Carries an Epitope that binds a Neutralizing Antibody. J. Virol. Methods. 1985; 3-4: 243-50.**
62. **Vassanen P. Comparison of a Simple Latex Agglutination Test with Hemagglutination Inhibition and Radioimmunoassay for detection of Rubella Virus Antibodies. J. Clin. Microbiol. 1983; 5: 793-795.**
63. **Wolfgang K.J. Microbiología Zinsser. Amos D.B. (Ed.) 18a. Ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires Arg. 1986; 1207-1210.**