

9
20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**CORRELACION ENTRE LAS TECNICAS DE INHIBICION DE LA
HEMAGLUTINACION Y ELISA EN LA DETERMINACION DE
ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE LA RUBEOLA**

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A

MARIA DE LOS ANGELES COUTIÑO CONSTANTINO

DIRECTOR DE TESIS:

Q.B.P. JAVIER ZAVALA GONZALEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX. 1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

I N D I C E

	Pag.
RESUMEN	
ABREVIATURAS	
Capítulo	
I. INTRODUCCION	1
II. GENERALIDADES	4
2.1 Antecedentes Históricos	4
2.2 Características Virales	5
2.3 Manifestaciones Clínicas	8
2.4 Respuesta Inmune	12
2.5 Epidemiología y Control	14
2.6 Diagnóstico de Laboratorio	20
2.7 Objetivos	26
2.8 Hipótesis	27
III. MATERIAL Y METODOS	28
3.1 Material Biológico	28
3.2 Metodología (Plan de Trabajo)	32
A) Determinación de anticuerpos anti- rubéola por ELISA	33
A-1) Preparación de Reactivos	33
A-2) Elaboración de la Curva Patrón	33
A-3) Procedimiento	33
B) Determinación de anticuerpos anti- rubéola por IHA	37
B-1) Tratamiento de los sueros	37

B-2)	Estandarización de los Eritrocitos Tripsinizados	38
B-3)	Titulación del Antígeno Viral por hemaglutinación	40
B-4)	Inhibición de la hemaglutinación viral	42
IV	RESULTADOS	48
4.1	Determinación de anticuerpos anti rubéola por ELISA	48
4.2	Determinación de anticuerpos por método de IHA y ELISA en sueros pares	54
4.3	Correlación de las técnicas de ELISA e IHA	57
V	DISCUSION Y CONCLUSIONES	65
	APENDICE	74
	BIBLIOGRAFIA	80

R E S U M E N

Se utilizó la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación reportada por el Centro para el Control de Enfermedades (C.D.C.) de Atlanta Georgia U.S.A., empleando la hemaglutinina del virus de la rubéola cepa Therien, por ser la técnica de referencia para conocer la relación que se tiene en la cuantificación de anticuerpos antirrubéola con la técnica de ensayo inmunoenzimático (ELISA) de un sistema de prueba indirecto de la casa Behring, en 75 sueros pares provenientes de estudiantes universitarias (F.E.S. Cuautitlán) con edades entre los 18 y 30 años de edad. Se obtuvo un coeficiente de correlación (r) de 0.75 entre estas dos técnicas con una concordancia del 93.0% en la evaluación de la inmunidad antirrubéola. La utilidad de la prueba de ELISA resalta debido a su mayor sensibilidad (91.0%) y especificidad sobre la técnica de IHA estandarizada (88.0%) en la determinación de inmunidad antirrubéola, encontrando en la población estudiada una susceptibilidad del 9.3 al 16.0% dependiendo de la sensibilidad del método utilizado y debido a su fácil desarrollo, la técnica de ELISA nos permite efectuar un gran número de valoraciones en forma ventajosa.

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
RNA	Acido ribonucleico
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
PLA	Aglutinación de partículas de látex
C.D.C.	Centro para el Control de Enfermedades
CNMhb	Cianometahemoglobina
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
FA	Fosfatasa alcalina
FC'	Fijación del complemento
HRS	Hemólisis radial simple
IHA	Inhibición de la Hemaglutinación
HA	Hemaglutinación
IRC	Infección de rubéola congénita
IFA	Inmunofluorescencia
µL	Microlitros
NT	Neutralización viral
RIA	Radioinmunoanálisis
SRC	Síndrome de rubéola congénita
PV ⁺	Valor predictivo inmune
PV ⁻	Valor predictivo no-inmune
UHA	Unidades hemaglutinantes

CAPITULO I

I N T R O D U C C I O N

La rubéola es una enfermedad infecciosa que ha demostrado su potencial teratógeno en niños nacidos de mujeres que la han padecido durante el primer trimestre de la gestación (8, 11, 13).

El riesgo de infección para las mujeres en etapa fértil está relacionado con su estado inmunitario hacia este virus; estudios serológicos en distintos grupos humanos han presentado variaciones importantes en la susceptibilidad al virus de la rubéola en mujeres de diferentes comunidades (1, 28, 38).

En nuestro país, la exposición al virus de la rubéola se establece en edades muy tempranas en forma clínica ó subclínica, de modo que a los 15 años se considera muy alta la presencia de anticuerpos que confieren inmunidad (5, 33).

No obstante, estudios realizados en la Ciudad de México, indican que cerca del 10% de las mujeres en edad de concebir se encuentran desprotegidas ante dicha enfermedad teniendo el riesgo de contraerla durante el embarazo (33, 42).

De ahí la importancia de prevenir esta infección antes del embarazo, mediante la detección de mujeres susceptibles a través de

la evaluación de su inmunidad sérica seguida por la vacunación de mujeres seronegativas (33, 42).

El diagnóstico de laboratorio rápido y preciso de las enfermedades infecciosas es indispensable tanto para prestar atención inmediata al paciente como para introducir las medidas de salud pública que sean necesarias, esto es de radical importancia, pues en la mayoría de las infecciones causadas por virus, el diagnóstico clínico no es lo suficientemente claro, debido a que muchos virus pueden ocasionar un cuadro clínico muy parecido, dificultando así el diagnóstico diferencial preciso (10).

Uno de los principales retos de la ciencia médica moderna es la integración de los adelantos básicos de la inmunología a los procedimientos de diagnóstico que sean útiles en la clínica médica, esta necesidad se ha ido solucionando en los últimos años ya que los métodos de laboratorio se han vuelto cada vez más refinados y simplificados y debido a su especificidad y sensibilidad, han alcanzado un papel central en el diagnóstico clínico.

De estos métodos, el ensayo inmunoenzimático conocido como ELISA, que fué introducido por Engvall y Perlman y Van-Weeman Schuuner en 1971 (49), como método práctico para la determinación de anticuerpos contra antígenos microbianos y otras sustancias biológicas, ha significado un avance para la evaluación de la serología viral, sustituyendo otras técnicas de diagnóstico ya que permite tanto la

evaluación de la protección inmune como la demostración de un proceso activo de infección (16, 20, 31, 43, 48).

CAPITULO II

GENERALIDADES

2.1. Antecedentes Históricos

La infección por el virus de la rubéola, se ha descrito como entidad nosológica desde mediados del siglo XIX. La etiología de la enfermedad fué demostrada en 1938, por Hiro y S. Tasaka (11). En 1941, la era contemporánea de la rubéola comienza, cuando el Dr. N. Mc. Aliester Gregg oftalmólogo australiano descubrió que el virus de la rubéola es teratógeno cuando afecta a la mujer en etapa de embarazo, tal asociación fué confirmada universalmente en todos los países hasta la disponibilidad de vacunas (8, 11, 38).

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 (8, 38).

En 1969, tres vacunas de virus de rubéola atenuados fueron aprobados para su uso en humanos, estas son: la HPV-77, la Cendehill y la RA27/3 (8, 22).

Entre 1971-1979, se realizó en EE.UU. la inmunización de la población femenina con la vacuna Cendehill o la HPV-77 (4).

En 1980, la vacuna HPV-77DE5 es reemplazada por la RA27/3 como única vacuna distribuida en los EE.UU., por tener menos efectos colaterales (4, 8). La disminución de embriopatías por rubéola ha disminuido en EE.UU. a partir de 1984, debido al incremento de métodos de diagnóstico de laboratorio y a la práctica de la vacunación (14, 22, 38).

2.2. Características Virales

El virus de la rubéola es el único miembro del género Rubivirus de la familia Togaviridae (7). Clasificado en base a sus propiedades bioquímicas y biofísicas que se presentan en la Tabla No. 1

Es un virus esférico envuelto, que contiene una fibra simple de RNA de polaridad positiva (7, 21, 23).

La composición esencial del virión de la rubéola es de tres proteínas estructurales especialmente 2 glicoproteínas de envoltura E1 y E2 (E2a, E2b), así como una nucleoproteína "C", asociada con el RNA infeccioso del virión, con pesos moleculares de 59K, 43 a 48K y 34K respectivamente, en proporciones de 5:1:5 para E1:E2:C. Estas proteínas están codificadas por tres genes y en ellas radica la capacidad inmunogénica del virus (7; 25). En la Figura No. 1 se esquematiza la morfología básica del virus de rubéola, con algunas de sus características.

Tabla No. 1 CARACTERISTICAS DEL VIRUS DE LA RUBEOLA

(7, 21, 23)

A.- Propiedades de la partícula viral:

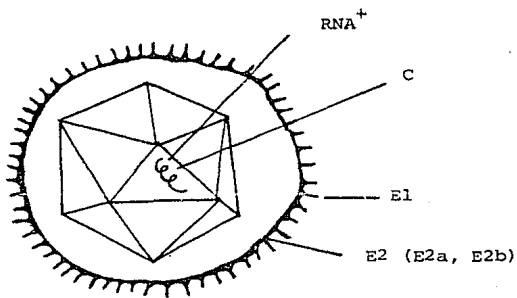
Acido Nucleico:	Molécula única de sentido positivo RNA-mc, con peso molecular de 3.2×10^6 dalton.
Morfología :	Esférico de 50 a 70 nm de diámetro, superficie con proyecciones.
Simetría :	Icosaédrica
Envoltura :	Lipoídica
Efecto sobre la célula:	Presenta actividad hemaglutinante (HA) ion-dependiente.
Propiedades Fisicoquímicas.	
Densidad de Flotación:	1.18 - 1.20 g/ml
Coefficiente de sedimentación:	280 S.
Destrucción de infectividad:	Solventes lipídicos, tripsina, radiación U.V.
Estabilidad pH :	6.8 - 8.1
Temperatura :	Se inactiva a 56°C por 30 min, 70°C por 4 min., establece a 4°C por más de 7 días e indefinidamente a -60°C.

B.- Multiplicación:

En el citoplasma. La maduración ocurre por gemación a través de la membrana intracitoplasmática.

C.- Carácterés Biológicos:

El miembro del género Rubivirus (Rubella virus) no es transmisible por artrópodos.
 No relacionado serológicamente con otros Togaviridae
 No existe hospedador invertebrado. El hombre es el único hospedador vertebrado conocido.



Características:

- . Tipo de genoma RNA⁺. Asociado con una nucleoproteína "C".
- . Morfología Partícula esférica con proteínas de envoltura (E1, E2)
- . Simetría Icosaédrica

Figura No. 1 DIAGRAMA DE LOS COMPONENTES DEL VIRUS DE LA RUBEOLA (7, 21, 23).

2.3. Manifestaciones Clínicas.

La rubéola es una enfermedad infecto-contagiosa, que por sus repercusiones clínicas se puede clasificar en dos tipos de infección.

La infección postnatal, inducida en personas susceptibles por la instilación del virus en las mucosas de las vías respiratorias superiores. Tiene un período de incubación de 14 a 21 días, generalmente es una enfermedad febril leve, caracterizada por síntomas prodrómicos mínimos o nulos, erupción transitoria eritomatosa y reacciones del sistema linfático con leves manifestaciones generales, que afecta con mayor frecuencia a niños de 3 a 9 años y a los adultos jóvenes pocas veces produce complicaciones y virtualmente nunca es fatal. No obstante, en adultos, sobre todo en mujeres la enfermedad comunmente se acompaña por una poliartritis transitoria (8).

Este padecimiento tan trivial se presenta como un problema en la mujer no inmune en etapa fértil, ya que frecuentemente conduce a la infección congénita (Figura No. 2) (13, 34).

La viremia materna puede dar lugar a la infección placentaria y a la consiguiente viremia fetal. En los tejidos fetales se piensa que el virus de la rubéola tiene un efecto inhibitorio de la mitosis celular y un efecto citopatogénico lo que explicaría la génesis de malformaciones (6, 11, 32).

Las consecuencias de la rubéola son variadas e impredecibles dependiendo de la época del embarazo en que se presenta la enfermedad y puede ir desde la muerte fetal, anomalías al nacimiento ó aún niños normales sin evidencia clínica de infección (8, 13, 34).

La precocidad con que se produzca la infección durante el embarazo es un elemento crucial en la patogenia de la rubéola congénita. Es evidente que el riesgo de malformaciones es alto entre más corto es el período de gestación transcurrido (13).

El síndrome de rubéola congénito (SRC) se caracteriza por la infección del producto que puede presentarse con defectos únicos, malformaciones múltiples e incluso infección activa, por lo que las manifestaciones clínicas de la rubéola congénita pueden ser agrupadas en tres categorías que reflejan los mecanismos involucrados en la patogénesis y ellos son:

A.- Condiciones pasajeras en el recién nacido ó en el joven infante.

Retraso en el crecimiento (Bajo peso al nacer)

Púrpura trombocitopénica

Hepatitis

Anemia hemolítica

Hepatoesplenomegalia

Lesiones en los huesos largos

B.- Manifestaciones estructurales permanentes que pueden presentarse en el nacimiento ó durante el primer año de vida.

Auditivas : Sordera total ó marcada hiposensibilidad auditiva.

Alteraciones oculares:
Cataratas, glaucoma, retinopatía, microftalmia, miopía severa.

Cardiovasculares:
Persistencia del conducto arterioso, defectos del tabique ventricular, estenosis pulmonar y coartación de la aorta, necrosis del miocardio.

Neurológicas : Retraso psicomotor, microcefalia, encefalitis, retraso mental.

C.- Manifestaciones tardías en jóvenes ó al principio de la edad adulta.

Desórdenes endócrinos:

Diabetes Mellitus

Hipotiroidismo

Hipertiroidismo

A pesar de la diversidad y gravedad de su patología, el SRC, pasa inadvertido en el nacimiento. La tasa de mortalidad entre los niños infectados en etapa de gestación por virus de la rubéola y que presentan síntomas al nacer es un 20% (8, 34).

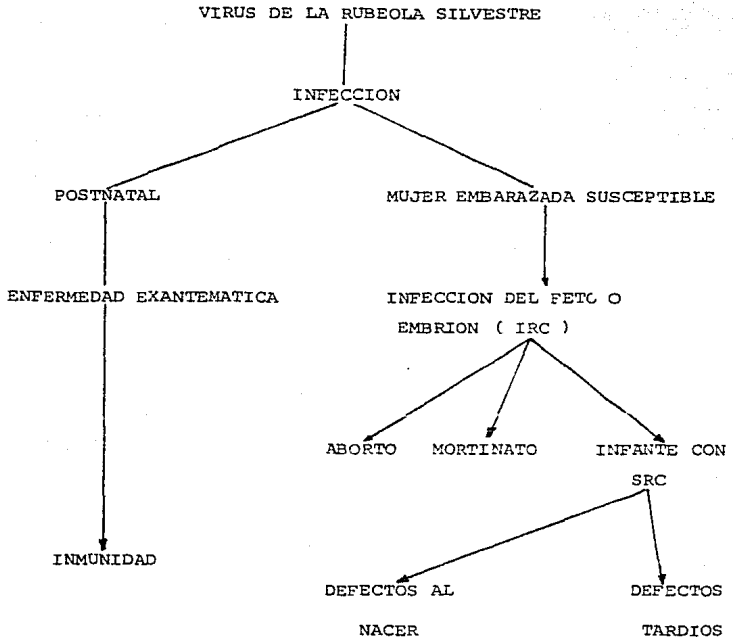


Figura No. 2 INFLUENCIA DEL VIRUS DE RUBEOLA EN LA INFECCION POST-NATAL Y EN LA MUJER NO INMUNE EN ETAPA FERTIL (13, 34).

2.4. Respuesta Inmune.

El curso de la infección, detección viral y síntesis de anticuerpos se observa en la Figura No. 3

La duración de la infección adquirida por virus de rubéola, está limitada de 2 a 3 semanas, esto es por los mecanismos de defensa del huésped. Al ocurrir el exantema cesa la viremia desencadenándose simultáneamente respuestas específicas debidas principalmente a anticuerpos. Sin embargo el virus puede ser aislado a partir de secreciones nasofaríngeas desde siete días antes de la aparición del exantema hasta siete días después de la aparición del exantema (10, 15, 36').

La infección natural estimula la producción de varios tipos de anticuerpos detectados por diversas técnicas. El primero en aparecer es el anti cuerpo inhibidor de la hemaglutinación (IHA) que eleva sus títulos rápidamente y alcanza una meseta en aproximadamente 2 a 3 semanas, y puede persistir durante muchos años. Los anticuerpos neutralizantes (Nt), son demostrables pocos días después persistiendo durante años. El anticuerpo fijador de complemento (FC') no aparece hasta aproximadamente 30 días después de la exposición, su título llega al máximo durante el primer y segundo mes postinfección tras lo cual el comportamiento no es predecible (11, 20, 27, 40).

Las proteínas de la cápside viral, estimulan a los linfocitos

B, para sintetizar anticuerpos humorales IgM, IgG e IgA sérica y secretora (9, 19).

La primer respuesta de inmunoglobulinas después del estímulo antigénico suele ser del tipo IgM, con actividad específica contra el virus, aparecen 16 días después de la exposición alcanzando su máximo por el día 25, siendo sustituidas progresivamente por los anticuerpos IgG para mantenerse de por vida (29, 36).

2.5. Epidemiología y Control.

La epidemiología de la rubéola está dominada por consideraciones acerca de su efecto teratogénico.

La enfermedad presenta una preferencia estacional en Europa y en los EE.UU. durante los meses de invierno y primavera y, aunque esto pueda concordar con lo observado en otros países en zonas templadas se reportan numerosos casos en todas las épocas del año (8).

La inquietud por el problema rubéolico, ha surgido en aquellos países donde se han reportado epidemias en grandes núcleos de la población y en los que además existe una proporción considerable de mujeres susceptibles (38). Esta situación se ha observado en los EE.UU. en los años de 1935, 1943 y 1964. Como consecuencia de estas epidemias se estima que 30,000 niños tu-

vieron algún problema congénito relacionado con el virus de la rubéola en toda la unión americana.

El control de la rubéola en los EE.UU., se ha logrado mediante la inmunización sistemática de la población escolar (masculina y femenina), con el propósito de eliminar la circulación del virus y proteger de esta manera a las mujeres no inmunes en etapa fértil. Desde 1969, cuando se autorizó la vacuna contra la rubéola, la frecuencia de la infección en la población, y por tanto, de esta enfermedad, ha disminuído constantemente a la fecha Figura No. 4 (38).

Sin embargo, en la Ciudad de México, la epidemiología no es igual a la de otros países, puesto que los niveles de vida no son los mismos (33).

La rubéola en nuestro país tiene características endémicas ya que la mayoría de la población tiene anticuerpos contra este virus, siendo inmunes un alto porcentaje de mujeres en etapa fértil, por lo que no se justifica la vacunación masiva, ya que existen otras enfermedades que son verdaderos problemas de salud pública y por lo tanto tienen prioridad en la aplicación de recursos económicos, por lo que la vacunación debe ser aplicada selectivamente en mujeres fértiles no-inmunes (1, 33, 42).

Los datos más recientes sobre rubéola según las estadísticas

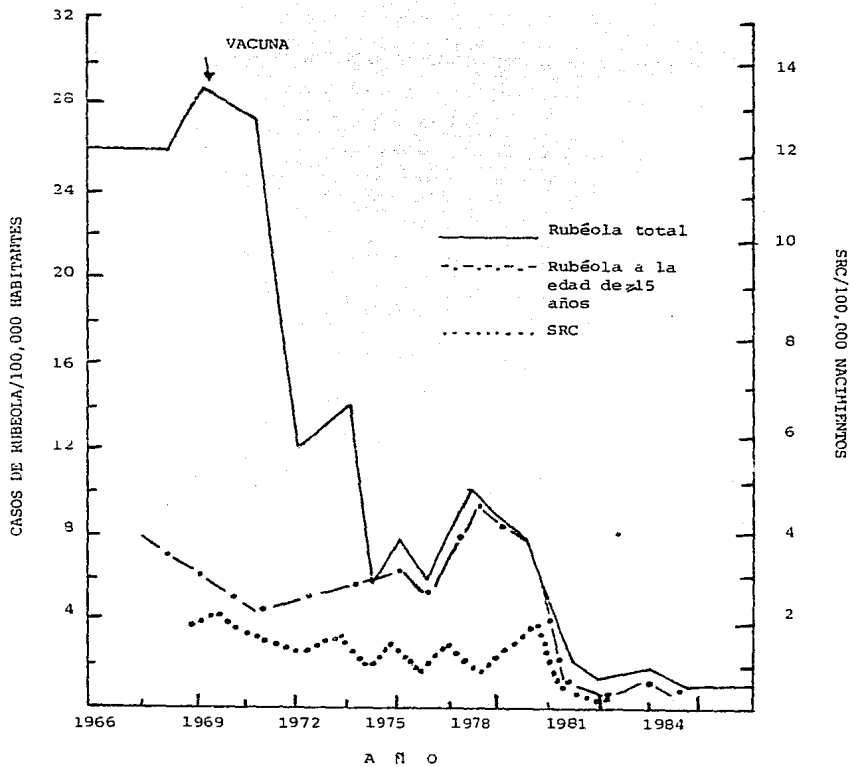


Figura No. 4 INCIDENCIA DE LA PROPORCION DE CASOS DE RUBEOLA Y S.C.R. EN EE.UU. DESDE 1966 - 1985 (38).

de enfermedades transmisibles en la República Mexicana corresponden al año de 1986, en ellos se notifican 54,215 casos de rubéola, más del doble que en 1984 en el cual tuvo una incidencia de 21,250 casos.

El lugar que ocupa la infección por rubéola entre las enfermedades transmisibles en México, según los datos reportados, ha variado del 19o. lugar en 1970 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 2 situaciones: que la incidencia de la rubéola en México ha aumentado o que la vigilancia epidemiológica ha mejorado en los últimos años (5).

De ahí que el procedimiento aconsejable sea determinar primero la susceptibilidad por examen serológico y administrar la vacuna a las mujeres no-inmunes que lo soliciten, asegurándose que la persona no este embarazada y que no lo vaya a estar dentro de los tres meses después de la vacunación, para evitar un posible efecto teratógeno producido por el virus de la vacuna (4, 36, 38).

En los individuos infectados o vacunados, el virus de la rubéola, causa una pronunciada inmonorespuesta que puede medirse con las técnicas serológicas disponibles y de esta manera conocer la inmunidad que se presenta (4, 9, 16).

La prevención de la enfermedad viral se ha logrado primordialmente a través de la elaboración de vacunas (3).

Se dispone de vacunas atenuadas derivadas de cultivos de tejido, por medio de pases seriados del virus de rubéola: En células renales de mono verde africano (GMK), después de 77 pases se encontró disminución importante de su virulencia, la cepa se conoce como HPV-77; una atenuación ulterior en pases por embrión de pato HPV-77DE5; la cepa Cendehill atenuada mediante 53 pases en riñón de conejo a partir de 4 pases en células GMK (36).

Se han desarrollado otras cepas en riñón de cobayo (cepa japonesa To-336) y se tiene la vacuna, la RA27/3 atenuada en 25 pases en células diploides humanas WI-38 (13, 22, 36).

La administración de estas vacunas ha producido seroconversión del 95% de receptores susceptibles (3). Los eventos virológicos son similares pero en menor magnitud, siendo los valores de anticuerpos IHA y Nt de 4 a 8 veces menores que los registrados en la infección natural, pero usualmente las concentraciones permanecen sin cambio por más de tres años, con menor cantidad de virus en las secreciones faríngeas, viremia y eliminación faríngea de menor duración (22).

Se han evaluado las respuestas de inmunización contra diversas

vacunas, indicando que si bien inducen una perdurable respuesta inmunitaria, se ha encontrado un riesgo de aislamiento del 3.1% para la cepa RA27/3, en comparación de un 20% para la HPV-77 y la Cendehill (4, 22).

La eficacia global se ha medido por el grado de protección conferida al huésped inmunizado después de la exposición a la infección. La utilidad de las vacunas no se ha medido simplemente por la aparición de anticuerpos séricos sino por la observación de una mayor protección contra la enfermedad (24, 36).

La vacuna RA27/3 tiene ventajas sobre las otras, debido a que se ha demostrado que produce una mayor inmunogenicidad por un tiempo más prolongado en intervalos de 11 a 12 años postvacunación (3, 14, 22), proporcionando una inmunidad más sólida contra reinfecciones que la respuesta obtenida por la HPV-77DE5 ó la Cendehill (12, 13).

En las determinaciones de inmunoglobulinas específicas contra el virus de rubéola, las vacunas muestran una respuesta de IgM menos prolongada que la infección natural, con mayor predominancia de anticuerpos IgG (12, 29).

La información acerca del desarrollo de anticuerpos IHA, IgG e IgM postvacunación es útil para el diagnóstico de la inmunidad que se tiene hacia una infección por rubéola (20).

2.6. Diagnóstico de Laboratorio

Con frecuencia la rubéola se confunde con otras enfermedades que coexisten con exantema maculopapular, como las causadas por numerosos picornavirus (ECHO, Coxsackie), paramixovirus, reovirus etc., así como las erupciones producidas por fármacos y con la fiebre escarlatina.

Un diagnóstico certero de rubéola se hace únicamente por aislamiento del virus y su identificación (Métodos Directos), ó por la respuesta inmune que presenta el organismo a la infección viral (Métodos Indirectos).

MÉTODOS DIRECTOS

El empleo de los cultivos celulares como sistemas de propagación para el estudio de los virus, ha hecho posible el avance considerable en los conocimientos de los efectos biológicos que permiten la identificación del agente.

El aislamiento del virus de rubéola en cultivos celulares condujo a la primera prueba viral disponible para un diagnóstico definitivo de dicha enfermedad.

El virus de la rubéola ha sido cultivado e identificado durante el curso clínico de la enfermedad, a partir de las secreciones nasofaríngeas, orofaríngeas, orina, LCR, placenta y tejidos abortados.

La presencia del virus se demuestra por la aparición de cambios citopatológicos (ECP) en líneas celulares RK-13 (derivadas de células de riñón de hamster) usualmente después de 6 a 8 días de la inoculación en las monocapas celulares (29, 30), así como por interferencia viral en células amnióticas humanas, células Vero (6, 9).

Los virus aislados se identifican específicamente empleando anticuerpos conocidos que inhiban o neutralicen los efectos biológicos del virus o reaccionen con los antígenos virales (hemaglutinantes ó fijadores de complemento).

Las técnicas clásicas de laboratorio que habitualmente se emplean en virología, si bien específicas y sensibles, suelen ser tediosas, difíciles ó, en algunos laboratorios, de ejecución imposible.

MÉTODOS INDIRECTOS

Las técnicas serológicas empleadas para la detección de anticuerpos contra el virus de la rubéola son de importancia diagnóstica primordial, ya que nos permiten diferenciar las infecciones agudas y congénitas, así como poder establecer la inmunidad que se tiene contra este virus, valorando las inmunoglobulinas M y G respectivamente (9, 12, 17, 34).

Las pruebas serodiagnósticas comunmente empleadas, incluyen

la fijación del complemento (FC'L, inmunofluorescencia indirecta (IFA), neutralización viral (Nt), inhibición de la hemaglutinación (IHA) y más recientemente emergida, la prueba de ensayo inmunoenzimático (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), hemólisis radial simple (HRS) y aglutinación de partículas de látex (LA); para las cuales existe un patrón de respuesta de anticuerpos característicos de cada prueba (Figura No. 5) (20,45).

Todos estos sistemas de ensayo, a excepción de la FC' y la determinación de inmunoglobulinas de la clase IgM, detectan anticuerpos que persisten durante años y por lo tanto son pruebas adecuadas para la determinación de la inmunidad que se tiene ante una infección pasada o inmunización, así como el diagnóstico de la infección aguda de rubéola.

La sensibilidad de estos ensayos en la detección de bajos niveles de anticuerpos de rubéola varían considerablemente.

Las sensibilidades relativas de estas pruebas están ampliamente determinadas por sus especificidades (16, 41, 43, 46).

En la actualidad se han desarrollado un gran número de pruebas serológicas, incluyendo equipos comerciales con reactivos preestandarizados, que son generalmente usados en los laboratorios clínicos, útiles para la valoración de anticuerpos contra rubéola. La composición y calidad de varias pruebas comerciales,

se han comparado con los métodos convencionales (IHA, ultracentrifugación en gradiente de sacarosa etc.) para la evaluación de anticuerpos IgG e IgM. En la tabla No. 2 se presentan algunas características de estas pruebas (17, 20 :1).

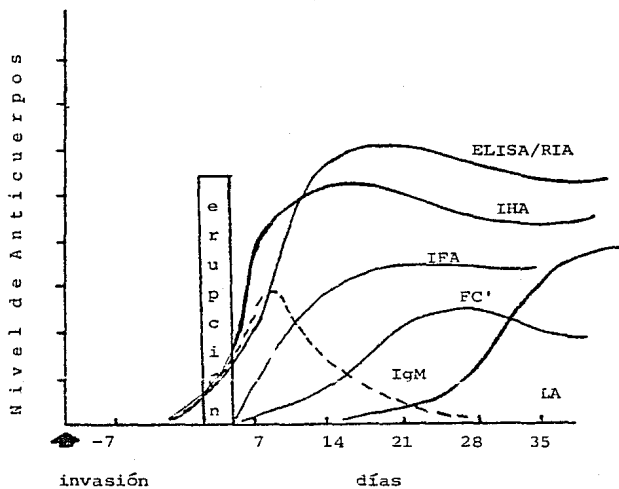


Figura No. 5 RESPUESTA INMUNE A LA RUBEOLA DETECTADO POR DIVERSAS PRUEBAS INMUNOSEROLÓGICAS DE SENSIBILIDADES Y ESPECIFICIDADES DIFERENTES (20).

Tabla No. 2 DETECCIÓN SEROLOGICA DE INFECCION RUBEOLICA POR DIFERENTES PRUEBAS (9, 12, 20, 31, 41 y 43).

Pruebas Diagnósticas*									
	Nt	FC'	IFA	IHA	ELISA	RIA	HRS	PLA	
IgM	no	no	si	si	si	si	no	no	
IgG	no	no	si	si	si	si	si	si	
Sensibilidad	↑	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↓	
Especificidad	↑	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↑	
Cuantitativa	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	-	
Suero Pretratado	no	no	no	si	no	no	no	no	
Estandarización de reactivos	si	si	si	si	no	no	si	no	
Cultivo celular	si	no	no	no	no	no	no	no	
Antígeno [alto]	si	si	si	si	no	no	si	si	
Riesgo potencial	no	no	no	no	no	si	no	no	
Fase sólida	no	no	no	no	si	si	no	no	
Automatización	no	no	no	no	si	si	no	no	

↑ alta + Cuantitativo - no cuantitativo
 ↓ baja +/- Semicuantitativo

- (*) Nt = anticuerpos neutralizantes
 FC' = anticuerpos fijadores de complemento
 IFA = anticuerpos inmunofluorescentes
 ELISA = ensayo inmunoenzimático
 RIA = radioinmunoensayo
 HRS = hemólisis radial simple
 PLA = aglutinación de partículas látex

2.7. Objetivos

La técnica utilizada en este trabajo se basó en un sistema indirecto de ELISA de un equipo de prueba comercial, la cual es una de las pruebas diagnósticas generalmente usadas en laboratorios clínicos de hospitales de tercer nivel. Se eligió la técnica de IHA para la correlación de los resultados con ELISA, por ser la prueba de laboratorio que se utiliza con más frecuencia para cuantificar los anticuerpos contra el virus de rubéola, además de que es la técnica de referencia. Así, en base a lo anterior se plantean los siguientes objetivos:

- 1).- Conocer la relación que se tiene en determinar los anticuerpos antirrubéola por el método de ELISA y el método de IHA, comparando el nivel de anticuerpos que confieren inmunidad.

- 2).- Determinar la confiabilidad de una prueba de IHA comercial comparada con la IHA estandarizada en el laboratorio.

2.8. Hipótesis

La técnica de IHA y ELISA, son técnicas en condiciones distintas, pero nos pueden medir anticuerpos contra el virus de la rubéola, por lo que los resultados expresados en unidades cuantitativas y disponiendo de pares de valores de las dos técnicas para cada grupo de datos es posible calcular una constante conocida como coeficiente de correlación.

Ho. Hipótesis Nula. No existe correlación entre las técnicas de IHA y ELISA en la determinación de anticuerpos antirrubéola.

Hi. Hipótesis alterna. Existe correlación entre las técnicas de IHA y ELISA en la determinación de anticuerpos antirrubéola.

CAPITULO III

MATERIAL Y METODOS

3.1. Material Biológico

a) Suero Humano:

El material de estudio consistió en un total de 150 muestras de sueros pares, con intervalo de 2 a 3 semanas, obtenidas por punción venosa en condiciones estériles, a mujeres estudiantes de la FES-Cuautitlán, cuyas edades fluctuaban entre los 18 a 30 años de edad. Todas las muestras se procesaron en el laboratorio de Microbiología General del H.G.C.M. "La Raza".

Estas muestra de suero fueron divididas de la siguiente manera:

- i) De éstas, 75 de la primera muestra, obtenidas en forma aleatoria y 150 correspondientes a la segunda muestra fueron trabajadas por la técnica de ELISA. Se procesaron únicamente 75 de la primera muestra por los recursos con que se contaba en el laboratorio.
- ii) Para la técnica de IHA, se emplearon solamente 75 muestras pares (1a. y 2a. muestra de suero), utilizando dos métodos de adsorción de beta-lipoproteínas (de acuerdo a las especificaciones dadas por el Centro para el Control de Enfermedades (C.D.C.) de Atlanta Georgia U.S.A., y el de

un Rube-HIT de un equipo comercial de Behring).

Los sueros fueron separados el mismo día que se obtuvo la sangre y conservados en congelación a -20°C hasta el momento de la prueba.

b) Suero Control de Rubéola para la Prueba de IHA:

Suero Positivo Control de Rubéola (No tratado) con título alto humano $\geq 1:256$.

Suero Positivo Control de Rubéola (No tratado) con título bajo humano 1:16-1:32.

Suero Negativo Control de Rubéola (No tratado) de bovino de acuerdo al marbete, estabilidad a una temperatura de $+2$ a $+8^{\circ}\text{C}$. Evitando congelar y descongelar.

Los sueros fueron obtenidos de una fuente comercial de Behring A.G. Marburg W. Germany en forma liofilizada.

Así mismo para poder utilizar sueros humanos como controles, se titularon muestras en repetidas ocasiones por la técnica estandarizada de IHA (37) y en presencia del suero control positivo de la presentación comercial.

c) Suero Control de Anticuerpos IgG para Enzygnost-Rubella

El suero control de rubéola (Humano) de una fuente comercial de Behring A.G. Marburg y W. Germany en forma liofilizada.

Se conserva entre $+2^{\circ}\dots+8^{\circ}\text{C}$. Frasco X 0.5 ml. IgG 1:2560.

d) Antígeno.

Cosechas del virus de la rubéola cepa Therien (VRT), conservados en criotubos con nitrógeno líquido a -196°C , donados por la Dra. B. Gómez G.; del departamento de Ecología Humana. Facultad de Medicina. UNAM.

Se utilizaron diferentes lotes de cosechas virales las que inicialmente se trataron con Tween y éter para la posterior titulación.

Para la titulación del antígeno se utilizó una microtécnica recomendada por el Centro para el Control de Enfermedades (C.D.C.) (37). Utilizando esta técnica el antígeno probado presentó títulos de 1:16 a 1:64 por 0.025 ml., los títulos fueron corroborados para poder calcular la dilución apropiada y obtener una cantidad de aglutinina equivalente a 4 unidades hemaglutinantes (UHA) por unidad de volumen.

Antígeno de rubéola, obtenido de una fuente comercial de Behring A.G. Marburg W. Germany, en forma de hemaglutinina tratado con Tween y éter y liofilizado, rehidratándose en el momento de ser utilizado con agua destilada estéril, se obtuvieron títulos de 1:64 a 1:128 por 0.025 ml.

e) Eritrocitos Humanos Tipo "O"

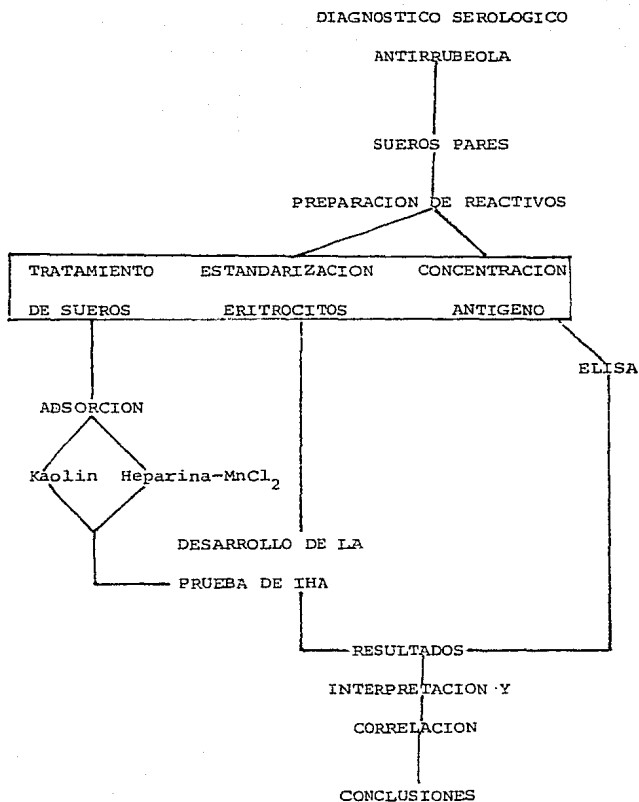
Los eritrocitos humanos fueron obtenidos de diferentes lotes de donadores, utilizando EDTA como anticoagulante.

Se tipificaron para seleccionar aquellos que fueron "O"

Rh(+), y posteriormente se hizo un pool para dar un buen grado de sensibilidad y reproducibilidad en la prueba de hemaglutinación (HA) e inhibición de la Hemaglutinación (IHA).

P A R T E E X P E R I M E N T A L

PLAN DE TRABAJO:



3.2. Metodología

Para determinar el título de anticuerpos antirrubéola de las muestras de suero ya indicadas, se utilizaron las técnicas siguientes:

A) DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTIRRUBEOLA POR ENSAYO INMUNOENZIMATICO (ELISA)

A-1) Preparación de los reactivos

Los reactivos complementarios para Enzygnost-Rubéola, como el amortiguador de dilución-FA, el conjugado enzimático-FA listo para el uso y la solución de sustrato (ver apéndice) se preparan y se mantienen a temperatura ambiente (entre +20°C y +25°C) antes de ser utilizados.

A-2) Elaboración de la curva patrón

Se reconstituye el suero control positivo humano con agua destilada estéril y se efectúan diluciones seriadas con amortiguador de dilución-FA, depositándose en la placa de prueba de acuerdo al esquema de la Figura No. 6 y procediendo de la misma forma que los sueros problema como a continuación se describe.

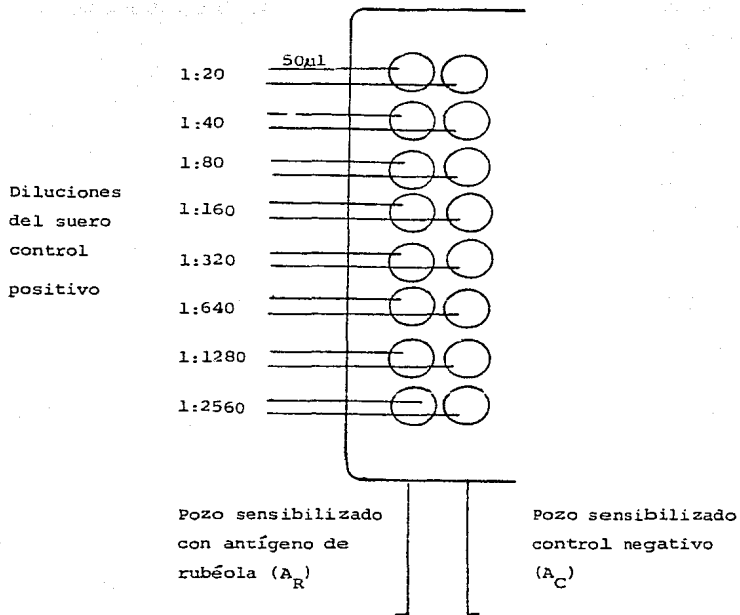
A-3) Procedimiento

El método utilizado es un sistema indirecto de ELISA el cual puede usarse en la detección y cuantificación de anticuerpos antirrubéola. La metodología del sistema se esquematiza en la Figura No. 7

El equipo necesario para realizar esta prueba consta de placas de microtitulación sensibilizadas con antígeno de rubéola, de 6 columnas removibles, las cuales corresponden 2x8 pozos reactivos una hilera recubierta del antígeno y la otra del control de antígeno negativo. Se adiciona el suero a probar diluido con amortiguador de dilución-FA (suero problema diluir 1:204), se incuba en ambiente húmedo y se lava con solución de lavado-FA en el procesador de ELISA-Behring M ó manualmente.

Se agrega un conjugado enzimático diluido (anti-IgG-FA), la microplaca es incubada y lavada en las mismas condiciones anteriores, en seguida se adiciona el sustrato diluido específico para la enzima (γ -nitrofenil fosfato) se incuba en ambiente húmedo y se adiciona una solución concentrada que detenga la reacción (NaOH).

La degradación del sustrato tiene por resultado un cambio de color (amarillo-verdoso) así la cantidad y velocidad del cambio de color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos en el suero ensayado el cual se mide espectrofotométricamente a 405 nm directamente en la placa de microtitulación en el procesador de ELISA-Behring M.



$$A = A_R - A_C$$

Figura No. 6 ESQUEMA DE LAS DILUCIONES DEL SUERO CONTROL POSITIVO PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTIRRUBEOLA (31).

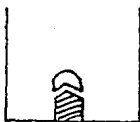
1. Antígeno adsorbido a la placa

Lavado



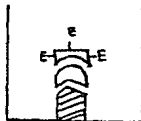
- 2.- Adición del suero
(el Ac's específico se une al Ag)

Lavado



- 3.- Adición de la enzima ligada a la antiglobulina la cual se une al anticuerpo.

Lavado



4. Adición del sustrato

- 5.- Se detiene la reacción

- 6.- Se determinar absorbancia

Cantidad de hidrólisis = cantidad de anticuerpo presente

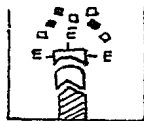


Figura No. 7 METODO INDIRECTO DE ELISA PARA MEDIR ANTICUERPOS (31,49).

B) TITULACION DE ANTICUERPOS DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION (IHA)

Este método comprende principalmente las fases siguientes:

B-1) Tratamiento de los sueros

Los sueros contienen sustancias (beta-lipoproteínas), que causan hemaglutinación inespecífica, por tal motivo se deben tratar antes de realizar la prueba de IHA.

El tratamiento de los sueros se realizó como sigue:

- B-1.1) De acuerdo al método reportado por el Centro para el Control de Enfermedades (C.D.C.) (37) en el cual se utiliza una solución de Heparina-MnCl₂ 1:1 y como diluentes amortiguadores orgánicos HSAG (ver apéndice). El tratamiento se efectúa con incubaciones a 4°C. El suero tratado reditua una dilución 1:8, estable a 4°C por una semana, y a -20°C por períodos más largos. El suero no necesita ser inactivado por calor.
- B-1.2) De acuerdo a un equipo comercial de Behring (Rube-HIT) en el cual se utiliza una suspensión de kaolín (200 g/l) (ver apéndice). El tratamiento se efectúa con incubaciones de 15 a 25°C. El suero tratado reditua una dilución 1:4; estable a 4°C por una semana. El suero necesita ser inactivado por calor.

E-2) Estandarización de los eritrocitos tripsinizados

Los eritrocitos humanos tipo "O" se colectan en tubos de centrífuga graduados, se lava con solución amortiguadora-DGV (ver apéndice) y el paquete se resuspende con el mismo amortiguador a una concentración del 10%.

Para las pruebas de HA e IHA se requiere tripsinizar a los eritrocitos con una solución de tripsina al 1% en PBS, se incuban y se lavan los eritrocitos con amortiguador-DGV hasta retirar completamente la hemoglobina resuspendiendo el paquete en el mismo amortiguador a una concentración del 4%. A partir de esta suspensión se prepara otra al 0.25% antes de utilizarse en las titulaciones (para Ag o Ac) como se describe a continuación (37).

Se traza una curva estándar de hemoglobina con concentraciones de 80, 60, 40, 20 y 0 mg% de CNMHB. Se prepara la solución problema a partir de la suspensión de eritrocitos al 4% tomando una alícuota y aforando con reactivo de CNMHB se mezcla e incuba a temperatura ambiente hasta que se lisen todas las células, se centrifuga para retirar el estroma a una porción de volumen de la solución problema. Leer la Densidad Óptica (Absorbancia) de cada uno de los tubos de la curva estándar y la de la muestra problema a 540 nm. Se calcula el factor f_1 del espectrofotómetro y el factor de D.O para obtener una suspensión de eritrocitos al 0.25% de acuerdo

do a las siguientes relaciones:

$$\text{factor}_1 = \frac{\Sigma \text{conc. de cada dil. de la curva patrón}}{\Sigma \text{D.O. leída}}$$

$$\text{factor D.O.} = \frac{3.128 \text{ mg\% cmg}}{\text{factor}_1}$$

Teniendo estos datos del factor del espectrofotómetro (factor₁), el factor D.O. y la lectura de absorbancia de la suspensión de eritrocitos al 4%, se calcula el volumen de amortiguador-HSAG, necesario para obtener una suspensión del 0.25% de la manera siguiente:

$$\text{Volumen final} = \frac{\left[\begin{array}{c} \text{D.O. de la} \\ \text{prueba} \end{array} \right] \left[\begin{array}{c} \text{Vol. original de la} \\ \text{suspensión de eritro-} \\ \text{citos al 4\%} \end{array} \right]}{\text{Factor D.O. para la suspensión de eritrocitos al 0.25\%}}$$

Esta suspensión debe ser usada el mismo día de su preparación.

B-3) Titulación del antígeno viral por hemaglutinación

B-3.1) Tratamiento de la suspensión viral

La suspensión viral se trató con una mezcla de Tween-éster para destruir la infectividad del virus y aumentar su actividad hemaglutinante en un factor de 5 a 10 veces debido a la fragmentación de la envoltura viral, lo que da como resultado un incremento en el número de subunidades hemaglutinantes de igual efectividad (44).

B-3.2) Titulación de la suspensión viral por hemaglutinación

La titulación se realizó en cajas de microtitulación de 96 cavidades fondo tipo "V" de la casa Behring de acuerdo al procedimiento del C.D.C. (37).

Para determinar la cantidad aproximada de hemaglutinina del antígeno de rubéola se hizo una dilución inicial del antígeno de 1:4 con amortiguador-HSAG frío y posteriormente con microdilutores se prepararon diluciones seriadas del virus (1:4 - 1:1024) con el mismo amortiguador a 4°C (por triplicado) como se muestra en la figura No. 8 con cantidades constantes de una suspensión de eritrocitos al 0.25%, asignando 2 pozos para el control de células (eritrocitos). El procedimiento se esquematiza en la figura No. 9.

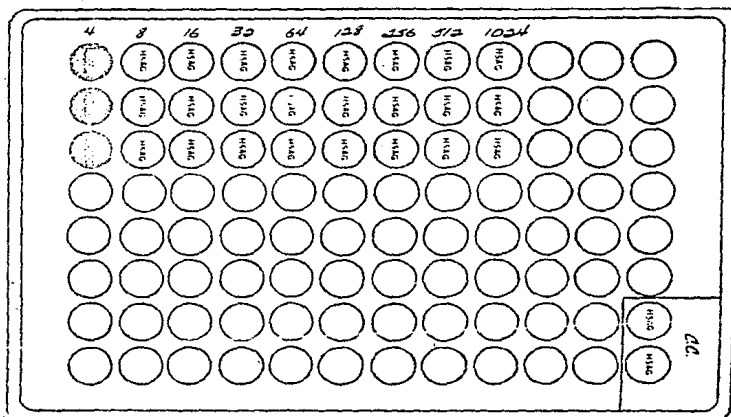


Figura No. 8 ESQUEMA DE DILUCIONES PARA LA TITULACION DE ANTIGENO HEMAGLUTINANTE DE RUBEOLA (37) .

El título se toma como el recíproco de la última dilución que presente aglutinación de eritrocitos. Una vez que el título se determinó se completó la dilución del antígeno para tener 4 unidades hemaglutinantes, la dilución se hizo con amortiguador-HSAG.

B-4) Inhibición de la Hemaglutinación viral

La titulación de los sueros previamente tratados, se realizó en placas de microtitulación de 96 cavidades fondo tipo "V" de la casa de Behring, colocando un suero por cada fila (incluyendo sueros control positivo alto, positivo bajo y negativo en cada titulación).

Con microdilutores se prepararon diluciones seriadas de cada suero de acuerdo al esquema que se presenta en la figura No. 10, asignando un pozo para el control del suero (C.S.) y otros para el control de células (eritrocitos). Se adiciona el antígeno de rubéola conteniendo 4 unidades hemaglutinantes a cada una de las diluciones de los sueros (excepto el control del suero y el control de eritrocitos), mezclar el contenido de las placas en un vibrador mecánico. Se incuba para que se lleve a cabo la reacción Ag-AC.

Posteriormente se adiciona la solución de eritrocitos estandarizada al 0.25% a todos los pozos de cada suero, los controles del suero y los controles de eritrocitos, se tapan

las placas y se incuban hasta que los pozos que contienen el control de eritrocitos presenten un botón compacto.

El punto final para designar la cantidad de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación es la dilución más alta del suero que presente una completa inhibición de la hemaglutinación.

El procedimiento se esquematiza en las figuras No. 11 y 12 dependiendo del sistema ensayado (C.D.C. y Rube-HIT).

Secuencia de adición	No. del pozo.											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1o. fila												
1o. Amortiguador HSAG (ul)		25	25	25	25	25	25	25	25		50	50
2o. Antígeno dil. 1:4 (ul)	50	<u>25</u>	<u>25</u>	<u>25</u>	<u>25</u>	<u>25</u>	<u>25</u>	<u>25</u>	<u>25</u>	<u>25</u>	tirar 25	
3o. Amortiguador HSAG (ul)	25	25	25	25	25	25	25	25	25			
4o. Suspensión de erit. "O" al 0.25% (ul)	50	50	50	50	50	50	50	50	50		50	50
INCUBAR 1 hr. a 4°C												
Recíproco de diluciones	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	CC	CC*	

Figura No. 9 ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO PARA LA TITULACION DE ANTI-GENO HEMAGLUTINANTE (37).

(*) CC = control de eritrocitos

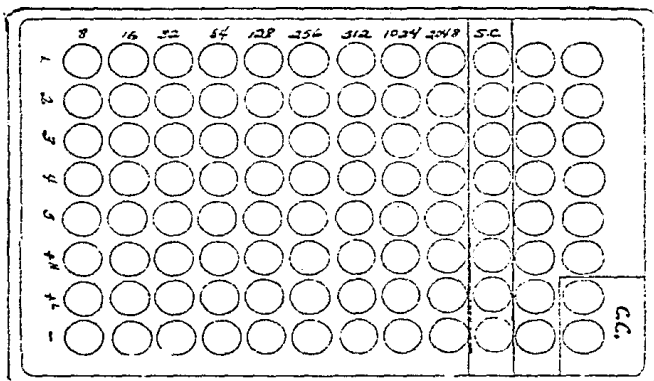


Figura No. 10 ESQUEMA DE DILUCIONES PARA LA TITULACION DE ANTICUER-
POS INHIBIDORES DE LA HEMAGLUTINACION CON EL CONTROL
DEL TRATAMIENTO DEL SUERO Y EL DE ERITROCITOS ESTAN-
DARIZADOS.

Secuencia de adición	No. del pozo												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1o. fila													
1o. Amortiguador HSAG (μ l)	25	25	25	25	25	25	25	25	25				
2o. Suero tratado 1:8 (μ l)	50	25	25	25	25	25	25	25	25	50	--	--	
										tirar			
3o. Solución anti génica 4UHA (μ l)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	--	--	--	
										INCUBAR 1 hr a 4°C			
4o. Amortiguador HSAG (μ l)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	--	--	--	
5o. Suspensión de erit. "O" al 0.25% (μ l)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
										INCUBAR 3 hr a 4°C			
Recíproco de diluciones:	8	16	32	64	128	256	512	1024	SC*	CC	CC*		

Figura No. 11 ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO PARA LA TITULACION DE ANTI-CUERPOS INHIBIDORES DE LA HEMAGLUTINACION (Método C. D.C.) (37).

(*) SC = Control del suero

CC = Control de eritrocitos

Secuencia adición	No. del pozo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1a. fila												
10. Amortiguador CANM (ul)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	50	50
20. Suero tratado 1:4 (ul)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	50	--	--
30. Solución anti- génica 4 UHA (ul)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	--	--	--
40. Suspensión de erit. "O" al 0.25% (ul)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
INCUBAR 3 hr. a 15 ó 25°C												
Recíproco de diluciones :	8	16	32	64	128	256	512	1024		SC*	CC	CC*

Figura No. 12 ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO PARA LA TITULACION DE ANTI-CUERPOS INHIBIDORES DE LA HEMAGLUTINACION (Método Rube-HIT)

(*) SC = Control del suero

CC = Control de eritrocitos

CAPITULO IV
R E S U L T A D O S

4.1. Determinación de Anticuerpos por el Método de ELISA

La determinación cuantitativa de anticuerpos específicos contra el virus de la rubéola por el método de ELISA, se realizó con un sistema indirecto de un equipo de prueba Enzygnost-IgG, efectuándose en primera instancia, la elaboración de una curva patrón con un suero control positivo.

En la Tabla No. 3 aparecen los valores de absorbancia promedio de varias determinaciones realizadas. En ella se aprecia que los valores de absorbancia obtenidos son directamente proporcionales a la cantidad de anticuerpos presentes en las muestras ensayadas; así mismo se observó que la mínima cantidad de anticuerpos que es posible determinar con este sistema para considerar una reacción positiva es tomando un valor umbral de $A \geq 0.2$, indicada por la diferencia de absorbancia del Antígeno (A_R) y el control negativo del Antígeno (A_C):

$$A = A_R - A_C$$

Con base a esto se decidió que un suero diluido 1:204 que diera valores de absorbancia < 0.2 se consideraría un suero negativo con este sistema de prueba.

Con los valores de absorbancia obtenidos, se construyó una cur-

va patrón de valores de absorbancia (A) contra dilución de suero control positivo (Figura No. 13).

Una vez establecidas las condiciones de trabajo se procedió a la determinación cuantitativa de anticuerpos antirrubéola por el método de ELISA a las 150 muestras ya indicadas (segunda muestra solamente) y 75 correspondiente a la primera muestra de suero.

Con los valores de absorbancia obtenidos de la muestra problema el nivel de anticuerpos IgG antirrubéola se expresó a un valor representado por un índice de acuerdo a la siguiente relación:

$$\text{ELISA} \quad \text{INDICE} = \frac{\left[\begin{array}{c} \text{Absorbancia del} \\ \text{problema} \end{array} \right]}{\left[\begin{array}{c} \text{Promedio de absorbancia} \\ \text{control positivo} \end{array} \right]} \times \text{dilución}$$

Los valores de anticuerpos transformados a un índice obtenidos en este estudio se presentan distribuidos en porcentaje según el índice en la Tabla No. 4

Tabla No. 3 DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTIRRUBEOLA DEL SUERO CON
TROL POSITIVO EN UN SISTEMA DE ELISA-INDIRECTO

Dilución del suero control positivo	Absorbancia (A) a 405 nm
1:5	> 2.2
1:20	1.850
1:40	1.450
1:80	0.950
1:160	0.700
1:320	0.400
1:640	0.200
1:1280	0.150
1:2560	0.090

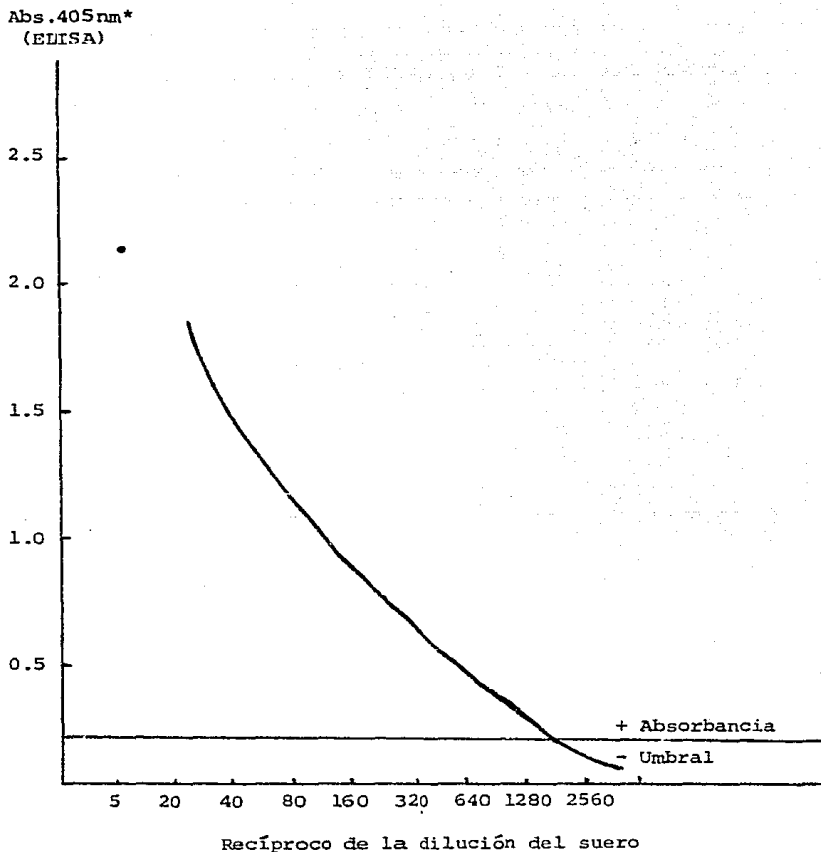


Figura No. 13 CURVA GLOBAL OBTENIDA EN LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS DEL SUERO CONTROL POSITIVO (Enzygnost-Rubéola)

* Las lecturas de A fueron realizadas en un procesador de ELISA, Bering M.

Tabla No. 4 NIVEL DE ANTICUERPOS ANTIRRUBEOLA POR LA TECNICA DE ELISA EN 150 MUESTRAS SANGUINEAS DE MUJERES DE LA I.E.S. CUAUTITLAN

Título (dilución)	Indice*	No. de suero	%
1:5	>402	3	2
1:20	338	6	4
1:40	265	14	9.3
1:80	173	33	22.0
1:160	128	37	24.6
1:320	73	27	18.0
1:640	36	16	10.6
1:1280	27	9	6.0
1:2560	16	5	3.3

(*) Índice = absorbancia del problema/ promedio de absorbancias del control positivo X dilución

Con estos resultados, analizando la proporción y frecuencia de protección inmune se hizo un desglose de los niveles de anticuerpos, determinando una media de centralización de 128 de un histograma representado en la Figura No. 14, donde podemos apreciar por medio de barras el resultado anterior.

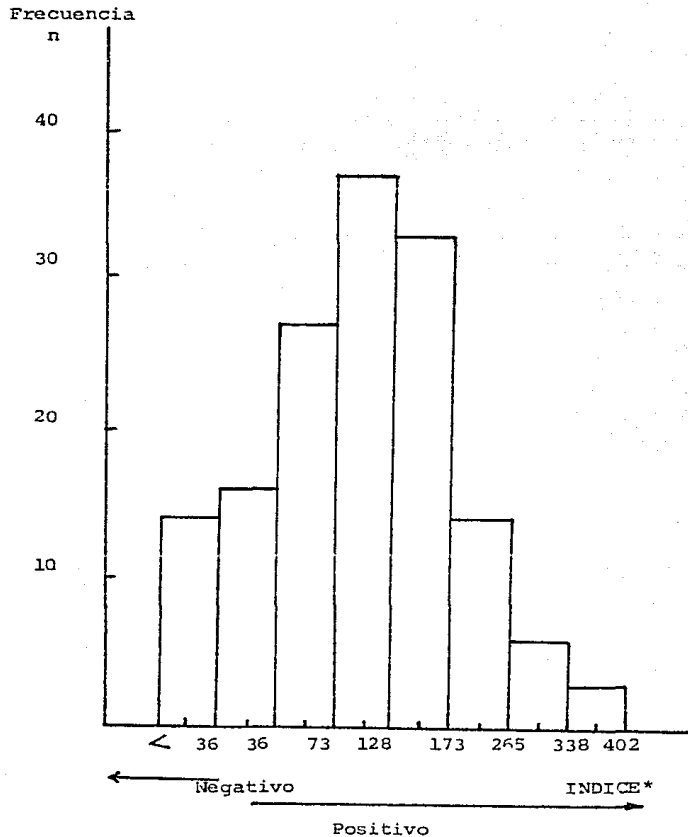


FIGURA No. 14 FRECUENCIA DE INDICE CORRESPONDIENTE AL TITULO OBTENIDO PARA ANTICUERPOS IgG CONTRA RUBEOLA POR LA TECNICA DE ELISA EN 150 MUESTRAS SANGUINEAS DE MUJERES DE LA F.E.S. CUAUTITLAN

(*) Índice = $\frac{\text{Absorbancia del problema}}{\text{Promedios de abs. control positivo}} \times \text{dilución}$

4.2. Determinación de Anticuerpos por el Método de IHA y ELISA en Sueros Pares.

Una vez estandarizada la técnica de IHA reportada por el Centro para el Control de Enfermedades (C.D.C.) se prosiguió a titular 75 sueros pares (primera y segunda muestra de suero) de los 150 sueros titulados por la técnica de ELISA.

Se hicieron dos titulaciones por el método de IHA empleando dos métodos de adsorción de beta-lipoproteínas. En la prueba reportada por el C.D.C., los inhibidores inespecíficos se retiran tratando el suero con Heparina-MnCl₂. La prueba comercial (Rubo-HIT), retira los inhibidores inespecíficos con una suspensión de kaolín.

Los resultados de estas titulaciones cuando se emplean estos procedimientos y comparándolos con los obtenidos por ELISA se presentan en la Tabla No. 5

Tabla No. 5 TITULO DE ANTICUERPOS ANTIRRUBEOLA OBTENIDOS CON LAS
TECNICAS DE IHA Y ELISA EN 75 MUESTRAS SANGUINEAS DE
MUJERES DE LA F.E.S. CUAUTITLAN

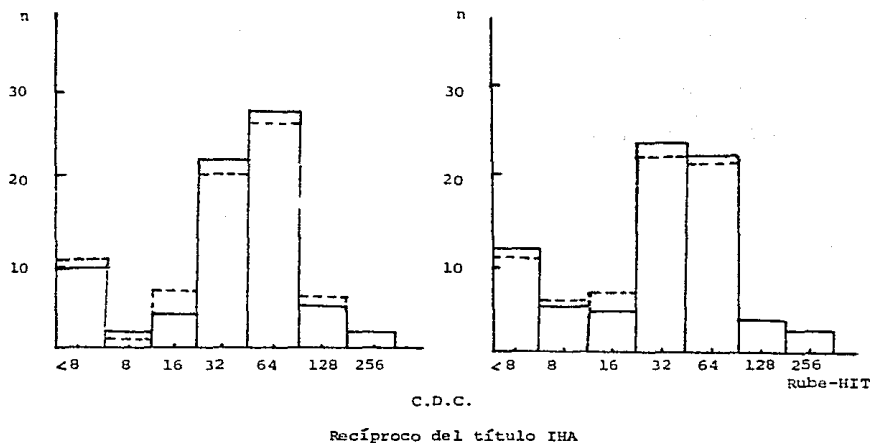
No. de seroconversión* *				
la./2a. muestra				
Recíproco del título de IHA	IHA (C.D.C.)	IHA (Rube-HIT)	ELISA (Enzygnost)	INDICE* ELISA
<8	10/11	12/11	6/7	<36
8	2/1	5/6	12/11	36
16	4/7	5/7	14/13	73
32	23/21	25/23	16/15	128
64	29/27	22/23	11/12	173
128	5/6	3/3	9/10	265
256	2/2	2/2	4/5	338
512	-	-	3/2	402

(* *) Llamamos seroconversión al paso de la ausencia de anti-
cuerpos (ó en cantidad muy baja) en la primera extracción
a un título 4 veces más en la segunda.

(*) Índice = absorbancia del problema/ promedio de abs. control
positivo X dilución

La distribución de frecuencias del título de anticuerpos cuan-
do se emplean estos procedimientos se representan en la Figura

FRECUENCIA DE TITULOS



Recíproco del título IHA

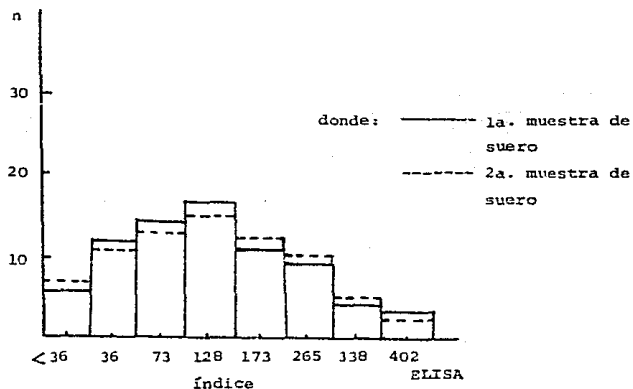


Figura No. 15 FRECUENCIA DEL NIVEL DE ANTICUERPOS ANTIRRUBEOLA EN 75 SUEROS PARES MEDIDOS POR LA TÉCNICA DE IHA (estandarizada C.D.C. y Rube-HIT comercial) Y ELISA.

(*) Índice = absorbancia del problema/promedio de abs. control positivo X dilución

4.3. Correlación de las Técnicas de ELISA e IHA

Después de la titulación de las 75 muestras de suero pares por la técnica de ELISA e IHA se realizó un análisis de los datos en forma inferencial para calcular una constante conocida como coeficiente de correlación (r) que expresa el grado de asociación que tienen estas técnicas.

Con las lecturas de absorbancia y su correspondiente índice obtenido con la técnica de ELISA, se visualizaron las diferencias entre los sueros positivos y negativos, por lo que se estableció una relación entre éstos y los títulos de IHA (Tabla No. 6). Para calcular (r), se aplicó logaritmo de base 10 al recíproco de los títulos de IHA con los datos de absorbancia correspondientes con el método de ELISA, ó bien el recíproco del título de IHA, con los títulos obtenidos con la técnica de ELISA transformados a un índice.

Posteriormente se efectuó un análisis paramétrico de correlación y regresión como medida de la asociación entre las dos técnicas descritas cuantitativamente relacionadas con la información obtenida.

La relación (r) se obtuvo de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$r = \frac{XY - 1/n (\Sigma X) (\Sigma Y)}{\sqrt{[X^2 - 1/n (\Sigma X)^2] [Y^2 - 1/n (\Sigma Y)^2]}}$$

donde:

X = valores de una de las variables de la correlación (IHA).

Y = valores de la variable que se va a relacionar (ELISA).

n = número de muestras.

Con estos datos se obtuvo un coeficiente de correlación bajo las condiciones generales de las pruebas paramétricas para las técnicas de:

- 1) ELISA - IHA (Rube-HIT)
- 2) ELISA - IHA (C.D.C.)
- 3) IHA (C.D.C.) - IHA (Rube-HIT)

En la tabla No. 7 se presentan los resultados obtenidos del coeficiente de correlación calculado estadísticamente y la correlación que existe en la determinación de inmunidad en la población estudiada, comparándose así mismo con la relativa sensibilidad que presentan estas técnicas en la determinación de anticuerpos antirrubéola.

En las figuras No. 16 y 17, se muestra la dispersión y el análisis de regresión lineal ajustada entre ambas técnicas, en las que observamos la dispersión de los títulos obtenidos al utilizar el suero diluido 1:204 en la técnica de ELISA con la técnica de IHA de acuerdo a las especificaciones dadas por el C.D.C. y con la prueba de IHA de un equipo comercial.

Como podemos observar la mayor concordancia que existe ocurre cuando los títulos de anticuerpos IHA son mayores de 1:8.

Un análisis similar se efectuó a los resultados obtenidos de las dos titulaciones de IHA para el tratamiento de los sueros utilizada para la reacción de IHA (Figura No. 18).

Tabla No. 6 DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTIRUBEOLA POR ELISA e IHA.

MUESTRA	ELISA (A)	ELISA (Índice)	IHA (C.D.C.)	IHA (Rube-HIT)
			Recíproco del título	
1	0.552	101.08	64	32
2	0.299	52.92	8	8
3	1.179	215.70	64	64
4	1.608	321.08	128	64
5	1.169	214.86	64	64
6	1.098	294.45	64	64
7	0.120	21.97	--	--
8	1.766	323.49	64	64
9	1.456	266.62	64	32
10	1.529	299.90	64	64
11	1.205	229.74	64	32
12	0.317	38.64	16	8
13	2.2	402.86	256	256
14	2.016	369.16	128	128
15	0.634	116.09	64	32
16	0.408	74.71	32	16
17	0.733	134.22	64	64
18	2.2	402.86	256	256
19	0.340	62.26	32	32
20	0.379	14.46	--	--
21	0.010	1.83	--	--
22	1.462	267.72	128	64
23	0.622	4.02	--	--
24	0.268	49.07	16	8
25	0.275	50.35	32	8
26	0.274	50.17	16	8
27	0.698	127.81	64	32
28	0.622	4.02	--	--
29	0.773	141.55	64	32
30	0.469	85.88	32	32
31	0.215	167.55	64	64
32	0.945	173.04	128	64
33	0.850	155.65	64	64
34	0.255	46.69	16	16
35	0.416	76.17	32	32
36	1.150	210.58	64	64
37	0.945	151.07	32	16
38	0.076	13.91	--	--
39	1.048	191.90	64	64
40	0.010	1.83	--	--
41	0.782	143.19	64	32
42	0.808	147.37	64	32
43	0.326	59.69	32	16
44	0.733	132.39	64	32
45	0.233	170.85	64	64
46	0.500	107.85	32	32
47	1.013	185.50	32	64
48	0.487	39.17	32	32
49	0.544	99.61	32	32
50	1.662	304.34	128	128
51	0.836	152.08	64	64
52	0.827	151.44	64	64
53	0.212	36.83	--	--
54	1.233	225.78	32	32
55	0.263	48.16	16	16
56	0.167	30.58	--	--
57	0.277	50.72	--	--
58	0.337	61.71	16	16
59	0.489	89.54	32	32
60	1.346	246.47	32	32
61	1.772	324.48	128	128
62	0.384	70.21	32	32
63	0.291	53.28	16	8
64	1.500	283.80	32	64
65	0.762	139.53	64	64
66	0.616	112.80	32	32
67	0.261	47.70	--	--
68	0.360	62.62	32	16
69	0.627	114.91	64	64
70	1.350	228.90	32	32
71	0.469	85.88	32	32
72	1.432	262.59	64	64
73	1.346	246.47	64	64
74	0.792	145.03	64	64
75	0.312	62.07	32	32

Tabla No. 7 CARACTERISTICAS EN LA DETECCION DE ANTICUERPOS ANTIRRUBEOLA (IgG e IHA) POR LAS TECNICAS DE ELISA e IHA RESPECTIVAMENTE (43).

Características	ELISA (%)	IHA-C.D.C. (%)	IHA-Rube-HIT (%)
Sensibilidad ^a	91.0	88.0	81.0
PV ⁺ inmune ^b	90.6	84.0	78.0
PV ⁻ no inmune ^c	9.3	16.0	21.3
Correlación de inmunidad con IHA estandarizada ^d	93.0	-----	89.4
Coefficiente de correlación (r) ^e	75.0	-----	94.0
Coefficiente de correlación (r) ^f	72.0	94.0	-----

^aSensibilidad = [Positivos verdaderos / (positivos verdaderos + falsos negativos)] X 100

^bValor predictivo positivo inmune

$PV^+ = \left[\frac{\text{Positivos verdaderos}}{\text{Positivos verdaderos} + \text{falsos positivos}} \right] \times 100$

^cValor predictivo negativo no-inmune

$PV^- = \left[\frac{\text{Negativos verdaderos}}{\text{Negativos verdaderos} + \text{falsos negativos}} \right] \times 100$

^dCorrelación = $\left[\frac{(\text{Positivos verdaderos} + \text{Negativos verdaderos}) (\text{Positivos verdaderos} + \text{Negativos verdaderos} + \text{falsos positivos} + \text{falsos negativos})}{(\text{Positivos verdaderos} + \text{Negativos verdaderos}) (\text{Positivos verdaderos} + \text{Negativos verdaderos} + \text{falsos positivos} + \text{falsos negativos})} \right] \times 100$

^{e, f}

Coefficiente de Correlación (r) = $\frac{XY - 1/n (\Sigma X) (\Sigma Y)}{\sqrt{[X^2 - 1/n (\Sigma X)^2] [Y^2 - 1/n (\Sigma Y)^2]}}$

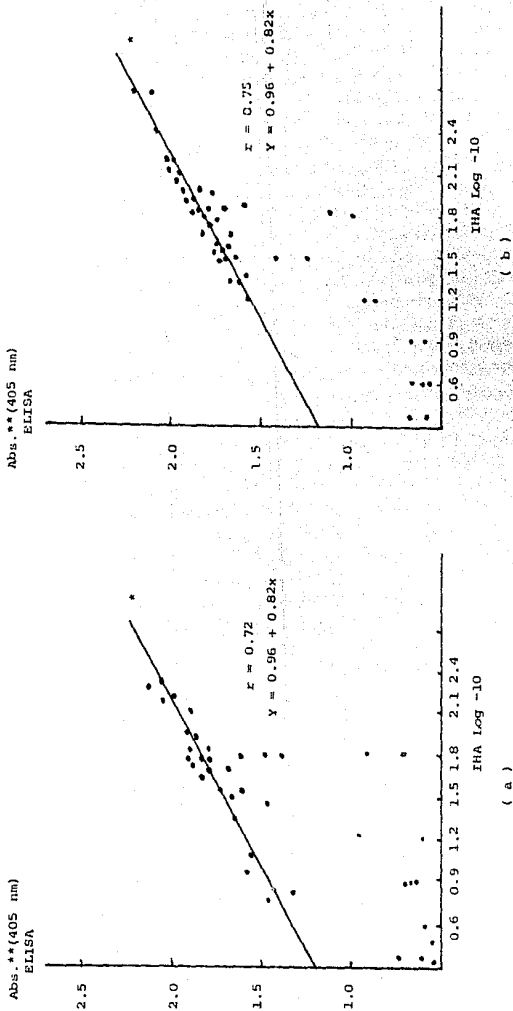


Figura No. 16 REPRESENTACION GRAFICA DE LA RELACION ENTRE LA TECNICA DE ELISA e IHA EN LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTIRRUBOLEA.

a) ELISA - RUBELIT

b) ELISA - IHA-C.D.C.

(*) Regresión lineal ajustada

** Las lecturas de A fueron realizadas en un procesador de ELISA, Behring M.

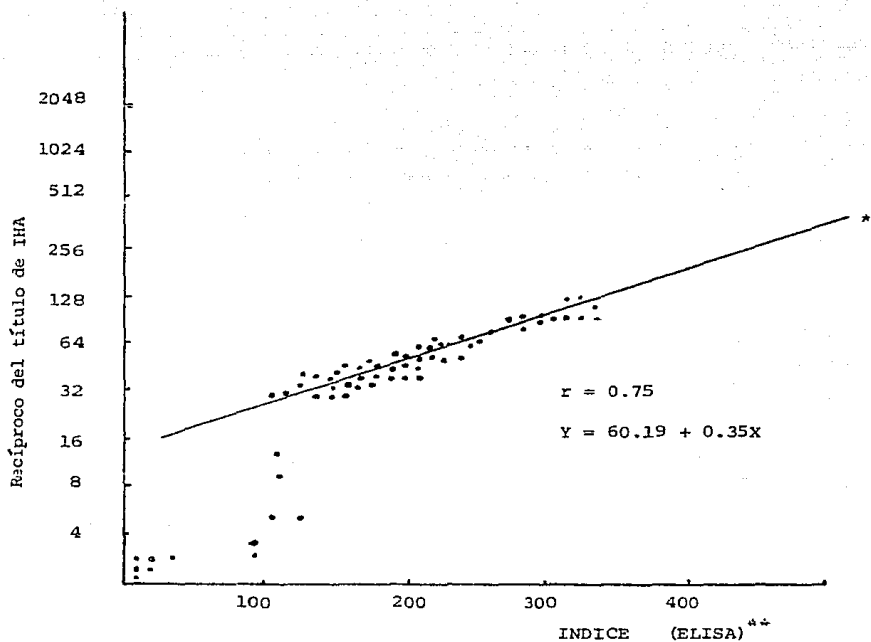


Figura No. 17 REPRESENTACION GRAFICA DE LA RELACION ENTRE LA TECNICA DE ELISA TRANSFORMADO A UN INDICE CON LA TECNICA DE IHA REPORTADA POR EL C.D.C. EN 75 MUESTRAS SANGUINEAS DE MUJERES DE LA F.E.S. CUAUTITLAN

(*) regresión lineal ajustada

(**) Índice = absorbancia del problema/ promedio de absorbancia control positivo x dilución.

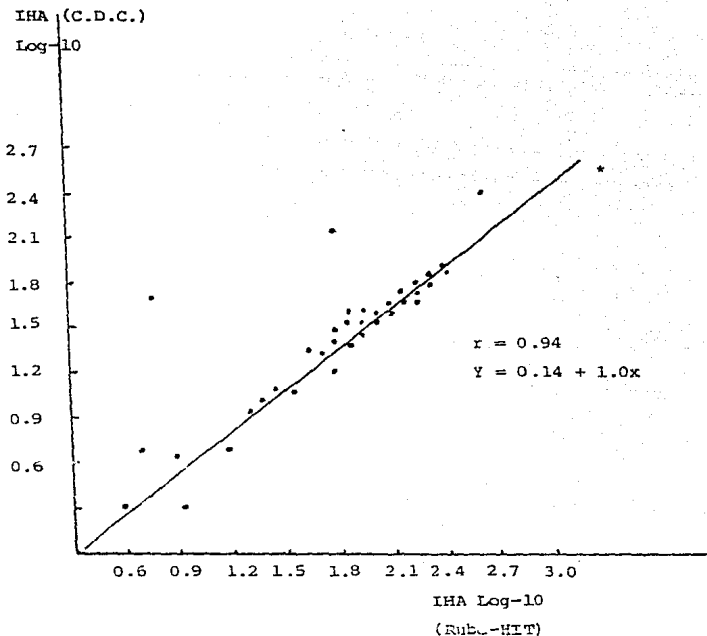


Figura No. 18 REPRESENTACION GRAFICA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR LA TECNICA DE IHA (con dos tratamiento diferentes de adsorción de beta-lipoproteínas) EN RELACION A LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTIRRUBEOLA EN 75 MUESTRAS SANGUINEAS DE MUJERES DE LA F.E.S. CUAUTITLAN

(*) regresión lineal ajustada

CAPITULO V
D I S C U S I O N

El criterio aceptado para la diferenciación de mujeres no inmunes de aquellas inmunes a la infección por el virus de la rubéola, es la detección de un valor de anticuerpos específicos protectores (16,35). En la actualidad se dispone de varias pruebas inmunoserológicas dentro de las cuales se incluyen equipos comerciales para la determinación de anticuerpos contra el virus de la rubéola (14, 20).

El método utilizado en el presente trabajo fué con un sistema indirecto de ELISA (Enzygnost-Rubéola) de una casa comercial (31).

Con el fin de establecer la validez del ensayo cuantitativo se efectuaron varias determinaciones con sueros control positivo, con lo que se confeccionó una curva patrón (antes de que se procediera la determinación de anticuerpos de las muestras problema), tomando un valor umbral para considerar una reacción como positiva, figura No. 13.

El manejo de datos y el reporte de resultados al trabajar con la técnica de ELISA es problemático; varios autores utilizan criterios diferentes para diferenciar entre títulos positivos y negativos (14, 16, 31).

En este trabajo las concentraciones de anticuerpos antirrubéola por el método de ELISA, se determinaron en base a la obtención

de un índice expresando el nivel de anticuerpos de una muestra referidos a un estándar patrón positivo (en base a estudios en los cuales mencionan que el índice puede hacerse específico respecto de - cualquier factor para el cual se conozcan los datos) (9, 16, 43). Considerando que índices >36 confieren inmunidad por este sistema de prueba.

Se utilizó el método de IHA como referencia para conocer el grado de asociación y la correspondencia de anticuerpos que confieren inmunidad por un ensayo de mayor sensibilidad como es el método de ELISA debido a que la técnica de IHA ha sido utilizada con más frecuencia y se ha establecido que la presencia de anticuerpos contra el virus de la rubéola con títulos de 1:32 ó mayores correlacionan en forma precisa con la protección clínica que tiene la mujer en etapa fértil (24, 30, 35, 42).

Se evaluaron aleatoriamente solo 75 sueros pares para valorar el desarrollo o persistencia de seroinmunidad por los recursos con que se contaba en el laboratorio.

Los resultados indican (Tabla No. 5) que el estudio de las muestras de sueros pares no se observó una seroconversión manifiesta (analizando en forma individual y en total el título de los sueros) por estos métodos (Figura No. 15). Esto se debe a que en el momento del muestreo no se tenía una enfermedad en curso en la población estudiada (para ser significativa, este aumento del título

debe ser aproximadamente 4 veces mayor, las que poseen anticuerpos puede ser el signo serológico de una rubéola antigua. Debido a esto se consideró como positivo ó inmune un título mínimo de anticuerpos a partir de la dilución 1:16-1:32 por IHA, lo que equivale a un índice de 36-73 por ELISA. Se consideraron como inmunes debido a que los títulos se mantuvieron constantes (+ una dilución) es decir los resultados fueron reproducibles en el título de anticuerpos entre las dos muestras de suero.

Debido a la reproducibilidad en el título de anticuerpos por ambas técnicas, se decidió analizar los datos resultantes de la segunda muestra de suero por medio de una forma inferencial de correlación.

En las Figuras No. 16 y 17 se muestra que los sueros con baja concentración de anticuerpos presentan mayor dispersión, mientras que los grupos de suero con títulos de 1:32 y 1:64 por IHA e índices de 73 y 128 por ELISA se observa una buena correlación, así mismo la menor dispersión de los títulos se observó en estos grupos de suero, titulados por ELISA-IHA (C.D.C.) y ELISA -IHA (Rube-HIT).

En éstas observamos una correlación de 0.75 con una concordancia del 93% (63 de 68 sueros) y 0.72 con una concordancia de 86.76% (59 de 68 sueros) en la detección de anticuerpos antirrubéola respectivamente (Tabla No. 7). Estos resultados indican que hay una

muestras como inmunes (PV^+) ó no inmunes (PV^-) con una concordancia del 93% (Tabla No. 7), el cual representa un porcentaje alto si se toma como base estudios semejantes evaluados con varias pruebas de ELISA en donde la correlación de las técnicas fué del 94.7 - 97.0% en la determinación de inmunidad basado en comparación con resultados de IHA (12, 43).

La sensibilidad de las pruebas se muestra en la Tabla No. 7 en la que observamos para ELISA el 91.0%, para IHA (C.D.C.) el 88.0% y el 81.0% para IHA (Rube-HIT). El valor predictivo inmune (PV^+) es del 90.6%, de 84.0% y 78.0% respectivamente. De estos resultados se infiere un valor predictivo no inmune (PV^-) del 9.3 al 21.3% dependiendo de la sensibilidad del método utilizado en la población estudiada.

La prueba de ELISA tiene ventajas sobre IHA, en que los inhibidores no específicos de aglutinación, por los que quizás resulten falsos positivos, no se necesitan remover antes de la prueba, los resultados pueden hacerse con lecturas objetivas y la cuantificación de anticuerpos puede estimarse con una simple dilución del suero. Debido a su fácil desarrollo nos permitió un gran número de valoraciones (150 muestras ya indicadas), infiriendo que los resultados obtenidos de esta valoración (Tabla No. 4) tienen un comportamiento similar en cuanto a sensibilidad se refiere en la cuantificación de anticuerpos antirrubéola. El porcentaje de susceptibles en esta población (PV^-) por este sistema es de 9.3% aproximadamente infirién-

correlación positiva de grado moderadamente alto entre ambas técnicas con un nivel de significancia de $p < 0.02$ (considerando que son técnicas en condiciones distintas). El valor "r" expresa el grado de tal asociación, por lo tanto es una expresión cuantitativa de la similitud observada la cual refleja la tendencia del nivel de anticuerpos de ser lineales, es decir de que ambas técnicas cambien en el mismo sentido que la correlación. Los resultados son consistentes con la observación que los anticuerpos IgG medidos por ELISA aparecen en paralelo con los anticuerpos detectados por IHA.

En la Figura No. 18 se muestra la dispersión de los títulos de los 75 sueros titulados por ambas técnicas de IHA (C.D.C. y Rube-HIT), con una correlación de 0.94 entre estos métodos de adsorción de beta-lipoproteínas, con una concordancia del 99.4% (52 de 63 sueros). Las diferencias con una y otra técnica se observa cuando se realiza el análisis individual de los 75 sueros pares, siendo de mayor precisión el método reportado por el C.D.C. por controlar cada parámetro de la prueba para la reacción de IHA con menor pérdida de inmunoglobulinas antirrubéola que el método del Rube-HIT. Sin embargo la estandarización de la técnica consume mayor tiempo.

La técnica de ELISA utilizada en el presente estudio es sencilla, rápida, específica y más sensible que IHA. El designar un valor de cohorte y el utilizar controles, disminuyó la posibilidad de tener falsos positivos, falsos negativos por lo que se tuvieron resultados equivalentes a IHA (Tabla No. 6) en la clasificación de

dose del comportamiento similar en la determinación de frecuencias del nivel de anticuerpos representado en la Figura No. 14 en comparación con la titulación de las 75 muestras pares (Figura No. 15).

Es por esto la importancia del comparar los respectivos avances, limitaciones y peligros con los métodos convencionales para una mejor interpretación de los resultados.

Por otro lado, muchos centros de investigación nacional trabajan en la obtención de los reactivos utilizados en la técnica de ELISA, por lo tanto en el futuro la técnica será más barata y por consiguiente más accesible a los laboratorios de diagnóstico clínico.

Esto es de radical importancia debido a que la incidencia de la rubéola en la República Mexicana se ha incrementado en los últimos años de acuerdo a la información estadística que se cuenta sobre enfermedades transmisibles. La población susceptible varía del 10 al 20%, por lo que se enfatiza la importancia de la detección de mujeres susceptibles antes del embarazo por medio de la evaluación serológica de la inmunidad contra la rubéola.

Esta es una buena tendencia de reemplazar la bien conocida prueba de IHA y familiarizar la correspondencia de protección clínica con métodos inmunológicos más recientes y de menor demanda técnica, para evaluar la inmunidad contra la rubéola en la mujer en

etapa fértil como medida de control y prevención al daño fetal relacionado con la infección. Aún cuando, la población en riesgo es baja, la ejecución y calidad de pruebas diagnósticas se debe considerar, ya que toda enfermedad constituye un problema médico, epidemiológico y social.

C O N C L U S I O N E S

- 1.- El método de ELISA de un equipo de prueba comercial (Enzygnost-Rubéola) tiene una correlación de 0.75 respecto a la técnica de IHA estandarizada en el laboratorio, lo cual nos indica que los anticuerpos IgG detectados por la técnica de ELISA tienden a correr paralelo con los anticuerpos IHA en la evaluación de inmunidad en un 93%.
- 2.- La mayor concordancia con los anticuerpos por IHA fué con títulos de 1:32 a 1:64 lo que equivale a un índice de 73 a 128 de anticuerpos IgG por ELISA es decir una absorbancia promedio de 0.700 a 405 nm con este sistema de ensayo.
- 3.- La interpretación de la prueba de IHA puede ser subjetiva si no se estandarizan adecuadamente los parámetros de la técnica. Cada variable del sistema tiene un marcado efecto sobre la sensibilidad de la prueba.
- 4.- El nivel de anticuerpos que confieren inmunidad por el método de ELISA fué de un 90.6% el cual equivale a 84.0% por la técnica de IHA estandarizada en el laboratorio.
- 5.- La utilidad de la prueba de ELISA resalta debido a su mayor sensibilidad (91%) y especificidad sobre la técnica de IHA y debido a su fácil desarrollo, nos permite efectuar un gran número

de valoraciones en forma ventajosa en la detección de anticuerpos en fluidos biológicos.

- 6.- Sería muy acertado, realizar como parte de examen médico de rutina, una titulación cuantitativa de anticuerpos antirrubéola a toda mujer próxima a embarazarse, o a toda mujer que solicite trabajo en un hospital ó guardería con métodos inmunológicos más recientes y de menor demanda técnica, para ejercer una vigilancia en aquellas mujeres que estando en etapa fértil sean seronegativas.

A P E N D I C E

a) SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS SALINO (PBS)

Reactivo:	gr.
Cloruro de sodio	8.0
Fosfato de sodio dibásico	1.15
Fosfato de potasio	0.2
Cloruro de potasio	0.2
Agua destilada cbp. 1000 ml	

b) SOLUCION AMORTIGUADORA DEXTROSA-GELATINA-VERONAL

(DGV) pH = 7.3

Reactivo:	gr.
Acido barbitúrico	0.58
Gelatina	0.60
Barbital sódico	0.38
Cloruro de calcio hidratado	0.02
Sulfato de magnesio hidratado	0.12
Cloruro de sodio	8.50
Dextrosa	10.00

(*) Agua dd. cbp. 1000 ml

Disolver en 250 ml de agua hirviente el barbital y la gelatina, hasta su completa disolución. En agua fría disolver los demás componentes y cuando ambas soluciones estén a temperatura ambiente se mezclan. Esterilizar por filtración a través de una membrana millipore con poro de 0.22 μ de diámetro.

(*) dd. agua destilada desionizada

c) SOLUCION AMORTIGUADORA HEPES-SALINO-ALBUMINA-GELATINA

(HSAG) pH = 6.2

1.- Solución stock 5X de HEPES pH= 6.5

Reactivo:	gr.
HEPES (N-2-hidroxi-etilpiperazina- N-2-etanesulfónico)	29.80
Cloruro de sodio	40.95
Cloruro de calcio dihidratado	0.74
Agua dd.cbp.	1000 ml.

2.- Solución stock 2X de Albúmina Sérica Bovina.

Reactivo:	gr.
Albúmina Bovina	20.0
Agua dd.cbp.	1000 ml.

3.- Solución stock 10X de Gelatina

Reactivo:	gr.
Gelatina	0.25
Agua dd.cb.p.	1000ml

4.- Preparación del amortiguador-HSAG

Reactivo:	ml.
Sol. stock 5X HEPES	200.0
Sol. stock 2X ASB	500.0
Sol. stock 10X GELATINA	100.0
Agua dd.cbp. estéril	1000 ml

La solución (1) y (2) se esterilizan por filtración con membrana millipore de 0.22 μ de diámetro, (3) se esteriliza por autoclave a 120°C por 15 min. Estabilidad por 2 meses a 4°C.

d) SOLUCION DE TRIPSINA AL 1%

Reactivo:	gr.
Tripsina cristalina	0.1
Agua dd.cbp.	10 ml.

e) SOLUCION DE HEPARINA-MnCl₂

1.- Solución stock de Heparina sódica

Reactivo:	ml
-----------	----

Heparina sódica USP (5000 Ul/ml)	
------------------------------------	--

2.- Solución de cloruro de manganeso 1M

Reactivo:	gr.
-----------	-----

Cloruro de manganeso (hidratado)	39.60
----------------------------------	-------

Agua destilada cbp.	200 ml
---------------------	--------

Esterilizar por filtración con membrana Millipore de 0.22 u.

3.- Preparación de la Mezcla de Heparina-MnCl₂

Mezclar partes iguales (1:1) de la solución (1) y (2). Estable por 2 semanas a 4°C en la obscuridad.

f) SOLUCION AMORTIGUADORA CANM

Reactivo:	gr.
-----------	-----

Cloruro de sodio	0.9
------------------	-----

Cloruro de calcio (anhidro)	0.1
-----------------------------	-----

Sulfato de magnesio (hidratado)	0.1
---------------------------------	-----

Azida de sodio	0.1
----------------	-----

	ml.
--	-----

Albúmina bovina al 7.5%	1.0
-------------------------	-----

Agua destilada cbp.	100 ml
---------------------	--------

Disolver todas las sustancias en 50 ml de agua destilada, agregar solución de albúmina bovina al 7.5% y aforar a 100 ml. Estable a 4°C.

g) SUSPENSION DE KAOLIN

Reactivo:	gr.
-----------	-----

Kaolín libre de ácido	250.0
-----------------------	-------

	ml
--	----

Amortiguador alcalino s/albúmina	1000.0
----------------------------------	--------

Se mezcla el kaolín y el amortiguador, se envasan en frascos de 100 ml conservándolo a 4°C. Antes de usarse se agita muy bien.

h) PATRON Y REACTIVO DE CIANOMETAHEMOGLOBINA

a) Reactivo de cianometahemoglobina

Obtener un vial certificado del reactivo de cianometahemoglobina.

b) Patrón de cianometahemoglobina

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

i) REACTIVOS COMPLEMENTARIOS PARA ENZYGNOST-RUBEOLA

1.- AMORTIGUADOR DE DILUCION FA.

pH = 7.0 - 7.2

Reactivo:	gr.
Cloruro de sodio	8.0
Fosfato de sodio dibásico	1.15
Fosfato de potasio	0.2
Cloruro de potasio	0.2
Azida de sodio	0.2
	ml.
Tween-20	40.0
Suero Bovino	10.0
	Agua destilada cbp. 1000 ml.

2.- SOLUCION DE LAVADO FA

Reactivo:	ml.
Tween-20	200.0
Amortiguador de fosfatos concentrado	20 veces
	Agua destilada cbp. 2000 ml.

3.- CONJUGADO ENZIMATICO-FA - GLOBULINA

El conjugado anti-IgG/FA, elaborado mediante acoplamiento de la

fosfatasa alcalina. Su presentación es en frascos y viene en forma liofilizada se reconstituye con amortiguador de dilución-FA, según indicaciones del marbete.

El conjugado-FA para Enzygnost se mantiene en alícuotas a -20°C ó a una temperatura inferior, puede conservarse sin alteración durante 3 meses. Hay que evitar la congelación y descongelación repetidas. Los conjugados ya diluidos, almacenarlos entre $+2$ y $+8^{\circ}\text{C}$ son utilizados durante 3 días, y almacenado entre $+20$ y $+25^{\circ}\text{C}$, durante 2 días.

4.- AMORTIGUADOR DE SUSTRATO-FA

pH = 9.8

Reactivo:	gr.
Cloruro de magnesio (hidratado) 0.5 M	0.102
	ml.
Dietanolamina	100.0
Agua destilada cbp. 1000 ml.	

5.- TABLETAS-SUBSTRATO-FA

Reactivo:

Tabletas de p-nitrofenilfosfato (pNPP)

Disolver 2 tabletas de sustrato-FA en 10 ml de amortiguador de sustrato-FA. Esta solución de sustrato es suficiente para una placa de prueba.

6.- SOLUCION PARADORA-FA.

Reactivo:

Hidróxido de sodio (2 N l.

Todos los reactivos complementarios para Enzygnost pueden ser almacenados a 4°C ó 6°C., en envase cerrado son estables los reactivos.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Archegas F., M.E.; Do Carmo L., M.H. y De Morales A.C.: "Estudios epidemiológicos sobre rubéola". Rev. Lat-amer. Microbiol. 1974; 16: 143-145.
- 2.- Bancroft H. 1974. Introducción a la Biostatística. 8a. Edición. Edit. Universitaria de Buenos Aires. pp. 103-115.
- 3.- Banatvala, J.E.; Best, J.M.; O'Shea, S.; and Dudgeon, J.A.: "Persistence of rubella antibodies after vaccination: Detection after experimental challenge". Rev. Infect. Dis. 1985; 7 (Suppl 1): S86-90.
- 4.- Bart, S.W.; Stetler, H.C.; Preblud, S.R.; Williams, N.M.; Orenstein, W.A. and Herrmann, K.L.: "Fetal risk associated with rubella vaccine: An Update". Rev. Infect. Dis. 1985; 7 (Suppl 1): S95-102.
- 5.- Boletín de Epidemiología 1986; Vol. 1 nos. 1-8 enero-agosto de 1985.
- 6.- Boué, A. and Boué, J.G. : "Effects of rubella virus infection on the division of human cell". Amer. J. Dis. Child. 1969; 118: 45-48
- 7.- Bowden, D.S. and Westaway, E.G. : "Rubella virus: Structural and non-structural proteins". J. gen. virol. 1984; 65:933-943.
- 8.- Cooper, L.Z.: "The history and medical consequences of rubella". Rev. Infect. Dis. 1985; 7 (Suppl 1) : S2-10
- 9.- Chernesky, M.A.; Wyman, L.; Mahony, J.B.; Castriciano, S. and Metzler P.S.: "Clinical Evaluation of the sensitivity and specificity of a commercially available enzyme immuno-assay for detection of rubella virus-specific immunoglobulin M". J. Clin. Microbiol. 1984; 20: 400-404.
- 10.- Davis, B.D., Dulbecco, R., Emsen, H.N. Tratado de Microbiología. 2a. Edición, Salvat Editores, S.A. Barcelona 1983 pág. 1.76-1382.

- 11.- Dudgeon, J.A.: "Congenital Rubella. Pathogenesis and Immunology". Amer. J. Dis. Child 1969; 118: 35-44
- 12.- Enders, G.; Knotek, F. and Patcher, U.: "Comparison of various serological methods and diagnostic kits for the detection of acute, recent, and previous rubella infection, vaccination, and congenital infection". J. Medical Vir. 1985; 16:219-232.
- 13.- Enders, G.: "Rubella infections". Med. Lab. (Behring worke) 1984; Suppl 1: 58-71.
- 14.- Enders, G.: "Serologic Test. Combination for safe detection of rubella infections". Rev. Infect. Dis. 1985; 7 (Suppl 1): S113-122.
- 15.- Fenner, F., White, D.O. Virología Médica. 2a. Edición. La Prensa Médica, S.A. México 1979 pag. 441-420.
- 16.- Field, P.R.; and Gong M. Chun.: "Diagnosis of postnatally acquired rubella by use of three enzyme-linked immunosorbent assays for specific immunoglobulins G and M and single radial hemolysis for specific immunoglobulin G". J. Clin. Microbiol. 1984; 20: 951-958.
- 17.- Forsgren, M.: "Standardization of techniques and reagents for the study of rubella antibody". Rev. Infect. Dis. 1985; 7 (Suppl 1): S129-132.
- 18.- Fudenberg, H.H.; Stites. D.P.; Stobo, J.D.; y Wells, J.V. Inmunología Básica y Clínica. 4a. Edición. El Manual Moderno. México 1983 páq. 334-374.
- 19.- Gehrz, C.R.: "Inmunología y Respuesta del Huésped a la Infección Viral". Clínicas Obstétricas y Ginecológicas. 1982; 3: 587-596.
- 21.- Holmes, I.H.; Wark, M.C.; and Warburton, M.F.: "Is rubella an arbovirus, II. Ultrastructural morphology and development". Virology. 1969; 37: 15-25.
- 20.- Herrmann, K.L. " Available rubella serologic test". Rev. In-

- fect. Dis. 1985; 7 (Suppl 1) : S108-112.
- 22.- Horstmann, D.M.; Schluenderberg A.; Emmon, J.E.; Evans, B.K.; Randolph, M.F.; and Andiman, W.A.: "Comparison with natural infection". Rev. Infect. Dis. 1985; 7 (Suppl 1): S80-85.
- 23.- Horzinck, M.C.: "Comparative aspect of Togaviriosis". Gen. Virol. 1973; 20 87-103.
- 24.- Just, M.; Just, V.; Berger, R.; Burkhardt, F.; and Schilt, J.: "Duration of immunity after rubella vaccination: A long-term study in switzerland". Rev. Infect. Dis. 1985; 7 (Suppl 1): S91-94.
- 25.- Kalkkinen, N.; Oker-Blom, C.; and Pettersson, R.F.: "Three genes code for rubella virus structural proteins E1, E2a, E2b and C". J. Gen. Virol. 1984; 65: 1549-1557.
- 26.- Kreyszing Erwim. Introducción a la Estadística Matemática. 5a. Edición. Editorial Limusa Méx. D.F. 1981
- 27.- Kumate, J.: Inmunidad Inmunización. 1a. edición. Ediciones Médicas del Hosp. Infant. Méx. pag. 155-174
- 28.- Linhares, A.C.; Macêdo, e E.O. Santos: "Prevalencia de anticorpos para o virus de rubéola en una comunidad indígena isolada, ao norte do Pará, Brasil". Rev. Lat-amer Microbiol. 1983; 25: 131-136.
- 29.- Losonsky, G.A.; Fishaut, J.M.; Strussenberg, J.; and Ogra P.L. "Effect of immunization against rubella on lactation products I. Development and characterization of specific immunologic reactivity in breast milk". J. Infect. Dis. 1982, 145:654-660
- 30.- Losonsky, G.A.; Fishaut, J.M.; Strussenberg, J.; and Ogra P.L.: "Effect of immunization against rubella on lactation product. II. Maternal-Neonatal Interactions". J. Infect. Dis. 1982; 145: 661.666
- 31.- Madsen, R.D.; M.S.; Witheiler, A.P.; Coates, S.R.; and Rippe, D.F.: "Enzygnost-Rubella: An enzyme immunoassay for screening

- and quantitation of antibody to rubella-virus". Amer. J. Clin. Pathol. 1983; 79: 206-210
- 32.- Naeye, R.L.; and Blanc, W.: "Pathogenesis of congenital rubella". JAMA. 1965; 194:1277-1283.
- 33.- Ordoñez, B.R.: "Frecuencia de la rubéola en México. Investigación epidemiológica". Gac. Med. Méx. 1969; 99:1163-1173.
- 34.- Orenstein, W.A.; Preblud, S.R.; Bart, K.L.; and Hinman, A.R.: "Methods of assessing the impact of congenital rubella infection". Rev. Infect. Dis. 1985; 7 (Suppl 1): S22-27
- 35.- O'Shea, S.; Parson, G.; Best, J.M.; Banatvala, J.E.; Balfour, H.H.: "How well do low levels of rubella antibody protect". Lancet, 1981; 2:1284
- 36.- O'Shea, S.; Best, J.M.; and Banatvala, J.E.: "Viremia, virus excretion, and antibody responses after challenge in volunteers with low levels of antibody to rubella virus". J. Infect. Dis. 1983; 148: 639-647
- 37.- Palmer, D.F.; Cavallaro, J.J.; Herrmann, K.L.: "A procedural guide to the performance of rubella hemagglutination inhibition test". Atlanta. Center for Disease Control, 1980
- 38.- Rubella Prevention MMWR 1986; 35: 128-135
- 39.- Saavedra, U.: "Determinación de anticuerpos séricos antirrubéola en humanos por inmunoensayo enzimáticos". Tesis Profesional. Facultad de Ciencias UNAM. 1985
- 40.- Schmidt, N.T.; and Lennette, E.H.: "Antigens of rubella virus" Amer. J. Dis. Child. 1969; 118:89-93
- 41.- Schekarchi, I.C.; Sever, J.L.; Nerurkar, L.; and Fuccillo, D.: "Comparison of enzyme-linked assay with enzyme-linked fluorescence assay with automated readers for detection of rubella virus antibody and herpes simplex virus". J. Clin. Microbiol. 1985; 21: 92-96
- 42.- Gosa, S.M.; Magaña, M.C.: "Encuesta de anticuerpos contra la

rubéola en estudiantes universitarias". Bol. Med. Hosp. Infant. 1974; 31: 1165-1170.

- 43.- Steece, R.S.; Talley, M.S.; Skeels, M.R.; and Lanier, G.A.: "Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, hemagglutination inhibition, and passive latex agglutination for determination of rubella immune status". J. Clin. Microbiol. 1985; 21: 140-142
- 44.- Stewart, G.L.; Parkman, P.D.; Hopps, H.E.; Douglas, R.D.; Hamilton, J.P.; and Meyer, H.M.: "Rubella-virus hemagglutination-inhibition test". N. England J. Med. 1967; 276: 554-557
- 45.- Storch, G.A.; Myres, N.: "Latex-agglutination. Test for rubella antibody: Validity of positive results assessed by response to immunization and comparison with other test". J. Infect. Dis. 1984; 459-464
- 46.- Urquhart, G.E.D.; Worswick, D.A.W.; and Grist, N.R.: "A modified rubella HI test. Using prestandardized reagent". J. Clin. Path. 1976; 29: 1101-1104
- 47.- Varela, B.Y.: "Determinación del virus de rubéola por ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA). Tesis Profesional. Fac. de Química. UNAM. 1986
- 48.- Vaheri, A.; Salonen, E.M.: "Evaluation of solid-phase enzyme-immunoassay procedure in immunity surveys and diagnosis of rubella". J. Med. Virol. 1980; 5: 171-181
- 49.- Voller, A., Bidwell, D.E.; and Bartlett, A.: "The enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Dynatech Lab. Inc. 1979