

5  
247



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"ZARAGOZA"

DETERMINACION DE ANTICUERPOS DE LA CLASE  
Ig M CONTRA EL VIRUS DE LA RUBEOLA EN SUERO  
DE PACIENTES CON SINDROME DE TORCH.

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

RODOLFO CORTES ALFARO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

MARZO, 1991



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.

## 1. INTRODUCCION:

La enfermedad que hoy es reconocida como rubéola clínicamente fue descrita en la literatura germana hace 200 años. El origen viral de la rubéola fue demostrado en 1938 por Hiro y Tasaka, quienes transmitieron la enfermedad, por inoculación subcutánea de un filtrado libre de células de raspados de garganta tomados de paciente con rubéola. Algunos casos de infantes los cuales tuvieron defectos congénitos tales como cataratas, sordera y problemas cardiacos; y cuyas madres habían padecido rubéola al inicio del embarazo, habían sido reportados por la fundación de investigadores sobre niños en Cincinnati entre 1933 y 1936 por Beswick pero el significado de esta asociación entre la enfermedad materna y los defectos no habían sido apreciados. (1).

La extensión de la epidemia de rubéola en Australia de 1939 a 1941 y el subsecuente incremento de nacimientos de niños con el mismo tipo de deformidad en grandes áreas separadas del continente de Australia, pudieron bien haber sido los factores que atrajeron la atención de Sir Norman Gregg para que

estableciera la relación causal entre los defectos y la infección de rubéola durante el embarazo temprano. La asociación entre sordera congénita y rubéola materna fué primero reconocida en 1943 por Swan; e independientemente casi al mismo tiempo por Gregg en 1944. Swan en 1943 colectó datos sobre 101 casos de malformaciones congénitas siguientes a la infección de rubéola en el embarazo temprano y encontró que las malformaciones más frecuentes fueron: microcefálea ( 62% ), defectos cardíacos ( 52% ), sordomudo y sordera ( 48% ), cataratas ( 10% ) y deficiencia mental ( 5% ). Los casos de sordera encontrados por Gregg y col; en 1944 en un estudio en el nuevo sur de Gales tuvieron resultados similares. ( 1 ).

La confirmación de la asociación entre rubéola materna y malformaciones congénitas pronto vinieron de otras fuentes de Australia, de Carruthers 1945, Parrick 1948; en Gran Bretaña por Hope Simpson 1944 y de muchas otras partes del mundo, en E.U.A. muchos casos fueron reportados por Wesselloft 1947. ( 1, 2 )

Los siguientes 20 años al descubrimiento de Gregg poco progreso hubo hacia el entendimiento de la patogénesis de la rubéola incluyendo el mecanismo de daño fetal o en el desarrollo de un medio de prevención aun cuando algunos experimentos llevados a cabo en voluntarios por Frugman y Ward (1951) rindieron algunos datos limitados. ( 1, 2 )

En 1962 el virus de la rubéola fué aislado por técnicas de cultivos celulares por dos grupos independientes de investigadores; Parkman y col. Weller y Neva ambos en 1962. Este descubrimiento llevo inevitablemente al desarrollo de nuevas

técnicas para el diagnóstico y profilaxis de rubéola y también para el detallado estudio de los efectos del virus sobre el feto. Así en 1962 la rubéola apareció en forma epidémica en Europa y más tarde se extendió a los E.U.A. donde una pandemia ocurrió de 1964-1965 lo cual produjo miles de niños afectados por rubéola intrauterina, que sirvieron como material para el estudio y mejor entendimiento de la enfermedad. ( 2 )

## 2. GENERALIDADES:

El virus de la rubéola para su clasificación se dice que es un rubivirus, un miembro de los togaviridae. La microscopía electrónica lo define como una partícula esférica con un diámetro de 50 a 70 nm con proyecciones de superficie de 6 nm, el virión contiene un denso núcleo central medible en cerca de 30 nm de circunferencia, posee una doble envoltura de aproximadamente 8 nm de espesor.

El virus es pleomórfico sin simetría obvia y es un RNA virus de un solo filamento, con un peso molecular de  $4 \times 10^6$  Daltons y han sido identificados 8 diferentes polipéptidos en su purificación por electroforesis en gel - polyacrilamida. (31)

El virus de la rubéola consiste de una sola variedad antigénica y no hay relación serológica existente entre rubéola y otro grupo de virus conocido. Se parece al virus del sarampión en cuanto a consistir de una sola variedad antigénica y no muestra ninguna evidencia de poseer subtipos serológicos o de sufrir la variación antigénica que es un signo tan común del virus de la influenza y otros virus respiratorios. Aún cuando no puede del todo descartarse la posibilidad que variedades del virus de la rubéola pueden fluctuar en virulencia o padecer variación antigénica, así parecen señalarlo las epidemias de los 40's y 60's, aunque también debe tomarse en cuenta la población susceptible. Otro punto que apoya esto han sido los reportes de Japón donde la incidencia de defectos congénitos es muy baja aún cuando la incidencia de mujeres en edad de procrear

susceptibles a rubéola no es diferente a aquellas en países de Europa y Norte América. ( 31 )

El virus de la rubéola contiene un antígeno HA , antígenos FC' y antígenos precipitantes. El antígeno HA se sabe que está localizado en la superficie celular, porque la hemadsorción ha sido observada en cultivos de células infectados y porque las partículas virales han sido observadas en la superficie celular por microscopio electrónico. Varias especies de glóbulos rojos (GR) son aglutinados ( pollos recién nacidos, gansos adultos, paloma y humanos "O" ) 2 antígenos FC' han sido descritos, un antígeno como una partícula larga y el otro antígeno como una partícula más pequeña, la más pequeña o antígeno soluble tiene una densidad más baja que la partícula larga y no está asociada con actividad infecciosa o actividad hemaglutinante, aunque se ha demostrado que ambos son similares en su composición proteica. Dos antígenos precipitantes han sido descritos como antígenos Theta e Iota el Theta también aparece en la superficie del antígeno y puede ser una subunidad del antígeno HA. El antígeno Theta persiste de manera similar a aquellos anticuerpos HAI, mientras la precipitina anti-Iota se parece a la respuesta de anticuerpos FC ; aparece más lentamente y cae más rápidamente . Algunos infantes con SRC continúan produciendo precipitina anti-Iota por arriba de 2 años después del periodo usual de la excreción viral, esto indica que la síntesis viral continúa. Así también recientes estudios han establecido que el virus de la rubéola contiene 3 estructuras proteicas; 2 glicoproteínas en la envoltura ( E1, E2 ) y una proteína no glicosada en la nucleocápside denominada ( NC ).

El virus se mantiene a 4°C en medios de transporte hasta una semana. El virus es relativamente termolabil, pierde su infectividad a 56°C por 30', a 70°C durante 1' y a 100°C durante 2', mantiene su infectividad de 4 a 8°C por una semana y a -60°C algunos años.

El virus es sensible a extremos de pH, pierde su infectividad a menos de 6.8 y mayores de 8.1, el virus es destruido rápidamente por la luz ultravioleta. El éter, acetona, cloroformo o desoxicolato destruye la infectividad del virus al igual que el alcohol al 70%, Hipoclorito de Sodio al 0.5% y en menor grado el Cloruro de Benzalconio, es resistente a la acción del fluorocarbano, Bisulfito de Sodio y Timersal.

El virus fue primeramente aislado en cultivos primarios humanos y cultivos primarios de riñón de mono verde africano. Ahora se cultiva el virus en una gran variedad de células, muchas de las cuales están disponibles para propósitos diagnósticos, para antígeno o para producción de vacunas. ( 33 )



### 3. EPIDEMIOLOGIA:

La rubéola tiene una distribución mundial pero una marcada variación en la incidencia de la enfermedad, es encontrada de un país y un continente a otro. Como se sabe la incidencia de rubéola es difícil de estimar debido a la frecuencia de la infección subclínica y de la semejanza entre rubéola y otros exantemas virales.

Sin embargo, una extensa vista de la incidencia mundial, puede ser de beneficio para el escrutinio de la distribución de casos reportados y los valores de incidencia para los diferentes grupos de edades en los países donde es notificado. Así como la serología sobre la incidencia de anticuerpos anti-rubéola en los diferentes grupos de edades de ambos sexos entre una población para distinguir la proporción de individuos susceptibles y la de individuos inmunes, que a la vez es esencial para determinar el efecto de la vacunación. (TABLAS 1,2). (3)

TABLA 1.

Datos epidemiológicos del estado de anticuerpos en 9 países de Europa, en % de frecuencia de anticuerpos contra rubéola de acuerdo a la edad. (+)

Edad(años)	Argelia	Checoslovaquia	Francia	Alemania	Hungría
1-4	N.K.	20.0	N.K.	28.0	43.0
5-9	60.0	25.0-63.0	51.0	52.8	50.0
10-14	80.0	64.8-86.6	62.0	69.7	58.0
15-19	89.7	86.6-92.1	81.0	83.4	74.0
20-30	89.5	92.1-96.5	87.0	89.6	85.5

TABLA 1 (cont.)

Edad(años)	Polonia	Suiza	U.R.S.S.	Gran Bretaña.
1-4	44.0	0.0	20.0	7.0
5-9	71.7	80.0	85.0	40.0
10-14	84.7	72.0	71.0	40.0-60.0
15-19	92.9	90.0	90.0	71.0
20-30	95.9	96.0	95.0	80.0

N.K. = No conocido. (+) = Datos obtenidos por pruebas de neutralización durante el periodo de 1966-1967.

De la organización de salud mundial; Prevención de rubéola. Reportado por un grupo de trabajo convenido por la oficina regional para Europa de la organización mundial de salud; Budapest, Junio 12-16, 1972. Copenhague, WHO, 1973.

TABLA 2.

Datos epidemiológicos sobre el estado de anticuerpos contra rubéola en varios países, en % de frecuencia de acuerdo a la edad.

Edad(años)	AFRICA		ASIA		JAPON		
	Togo	Kampala	Lagos	Saigon	Singapore	Fukuoka	Ohstu
17-21	64.0	--	--	--	76.0	--	31.0
22-29	--	--	--	--	75.0	64.0	34.0
30-35	--	--	--	--	(100.0)	68.0	38.0
Mujeres adultas.	--	85.5	85.4	92.9	---	---	---

AMERICAS

E.U.A.

Buenos A.	Sao Paulo	Ontario	Ottawa	Kingston	J. Atlanta	11 Ciudades
83.0	76.0	70.0	86.0	52.0	82.0	75.0
87.0	77.0	80.0	88.0	67.0	88.0	79.0
79.0	83.0	---	93.0	---	84.0	86.0
---	---	---	---	---	---	---

La epidemia mundial de la rubéola es más variable y menos regular que la del Sarampión. 3 extensos patrones epidémicos de rubéola existen:

-> En poblaciones continentales en los países del hemisferio norte y del sur, las epidemias tienden a ocurrir cada 9 a 10 años con dispersos brotes, entre y con mayor epidemia o pandemia en intervalos de 30-40 años. Los periodos epidémicos en el Reino Unido y los E.U.A. no han sido diferentes. Una diferente periodicidad, de las epidemias ha sido observado en Checoslovaquia y en Polonia cada 4 a 5 años.

-> En áreas densamente pobladas, las epidemias de rubéola probablemente ocurren anualmente como el resultado de un continuo rango de infección.

-> Y en áreas aisladas tales como las islas Pribilof en Alaska, en los cuales la introducción de rubéola en una población virgen resulta en una extensiva epidemia afectando a toda la población susceptible de cualquier edad. (3, 4)

Los datos de distribución mundial sobre la incidencia global de rubéola han sido obtenidos de varios estudios serológicos, pero todos los estudios parecen tener una distribución uniforme de anticuerpos contra rubéola en varios grupos de edades en los 5 continentes. Entre 17-22 años de edad el anticuerpo fue encontrado en aproximadamente 80 % sobre 12 de los 25 grupos estudiados y sobre 70 % sobre los 20 países participantes. La proporción de mujeres embarazadas (edad no especificada) fue 85 % o más en 8 de los grupos estudiados. Así mismo Peckman, 1983, ha demostrado una marcada diferencia en cuanto a la susceptibilidad a la rubéola entre mujeres de diferentes grupos étnicos.

Los defectos de rubéola congénita han sido reportados de muchos países del mundo siguientes a el original reporte de Gregg en los años, de Suiza: Lundstrom, 1952, del Reino Unido; Marson y cols. 1960, de E.U.A; Rubella Symposium, 1965, y de muchas otras partes del mundo, como se espero hubo una cerrada correlación entre la incidencia de rubéola y la aparición de defectos tipo rubéola, así también en México un estudio señala otros signos que acompañan a este síndrome además de los típicos ya observados en estudios anteriores. (TABLA 3). (4,5)

TABLA 3.

OBSERVACIONES	PRETERMIND	CARDITIS	QUERATITIS	SORDERA
Distorsión brazo izquierdo.	(-)	(-)	(+)	(-)
---	(-)	(-)	(-)	(-)
Retraso en edad ósea	(-)	(-)	(-)	(-)
Retraso psicomotor.	(+)	(-)	(+)	(-)
Hidrocefalia	(+)	(-)	(-)	(-)
Exantema rubeliforme.	(-)	(-)	(-)	(-)
Hepatitis A	(+)	(-)	(-)	(-)
Cuello corto, pulgar derecho ausente, deficiencia ano-recto.	(-)	(+)	(-)	(-)
Polidactilia.	(-)	(-)	(-)	(-)
Alteraciones en la marcha. bradipsiquia.	(-)	(-)	(-)	(-)
Ictérico	(+)	(-)	(-)	(-)
Retraso psicomotor	(+)	(+)	(-)	(-)
---	(-)	(+)	(-)	(-)

TABLA 3. (cont.)

Bradicardia, encefalopatía	(+)	(-)	(-)	(-)
Hepatitis.	(+)	(-)	(-)	(+)
Piel y cabello seco, bradicardia, hiper- tiroidismo.	(+)	(-)	(-)	(-)
---	(-)	(+)	(-)	(-)
Hepatitis	(-)	(-)	(-)	(-)
Acortamiento del miembro pelvico derecho.	(-)	(-)	(-)	(-)

Sueros positivos para Ig M contra rubéola mediante IF.  
Datos obtenidos en un estudio de 90 sueros obtenidos del Hospital  
Infantil de México "Federico Gómez". Abril 1990.

Generalmente se infiere que donde la incidencia de la infección natural de rubéola es bajo el riesgo de defectos de rubéola congénita es por lo tanto alto y viceversa. Los factores tales como la edad, sexo, genética y socioeconómico pueden tener cierta influencia sobre la incidencia de defectos de rubéola congénita pero su impacto es difícil de precisar. Durante los pasados 30 años dos grandes periodos epidémicos de rubéola han dejado a su paso gran cantidad de niños dañados por rubéola intrauterina. El primer periodo fué de 1940 a 1943, cuando después de la experiencia de Australia los defectos de rubéola congénita fueron reconocidos en todo el mundo.

Un similar episodio con un número mayor de niños afectados por rubéola congénita ocurrió de 1962-1964 en Europa

particularmente en Gran Bretaña y en Islandia, este incremento fué seguida un año mas tarde por la catastrófica pandèmia de los Estados Unidos de Norte América. ( 5, 6 )

Se estima que la incidencia de infeccion fetal se calcula en un rango desde 4-30 casos por 1 000 nacimientos vivos durante periodos epidèmicos a no menos de 0.5 casos por 1 000 durante periodos no epidèmicos.

Aún cuando los cambios en la incidencia de rubèola congènita han llegado a ser aparentes como resultado de los programas de vacunaci3n en algunos paises, la conquista de rubèola congènita no ha sido lograda. En E.U.A. la incidencia de este s3ndrome como es reportado por la National Congenital Rubella Syndrom Registry (NCRSR) y por el Birth Defects Monitoring Program (BDMP) muestran una progresiva declinaci3n durante el periodo de 1971 a 1978; Asi tambi3n como un estudio en el St.Thoma's Hospital en el Reino Unido de 1978 a 1986 donde resultaron 17 y 1 casos de rubèola congènita respectivamente (Best,1987), pero despreciando la cobertura extensiva de la vacunaci3n algunos casos siguen ocurriendo. ( 7 )

#### 4. PATÓGENESIS Y CUADRO CLÍNICO.

##### 4.1 RUBÉOLA POSTNATAL.

Los detalles concernientes a la forma de diseminación del virus de la rubéola a través del cuerpo humano siguiente a la infección primaria fueron originalmente determinados por los experimentos en voluntarios humanos llevados a cabo por Krugman y col. 1953 y Krugman y Ward 1954. La infección de rubéola por virus en niños o adultos generalmente es caracterizada por un exantema con infrecuentes complicaciones. Las manifestaciones clínicas pueden abarcar desde una inaparente infección, hasta el cuadro clínico característico del exantema, linfadenopatía y fiebre moderada. Cuando la enfermedad se presenta en adultos el cuadro clínico tiende a ser más severo, con poliartrosis y poliartralgia ( 8 ).

El periodo de incubación es de 14 a 21 días. El exantema de la rubéola es variable, y no cuenta con un signo el cual sea patognomónico, generalmente se presenta una lesión maculopapular eritematosa, que inicialmente aparece en cara y cuello, y se extiende en las siguientes 24 horas a tronco, manos y piernas; frecuentemente se desvanece y desaparece entre 2-4 días sin dejar cicatriz. La viremia en rubéola aguda ha sido reportada para iniciar 6-7 días antes del exantema y para finalizar abruptamente de uno a dos días después del ataque del exantema, cuando el anticuerpo aparece. ( 8 )

Puede existir participación del hígado en niños con rubéola, sin embargo generalmente es subclínica en la mayoría de los casos. Parece ser que la disfunción hepática es con mucho la

complicación sea común en los niños. Entre los pacientes con deficiencias hepáticas la rubéola por sí misma es ligera, únicamente cerca del 28 % de los pacientes tienen temperaturas sobre 37.5 °C.

Aunque el exantema es el signo más común de la enfermedad, puede ser confundida con otros causados por diferentes infecciones, o por intoxicación medicamentosa o alimenticia, es contagiosa y los contactos casuales favorecen la infección.

( 9 )  
La aparición del exantema sobre una piel negra o café puede muy probablemente ser no considerada como rubéola, llevando hacia un diagnóstico erróneo.

La replicación viral inicia en la mucosa nasofaríngea y es seguida por la diseminación de la infección a tejidos linfáticos locales. La replicación viral en garganta y secreciones nasales pueden ser detectados tan temprano como a los 7 días antes de la aparición del exantema, de la misma manera la linfadenopatía es detectada. Los virus son raramente detectables después de periodo exantemático, y para propósitos prácticos el paciente, es considerado como no infeccioso unos pocos días después de que el exantema ha desaparecido. El virus puede ser recuperado del torrente sanguíneo por los 7 días antes de la aparición del exantema, pero sin embargo desaparece rápidamente del torrente sanguíneo, al igual que en las secreciones respiratorias haciéndolo difícil de aislar. ( 9, 10 )

En estudios para determinar el papel del interferón en rubéola, se observó que cuando se estimularon con virus de rubéola células con luz ultravioleta (U.V.) los cultivos de



linfocitos de individuos inmunes a rubéola respondieron con producción de 12-14 veces más interferón que los hechos por cultivos de linfocitos de individuos susceptibles a rubéola.

Los niveles más altos de interferón fueron, detectados 6 días después de la estimulación de linfocitos con el antígeno del virus de la rubéola. Como se sabe los cultivos de macrófagos y linfocitos producen interferón después de la estimulación con bacterias, derivados protéicos purificados y una variedad de virus. Ha sido demostrado que los productores activos de interferón son linfocitos T, timo derivados y que tal producción de interferón ocurre en asociación con la transformación de pequeños linfocitos a células tipo blastos. ( 11 )

La viremia generalmente no ha sido detectada siguiente a la reinfección en individuos con inmunidad natural o inducida, en ellos se ha demostrado una infección local de tejidos nasofaríngeos con extensión limitada. Tal reinfección en mujeres embarazadas no posee ningún riesgo para el feto. En la infección aguda los anticuerpos circulantes aparecen entre el primero y el segundo día después de la fase virémica y del ataque del exantema. La detección de anticuerpos por cualquier método es similar en tiempo de aparición y de el nivel de acuerdo a la sensibilidad de la prueba. Inicialmente inmunoglobulinas Ig M e Ig G son detectadas; La medición de anticuerpos por pruebas de inhibición de la hemaglutinación u otros procedimientos apropiados, pueden detectar por el 2 o el 3 día los anticuerpos o aún antes.

Estos alcanzan su máximo aproximadamente 21 a 28 días después y entonces gradualmente caen a niveles muy bajos en los cuales persisten por muchos años. Los de la clase Ig M no persisten más allá de 4-6 semanas después de la enfermedad, por el contrario los de la clase Ig G generalmente persisten de por vida. ( 12, 13 )

Aún si el anticuerpo es encontrado para haber caído hasta muy bajos niveles, la experiencia nos ha demostrado que la reinfección o la vacunación invariablemente resultaran en un tipo de fomentador para la respuesta de anticuerpos Ig G. La completa pérdida de anticuerpos y la reversión a un estado susceptible es muy rara.

Los ensayos serológicos corrientes con rubéola detectan antígenos hemaglutinantes (HA) para el virus de la rubéola, por uso de ensayos de inhibición de la hemaglutinación (HAI), ensayos HA pasivos y hemólisis simple radial ó ensayo inmuno enzimático (ELISA).

Puede haber complicaciones tales como encefalitis post-infecciosa, rara pero seria complicación de 1/6 000-10 000, así como purpura trombocitopénica siendo de 1/3 000, así como artralgia y artritis, siendo la complicación más común principalmente en adultos.

También han sido reportados problemas cardiacos, debe ser notado que la miocarditis con anomalías del sistema de la conducción ó defecto congestivo cardiaco puede ser una complicación de rubéola postnatal, también ha sido reportada hepatitis como otra complicación de rubéola postnatal.

( 13 )

#### 4.2. RUBÉOLA CONGENITA.

En contraste a la rubéola postnatal la cual es una enfermedad autolimitante, la rubéola contraída "in útero" frecuentemente lleva a una infección diseminada con participación visceral y un estado infectivo crónico con persistencia viral a través de la vida fetal y después del nacimiento.

Es evidente que el daño fetal en cualquier forma resulta de infección fetal, pero aún cuando la infección fetal siguiente a la infección maternal en el periodo vulnerable de el primer trimestre y el inicio del segundo es común, no necesariamente sigue que el feto sera dañado.

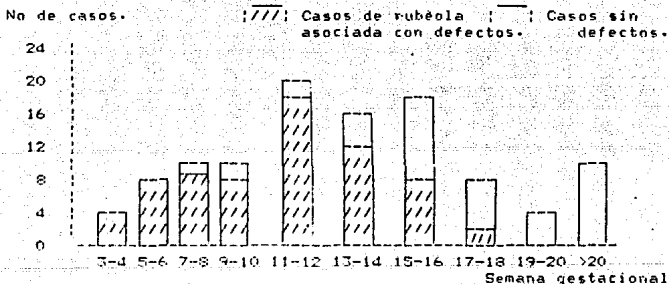
El feto puede escapar de la infección o aún estando infectado puede ser capaz de reaccionar sin sufrir daño irreversible. El hallazgo de pequeñas cantidades de células infectadas en aparentes tejidos normales, suponen esta última posibilidad. ( 14 )

Diversos estudios llevados a cabo por varios investigadores señalan el rango de infección fetal en 80 % siguiente a la adquisición de rubéola maternal en las primeras 12 semanas de embarazo, 67 % de 13 a 14 semanas y 25 % al final del segundo trimestre, incrementandose a 60 % para finalizar al 95 % en los últimos estadíos del embarazo. En cambio la incidencia de daño fetal fué muy diferente, el 100 % de los infantes expuestos en las primeras once semanas de gestación, fueron encontrados para tener defectos del corazón o sordera; de 11 a 12 semanas el 50 % de los infantes tuvo signos de sordera, así como el 35 % expuesto entre la semana 13 a la 16. En infantes cuyas madres habían

tenido rubéola después de las 16 semanas de embarazo, ningún signo de los defectos típicos de rubéola fueron detectables a la edad media del seguimiento que fué de 26 meses. ( 14 )

En varios estudios llevados a cabo sobre personas embarazadas casi ninguna evidencia de infección intrauterina se ha encontrado en los cuales el exantema de la madre apareció en un intervalo de 54 días anteriores a 12 días después del último periodo menstrual (UPM), excepto en un 5 % encontrado generalmente sobre el día 11 después del UPM. Todo el 100 % de embarazos en la cuál el exantema apareció 3-6 semanas después del UPM resultó en infección fetal. Asi como la mayoría de los niños infectados hasta la semana 16 de embarazo, fueron infectados y tuvieron defectos, pero ningún niño cuya madre fué infectada antes de la semana 7 de embarazo escaparon del daño. (Gráfica I ). (15)

GRAFICA I



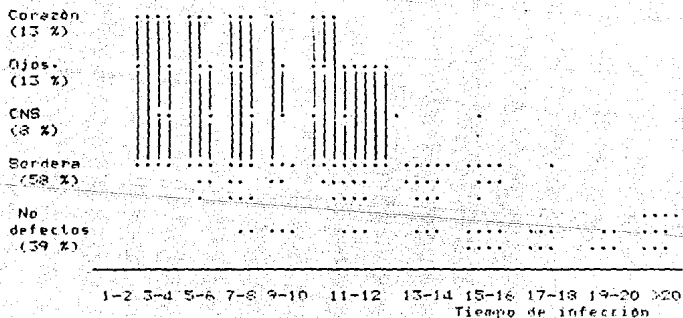
Rubéola congénita confirmada con infección maternal probada por tiempo de infección. Munro N. Sheppard S. et al University Department of Paediatrics and Child Health, and department of Microbiology. Hospital for sick children, London 1971.

La rubéola que aparece 7 días después del UPM en un ciclo corto de 21 días, puede llevar a la infección fetal, pero la rubéola que aparece antes de esto debería ser progresivamente menos probable para hacerlo. El riesgo para el feto de rubéola maternal que inició antes del UPM es probablemente insignificante.

Los defectos del corazón, ojo y SNC, fueron en su mayoría limitados hacia niños de madres quienes tuvieron rubéola confirmada en las primeras 12 semanas de embarazo y algunas ocurrieron en combinación con sordera. Múltiples defectos no fueron registrados en niños expuestos después de 12 semanas de embarazo. (Gráfica II).

#### GRAFICA II

##### DEFECTOS:



(Combinación de defectos siguientes a rubéola materna probada por el tiempo de la infección, Mumpo N. Sheppard S. University department of paediatrics and child health and department of Microbiology, Hospital for sick children, London, 1971).

No obstante la simple interpretación de varios estudios y reportes previos realizados, es que el riesgo para el feto empieza al tiempo de la concepción y que el progresivo incremento en la transmisión fetal entre 17 y 21 días después del UPM, es debido a diferencias individuales en la duración de la viremia y de la longitud del ciclo menstrual. ( 15 )

El primer indicio de que el feto puede llegar a estar infectado como resultado de rubeola materna, fueron llevados a cabo por Selzer (1963-1964) quien demostró por estudios histológicos sobre productos de concepción que la placenta y el feto habían sido infectados. Generalmente el virus puede ser recuperado de la placenta, fluido amniótico, tejidos fetales así como en varios órganos, cerebro corazón, piel y músculo entre otros.

El tejido fetal obtenido entre la semana 16 a la 26 de gestación suponen el crecimiento del virus, también como aquellos obtenidos durante la semana 10 a la 12 respaldando con esto el hallazgo de que el feto puede ser infectado a cualquier estadio del embarazo, aun cuando el riesgo varía del inicio al final del embarazo. Aun así no necesariamente el feto será dañado como resultado de la infección. ( 16 )

La infección crónica controlada "in utero" persiste dentro de la vida postnatal. Los infantes afectados con rubeola congénita excretan el virus por vía nasofaríngea y orina las primeras 4 semanas de vida.

Los infantes afectados con rubéola congénita son una fuente de contagio, y para propósitos prácticos estos infantes son una vez contagiosos después de que han alcanzado 3 meses de edad, cuando ellos pueden seguir excretando el virus, ya que la cantidad de virus a esta altura y después es generalmente menor. Aun así el virus logra persistir en órganos tales como el cristalino, el oído interno y el cerebro por periodos prolongados. ( 17 )

Otro signo que distingue a rubéola prenatal de postnatal es la respuesta inmunológica que resulta de la infección intrauterina. En 1963 Plotkin y col. reportaron que los niños con defectos pertenecientes al síndrome de rubéola congénita (SRC), poseían anticuerpos neutralizantes a una edad en la cual los anticuerpos transmitidos de la madre deberían de haber desaparecido. Este hallazgo fué confirmado más adelante por varios investigadores como Weller y col; Dudegón y col. y Butler y col. entre otros.

Además de la presencia de anticuerpos neutralizantes, también pueden ser encontrados de fijación de complemento ( FC' ) en el suero de los pacientes afectados quienes continuaron excretando el virus, lo cual ha evocado un considerable interés en sus inmunoglobulinas y debido a la persistencia viral es posible que exista un deterioro en la inmunidad celular. ( 17 )

En este tiempo fué generalmente asumido que una infección adquirida "in utero" o pronto después del nacimiento, debería resultar en tolerancia inmunológica por el infante al microorganismo, y que el infante sería incapaz de responder con la producción de anticuerpos contra ese organismo. Esta teoría

basada en el concepto de tolerancia inmunológica postulado por Burnet y Fenner en 1949, para explicar la ausencia de la formación de anticuerpos, en la infección de coriomeningitis linfocítica en ratón, que en este caso no se aplica ahora se sabe. De esta manera varios estudios sobre pacientes susceptibles e inmunes y con SRC demostraron, que al medir la respuesta al virus de la rubéola purificado, estuvieron ausentes en los controles susceptibles y ausentes o por lo menos 2 veces más bajos en niños con SRC que en los controles inmunes. Después de la estimulación con el virus de la rubéola purificado, la producción de factor inhibitorio de migración (MIF) leucocitario fue detectado en todos los controles inmunes, pero en ninguno de los controles susceptibles y en los pacientes con SRC fué significativamente menor o ausente, sin embargo cuando la infección se adquirió después del 5 mes de embarazo el decremento fue menos marcado. Generalmente los resultados varían con la edad gestacional de la infección intrauterina, el deterioro de una respuesta inmune celular, ambas después de la estimulación con PHA o con el virus de la rubéola, fué más severo en los niños afectados en los primeros 2 meses que en los estadios tardíos de gestación.

( 18 )

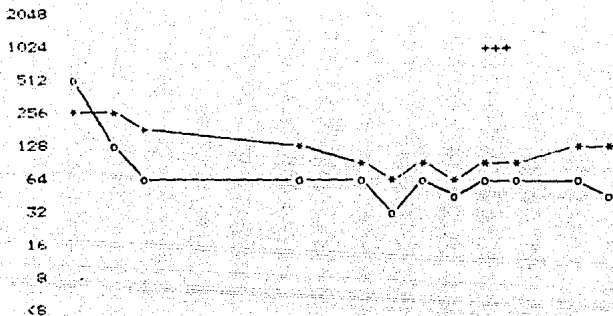
Otro aspecto importante en los niños con SRC ha sido reportado en varios estudios, un índice alto de pérdida de anticuerpos HAI contra rubéola, así como también la excreción del virus disminuye. (Gráfica III)





GRAFICA IV

Título de Ac's HAI vs rubéola



1966 67'68'69'70'71'72'73'74'75'76'77'78'79'80'81'82'83' Años

+++ Series de determinaciones de títulos de Ac's HAI en 381 niños con síndrome de rubéola congénita y 344 de sus madres.  
 (o) Representan la media geométrica anual de los títulos en los niños; (\*) Representan los títulos en las madres.  
 Kohji U; Tokogawa K; et al; department of pediatrics, Faculty of medicine, Kyushu, University, Fukuoka, Japan, 1986.

Aquí como en otros estudios sobre niños que reversion a la seronegatividad al administrarles la vacuna de rubéola, el índice de seroconversión va desde estar ausente hasta el 10 %. En contraste con controles de la misma edad sin SPC en los cuales el % de seroconversión es de aproximadamente 99 % . ( 18, 19 )

De cualquier manera algunos datos demuestran que la incidencia de anticuerpos FC' en rubéola congénita es menos consistente que los anticuerpos neutralizantes o anticuerpos HAI.

Este decline más rápido de los niveles de anticuerpos de rubéola en pacientes congénitamente infectados, puede ser explicada por la inmadurez del sistema inmunológico en el feto. Los estudios muestran que los títulos de anticuerpos HAI de rubéola están no correlacionados con manifestaciones clínicas específicas.

De las 3 estructuras protéicas principales del virión, dos son glicoproteínas de la envoltura ( E1, E2 ) y una proteína no glicosada en la nucleo cápside ( NC ). E1 se cree que contiene la principal actividad HA. Los ensayos detectan solamente anticuerpos para determinantes antigénicos E1 ( HA ), por lo tanto perdura potencialmente patrones anormales de reactividad de anticuerpos dirigidos contra las mayores estructuras protéicas virales del virus de la rubéola ( E2, NC ). Previos estudios han caracterizado el desarrollo de técnicas de ELISA para el virus de la rubéola que usan viriones completos de rubéola como antígenos blanco y tienen la capacidad de detectar anticuerpos para las 3 estructuras del virus de la rubéola. ( 20 )

Al comparar ambas técnicas, cierto número de sueros tuvieron títulos más altos por ELISA que por HAI significativamente. Pero existe una correlación entre ambos títulos de ambas técnicas, así lo demuestran la mayoría de los sueros obtenidos 6 meses después de la inmunización con vacuna ( RA 27/3 ) o 6 meses después de la infección de rubéola. Cuando sueros de pacientes con SRC fueron evaluados ( 66.7 % ), tuvieron títulos de ELISA elevados.

La discrepancia puede ser explicada por la presencia de títulos incrementados de anticuerpos contra determinantes antigénicos del virus de la rubéola no HA ( E2, NC ). Se ha propuesto que la elevación de E2 sobre E1 refleja cualquiera, un

incremento en la producción de anticuerpos para la glicoproteína E2 o alternativamente un decremento en la producción de anticuerpos para la glicoproteína E1, conteniendo la mayoría de determinantes HA. Aún no existe explicación para el aparente decremento ó defecto para desarrollar o sostener respuesta de anticuerpos HA, la especulación se ha centrado en algún tipo de " tolerancia inmunológica " parcial. ( 20, 21 ).

La infección intrauterina produce también cambios en las inmunoglobulinas principales del suero, Ig G, Ig M e Ig A. En la infección primaria postnatal, los anticuerpos Ig M fueron consistentemente encontrados hasta 6 semanas después del ataque de la enfermedad y después de la semana 14 estos anticuerpos fueron generalmente no más allá detectados. El tiempo de desaparición de Ig A específica contra el virus de la rubéola varió con cada individuo. Después de la vacunación de voluntarios previamente inmunes, ningún cambio fue notado en el nivel de anticuerpos Ig A y ningún anticuerpo Ig M fue detectado. En fetos infectados Ig M total y las concentraciones de Ig A se elevaron significativamente y anticuerpos específicos Ig M e Ig A contra el virus de la rubéola fueron detectados tan temprano como a la semana 22 de embarazo.

Dado que Ig M no atraviesa placenta es asumido que el de hallazgo esta inmunoglobulina es evidencia de producción de anticuerpos fetales. ( 21, 22 )

Algunos infantes infectados con rubéola congénita también incrementan su nivel de Ig A, pero esto no es constante como el encontrado para el Ig M. Algunos reportes mencionan el hallazgo

de la persistente depresión de la producción de Ig G en pacientes con SPC, es consistente con conceptos previamente establecidos.

Poco se sabe acerca de Ig A específica contra rubéola, por años la única técnica usada fue inmunofluorescencia indirecta, en la cual la inhibición por anticuerpos Ig G reduce la detección de anticuerpos Ig A. Así la respuesta de Ig A después de la infección viral primaria, fue considerada para ser transitoria. Recientemente usando ELISA reportaron que Ig A específica viral puede persistir por varios años. Además Ig A específica contra el virus de la rubéola apareció principalmente poliméricamente en la fase aguda de la infección, mientras Ig A monomérica no llegó a una significancia cuantitativa hasta la convalecencia tardía.

Algunos reportes mencionan que los anticuerpos Ig A pueden ser encontrados durante las reinfecciones de cualquier modo concomitantemente con Ig M específica contra el virus de la rubéola o sola. Más recientemente Ig A específica contra rubéola pudo ser detectado por inmunoensayo enzimático indirecto varios años después del ataque de la infección. Encontramos por uso de inmunoensayo que su tiempo de desaparición varía con cada paciente. Por lo que Ig A debido a su inconsistencia y variación no se utiliza como herramienta diagnóstica. ( 22 )

Algunos estudios indican que aun después de la desaparición del virus de la rubéola, los linfocitos de pacientes quienes han tenido la infección de la rubéola intrauterina pueden ser tan modificados que ellos no son capaces de responder al estímulo de ciertos antígenos. Algunos resultados de los estudios realizados "in vitro", indicaron que los infantes pueden tener un defecto

en la inmunidad celular después de recobrase del SRC.

Una posible explicación para el bajo índice de afinidad en personas con rubéola intrauterina es que no es un reflexión verdadera de todos los anticuerpos específicos circulantes. Se ha publicado evidencia de que muchos pacientes con rubéola intrauterina tienen complejos inmunes circulando conteniendo antígeno de rubéola. Si esto fuera así en nuestros pacientes, un efecto secundario debería ser el enlace preferencial de anticuerpos de más alta afinidad a el antígeno circulante dejando anticuerpos de afinidad más baja relativamente libres para reaccionar en nuestro sistema. Esta posibilidad ha sido sugerida en un modelo murino con enfermedad de complejos inmunes y no puede ser excluido. Otra explicación para los hallazgos es que el anticuerpo producido en respuesta a rubéola intrauterina tiene generalmente una afinidad más baja que aquella producida en respuesta de la infección postnatal. ( 23, 24 )

El deterioro de la respuesta inmune mediado por células en niños con SRC puede ser debido a efecto teratogénico directo del virus de la rubéola sobre el sistema inmune no enteramente diferenciado. De esta manera las líneas celulares infectadas con virus de rubéola permanecen sin cambio morfológicamente, una inhibición de la división celular ocurre en células derivadas de algunos tejidos ( pulmón, riñón e hipófisis). En éstas líneas portadoras un porcentaje significativamente más alto de ruptura cromosómica fue encontrado. ( 24, 25 )

El papel del interferón en la infección limitada de rubéola congénita no está bien establecido; se ha postulado que la

persistencia de la infección es debido a la pobre producción de interferón, pero esto no está claro aún. Así se ha dicho que el virus de la rubéola, es un inductor pobre de interferón en lugar de que la edad de las células pueda ser responsable para la carencia de la producción de interferón.

Se ha demostrado que el virus de la rubéola puede inducir interferón en células fetales de 10-22 semanas de gestación, pero generalmente los niveles son más bajos que aquellos vistos con el virus Sendai. ( 25 )

Con respecto al daño que produce histológicamente las muestras presentaron lesiones de tejidos maternos, feto-embrión y corion. No consistentemente, lesiones características han sido encontradas en la placenta, aún cuando pequeñas piezas de placenta han sido descritas en unos pocos casos. Algunos de los aspectos que se han apreciado han sido, encogimiento, neurosis de las células endoteliales en villous capilares, así como neurosis del epitelio coriónico y endotelio. Las lesiones fueron reconocidas en endometrio, placenta, embrión y feto, cuando la rubéola había ocurrido durante los primeros 3 meses lunares de gestación. La consistente demostración de angiopatía en el corion temprano y tejidos embrionarios y de una progresiva inflamación esclerótica del villous, en placentas más maduras pueden explicar ambas, las malformaciones especialmente las anomalías vasculares y el retardo del crecimiento intrauterino los cuales son asociados con infecciones con rubéola del niño venidero. Un fluido amniótico café ha sido recuperado al tiempo de la amniocentesis original. ( 26 )

El aspecto de que la miocarditis progresiva ocurre en

rubéola congénita adquirida, indica la habilidad del virus de la rubéola para invadir tejido del miocardio. La lesión más comúnmente encontrada en el sistema cardiovascular son persistentes ductos arteriosos y estenosis de la arteria pulmonar y sus ramificaciones. Un único signo de rubéola congénita es que esta tiende a afectar las mayores arterias, la circulación pulmonar y la aorta mientras las arterias más pequeñas en ambas pulmonar y circulación sistémica tienden a escapar. Aquí como en otros órganos afectados en rubéola congénita, existe muy a menudo una sorpresiva carencia de cualquier reacción inflamatoria. Estudios histológicos han demostrado casi ninguna respuesta

inflamatoria a la infección persistente, en lugar de eso la mayoría de los cambios han sido relacionados a deficiente número de células en órganos individuales, necrosis focal o daño vascular. La hipoplasia de vasos y mineralización, así como la anginitis obliterativa son comúnmente afectados. ( 26 )

Las principales lesiones oculares son cataratas, retinopatía y microftalmus. Las cataratas fueron vistas después de la infección entre 3 y 11 semanas de gestación y retinopatía entre 6 y 12 semanas. Las fibras primarias y secundarias del cristalino son formadas durante la octava semana de gestación, en un periodo cuando el máximo abastecimiento de sangre a el cristalino se lleva a cabo. Estas fibras pueden ser directamente dañadas por el efecto citopático del virus de la rubéola, el cual muestra su desarrollo. El virus puede permanecer latente, capaz de causar más daño tiempo más adelante. La infección del núcleo en las fibras del cristalino es característica de las cataratas por



rubeola y de áreas de necrosis central con núcleo picnótico en áreas de degeneración son comúnmente encontradas. Similarmente la infección entre la 7 y 8 semana de gestación puede producir retardo en el desarrollo y lesiones patológicas en el iris y en el cuerpo ciliar. La atropía de el estoma del iris, hipoplasia ó ausencia de los músculos dilatadores del iris y cuerpo ciliar son generalmente encontrados. Los defectos oculares fueron notados después de la infección en el 1 trimestre y aquellos con cataratas habían sido infectados aun antes de aquellos con retinopatía. ( 27, 28 )

No han sido encontrados defectos anatómicos mayores en los huesos temporales, pero lesiones localizadas han sido encontradas en el oído interno. Estas son principalmente limitadas a las estrias vasculares, a la membrana de Reissner y a la membrana tectorial. También son comunes, la necrosis del epitelio de la coclea con daño resultante de pequeñas hemorragias y células inflamatorias en las estrias vasculares. Así como retracción lejana del órgano de Corti.

La infección de rubéola adquirida durante el inicio del embarazo puede causar defectos congénitos, de los cuales la sordera sensorneural es generalmente la más común que ocurre y a menudo aislada. Si la infección ocurre antes de la semana 18 de embarazo existe un alto riesgo de pérdida auditiva sensorneural aun si el niño parece no estar infectado al nacimiento. Un aspecto importante y útil para diferenciar a pacientes sordos debido a rubéola congénita de otros que lo son por otra causa, es por la afinidad de sus anticuerpos contra rubéola.

La otra forma de sordera encontrada en rubéola congénita

esta probablemente relacionada a una lesión central en el cerebro, resultando en una forma de impercepción auditiva central. Así mismo se sabe que la sordera considera 2 importantes aspectos, el primero es que la pérdida de la audición es sorpresivamente uniforme atravesando todas las frecuencias y no un alto tono de sordera se presenta a menudo, y segundo también existe evidencia para suponer que la pérdida de la audición debida a rubéola congénita es de tipo progresivo; En resumen la pérdida de la audición causada por rubéola congénita es generalmente severa y afecta a todas las frecuencias uniformemente. ( 29 )

El estado infectivo de la rubéola involucra también daño al hígado, incluyendo hepatomegalia y necrosis focal de las células del parenquima y estasis de la bilis, así como una infiltración de células inflamatorias. Esto está a menudo asociado con presencia de células sincitiales gigantes indistinguibles de células gigantes de hepatitis de etiología desconocida. La esplenomegalia y mucho menos común puede verse el bazo encogido. El timo es generalmente pequeño y ambos órganos pueden mostrar linfopenia. En los nódulos linfáticos, centros germinales bien desarrollados y producción de células del plasma son observadas aún antes de lo esperado.

En rubéola congénita puede darse también una pneumonitis intersticial, así como hallazgos histológicos tales como una infiltración intersticial crónica y células mononucleares y linfoides similares a aquellas encontradas en otras infecciones virales de el pulmón. ( 29, 30 )

Las principales manifestaciones clínicas que involucra el sistema nervioso central son microcefalea y una aguda meningoencefalitis. Microscópicamente el hallazgo más común es una focal meningoencefalitis con infiltración inflamatoria crónica de las meninges, ocasionalmente la infiltración alrededor de pequeños vasos puede ser vista.

Generalmente de los niños afectados del SNC existe aproximadamente un 10 % con problemas de microcefalea ( de estos un 40 % con inteligencia normal, 20 % con parálisis cerebral y aproximadamente un 10 % con retraso mental , el resto muestra rasgos no específicos así como defunción ). ( 30 )

Además de involucrar a los huesos principalmente de la metafisis sobre el extremo distal del fémur, y el extremo proximal de la tibia. Las lesiones histológicas son vistas en las líneas de osificación ; hay incremento osteoblástico y actividad osteoclastica, pobre mineralización osteoide y distorsión de la orientación columnar de espículas recién formadas. Existe también necrosis de las células del epitelio que forman la lámina dental y la ausencia de analage de dentición permanente.

El virus de la rubéola puede causar daño específico o general permanente o temporal a los tejidos linfoides. Esto probablemente explica los reportes de una variedad de síndromes inmunológicos de deficiencia en pacientes con síndrome de rubéola congénita y ayuda a explicar su variedad en este grupo de pacientes. ( 30 )

## 5. DIAGNOSTICO :

La rubéola postnatal se presenta generalmente como una enfermedad aguda infecciosa, autolimitante la cual no trasciende a excepción de raras complicaciones y deja una inmunidad de por vida; debido a esto el diagnóstico usualmente se basa en el cuadro clínico, el incremento de inmunoglobulinas específicas, el uso de antisueros específicos e infrecuentemente en cultivos de líneas celulares en las cuales se evidencia la presencia del virus por interferencia del efecto citopático producido por la superinfección por otros virus como Coxsackie A 9 y Echovirus tipo 11.

El aspecto más importante quizás de la rubéola es la transmisión fetal principalmente en el primer trimestre de embarazo que generalmente resulta en daño fetal. El hallazgo más común es la evidencia en el feto o en el recién nacido de Ig M específica contra el virus de la rubéola. Aunque el cuadro clínico y la presencia de niveles elevados de anticuerpos en la madre principalmente de Ig M específica contra rubéola son herramientas útiles para el diagnóstico, también existe otro parámetro que puede ser útil, es decir, la medición de la afinidad de Ig G específica, así en diferentes estudios ningún suero con rubéola distante tuvo suficiente Ig G 3 específica para permitir la medición. Cabe decir que en esta prueba se utiliza dietilamina que reduce el enlace de Ig G de baja avididad más que los Ig G de alta afinidad. ( 34 )

El virus de la rubéola puede ser aislado de garganta,

fluido cerebro - espinal y escasas veces del recto entre otros. La presencia del virus es detectada por cultivos en líneas celulares en donde interfiere con la superinfección con otros virus y que posteriormente se identifica con antisuero específico. En cuanto a la evidencia morfológica de la infección en biopsias de pulmón e hígado, revelan en ocasiones infiltraciones leucocitarias solamente y no células gigantes de hepatitis, lesiones necróticas hepáticas con colestasis, como generalmente debían presentarse. Así como en diferentes estudios llevados a cabo en donde a pesar de la replicación del virus de la rubéola en células humanas infectadas " in vitro " no fueron detectados efectos citopáticos. El diagnóstico es de vital importancia cuando una madre ha sido infectada principalmente durante el primer trimestre de embarazo, ya que existe un alto riesgo de infección y daño hacia el feto. También es importante en niños que han nacido con defectos o los presentan poco después del nacimiento y son de etiología viral específica de rubéola, en ocasiones ninguna anomalía es notada en el infante hasta los 3 meses de edad y hasta los 18 donde aparecen cataratas, y su exantema puede no ser de aspecto purpúrico; así el promedio de edad a la cual el deterioro auditivo que es uno de los signos característicos de rubéola congénita así como cataratas y problemas cardiovasculares, es generalmente 11.6 meses aún cuando la pérdida de la audición es generalmente identificada en la niñez temprana, existen reportes de niños con un deterioro auditivo progresivo varios años después del nacimiento. De aquí que el diagnóstico para diferenciar

rubeola postnatal de rubeola congénita o para evidenciar la presencia del virus, es un paso importante para determinar el origen etiológico y/o el tratamiento a seguir en los pacientes afectados, así que existen varias pruebas de gabinete en este aspecto. ( 34, 35 )

#### 5.1 INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION ( HAI )

La prueba de la inhibición de la hemaglutinación (HAI) para rubeola ha encontrado gran aplicación en el diagnóstico de las infecciones con rubeola y en la determinación del estado de inmunidad; para casos de rutina esta prueba ha reemplazado largamente las pruebas más caras como de neutralización de anticuerpos y fluorescencia .

La prueba utiliza eritrocitos humanos "0" y es tan sensitiva y reproducible para la detección de anticuerpos contra rubeola como las pruebas (HAI) empleando eritrocitos de pollo.

Los glóbulos rojos humanos tipo "0" son colectados en tubos con EDTA y son guardados a 4 C por 24 horas; Los eritrocitos son lavados 3 veces con Aulleta; se prepara una suspensión al 10 %, se agregan por cada ml de eritrocitos 0.1 ml de tripsina al 1 %, se deja una hora a temperatura ambiente, agitando cada 15' ; posteriormente se lava 3 veces con Aulleta y se lleva a una suspensión al 10 % ; de aquí se hace una suspensión al 0.4 % en CANM, para la prueba. ( 36 )

El antígeno puede ser extraído de células VERO o BHK-21 previamente infectadas y usado para dar 4 unidades

hemaglutinantes/0.025 ml. El tratamiento de los sueros problema para remoción de inhibidores no específicos es con kaolin 0.3 ml de la suspensión con 0.1 ml de suero, se mezcla perfectamente y se deja reposar 30' con ligeras agitaciones cada 10', después de esto se centrifuga 15' a 2 000 rpm y se inactiva a 56<sup>o</sup> C, 30' ;el suero así tratado queda diluido 1:1.

Desde el primer pozo en placas de fondo en U o V se ponen 0.025 ml hasta el pozo que se va a utilizar de CANM, posteriormente se ponen 0.025 ml en el primer pozo de suero problema y se corren las placas, después de lo cual se agregan 0.025 ml de antígeno conteniendo 4 unidades hemaglutinantes; se deja 15' a 4<sup>o</sup> C; se agregan 0.05 ml de la suspensión al 0.4 % de eritrocitos y se deja 90' a 4<sup>o</sup> C. Así el título de HAI es la dilución mas alta en la cual se aprecia la completa inhibición de la hemaglutinación.

( 37 )

## 5.2 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA :

En esta prueba el virus es inoculado a diferentes líneas celulares ( VERO; SIRC; BHK-21; FK-13 ) las cuales son infectadas; estas células son fijadas en los pozos de las laminillas para inmunofluorescencia en cantidad de 0.015 ml por cada pozo son fijados con acetona 5' y guardadas a -20<sup>o</sup> C hasta su uso.

Los sueros problema son inactivados a 56<sup>o</sup> C, 10' y diluciones dobles de los mismos son corridas en placas en V con PRS como diluyente. 0.015 ml de cada dilución son puestos sobre los pozos de las laminillas para inmunofluorescencia; la cual se incuba a 37<sup>o</sup> C durante 45' en cámara húmeda . Se lava un par de veces con PRS

y se seca al aire.

Se adiciona conjugado anti - inmunoglobulina ( Ig G ó Ig M )  
la placa vuelve a incubarse a 37 ° C 45' en cámara húmeda . Se lava  
un par de veces con PBS y se seca al aire. Se adiciona glicerina  
y se cubre con cubreobjetos para ser leído al microscopio de luz  
U.V.; contando con un control (+) y (-) . ( 38, 39 )

### 5.3 INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO ( ELISA )

Directa e indirecta.

Los principios son similares a IF de la que se diferencia en que  
emplea anticuerpos(método directo), o antigamaglobulina(método  
indirecto) marcados con una enzima capaz de desarrollar una  
reacción coloreada. La enzima más comunmente usada para el  
marcado es la peroxidasa entre otras, y la relación coloreada se  
desarrolla con bencidina y agua oxigenada. Para la visualización  
de los preparados se emplea microscopia óptica común, no  
necesitandose equipos accesorios. ELISA se emplea con los mismos  
fines que IF, con ventaja de microscopio común.

Material necesario:

- a) Inmunosuero marcado con peroxidasa (comerciales)
- b) Buffer Tris-HCl, 0.05 M, pH 7.6
- c) Agua oxigenada al 0.1 % en el Buffer indicado en b.
- d) Implantas con el antígeno (cortes de tejidos, células, etc.)  
especifico para los anticuerpos a investigar.



- c) Suero a analizar.
- f) Microscopio óptico común.

**METODO:**

- I) Cubrir las improntas con el suero a analizar e incubar a 37 C,<sup>o</sup> 15' en cámara húmeda.
- II) Lavar y cubrir con anti-inmunoglobulina marcada con peroxidasa convenientemente diluida (1:10 o 1:50) e incubar a 37 C, 15'.
- III) Lavar y cubrir con 1 ml. del siguiente reactivo:  
3,3'-diaminobencidina, HCl 5 mg.

Buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 7.6 9 ml. H<sub>2</sub>O al 0.1 % 1 ml.

==Preparar la mezcla en el momento de usar==

Mantener a temperatura ambiente durante 20', lavar, secar y observar al microscopio. Los antígenos que han reaccionado con el correspondiente anticuerpo y la anti-inmunoglobulina marcada con peroxidasa toman coloración pardusca. Los sueros marcados con peroxidasa pueden ser anti-inmunoglobulinas totales o mono-específicos. ( 39 )

## 5. PREVENCIÓN :

Ya que la rubéola postnatal es una enfermedad autolimitante y que generalmente no presenta complicaciones, usualmente es manejada con programas de vacunación cuya aplicación van desde los 12 hasta los 18 meses de vida ya que antes existen aún anticuerpos maternos ; y por lo tanto es recomendable la re-vacunación en niños que han sido vacunados antes del año de vida.

A diferencia de la rubéola congénita que es quizás el aspecto mas importante de la rubéola, puede ser prevenida por inmunización, pasiva o activa, como cualquier otra enfermedad infecciosa, pero existe una importante diferencia en la prevención de los defectos de rubéola congénita por inmunización.

El método normal de proteger a un individuo contra una enfermedad infecciosa tal como Difteria o Sarampión es por inmunización activa anterior a la exposición ; En el caso de rubéola es diferente; por lo tanto el objeto es proteger al feto indirectamente brindando protección antes de que el embarazo haya iniciado, por inmunización en la infancia o en la edad de procrear . Ayudando así a un decline en la incidencia de rubéola congénita .

La inmunización pasiva es llevada a cabo mediante el suministro de inmunoglobulinas como método de rutina es totalmente impracticable salvo en circunstancias especiales tales como que la mujer embarazada esta de acuerdo o desea llevar a término su embarazo entre otros. En si el punto importante es prevenir la enfermedad o modificar su efecto.

En este caso una suspensión completa de la infección es el objetivo a diferencia de otras infecciones como hepatitis A en la cual con la modificación o supresión de los síntomas es aceptable .

Así la inmunización activa es la forma de prevención más efectiva, la ventaja es que dando una vacuna óptima la inmunidad que resulta es generalmente de por vida así como en la infección natural . La inmunización activa, puede ser llevada a cabo por medio de productos inactivos o muertos que generalmente requieren de refuerzos por medio de una vacuna de virus vivo atenuado, en si una alta conversión es uno de los principales prerrequisitos de todos los programas de inmunización y especialmente de aquellos encaminados a la eliminación de una enfermedad particular . ( 40 )

Las únicas reacciones adversas de la vacunación han sido artritis y artralgia. Estas fueron mucho más severas siquiente a la utilización de la vacuna HFV-77 (niñon de perro), que aun con otras vacunas, por lo que ha sido substituida . ( 41 )

Un obstaculo que se presenta a larga escala en los programas de vacunación, son los niños alérgicos cuyo número parece incrementarse por lo menos en los países industrializados. En varios estudios sobre niños con formas comunes de alergia sistémica, cerca del 95 % pueden ser vacunados con seguridad con la vacuna MMR (Measles, Mumps, Rubella) y en general las enfermedades alérgicas no deberían interferir con la ejecución de los programas de vacunación . ( 42 )

Se ha observado que no existe interferencia inmunológica cuando la vacuna de sarampión o la MMR es dada al mismo tiempo con la vacuna DPT ( Difteria, Pertusis y Tétanos ) y lógicamente existe una ventaja distinta en ofrecer ambas al mismo tiempo.

Así mismo existe seguridad y eficacia en la administración simultánea de la vacuna MMR, DPT y la trivalente OPV. Se han observado valores de seroconversión del 96 % para rubéola y sarampión. Así como también se han observado que los valores de reacciones serias asociadas con la vacunación fueron mínimas. La vacuna MMR está asociada con manifestaciones sistémicas que van de 5 % - 15 % y con raros efectos neurológicos adversos los cuales ocurren predominantemente en la segunda semana siguiente a la inmunización.

Una contraindicación para la vacunación es la administración de sangre total o productos sanguíneos, sin embargo se puede administrar a las mujeres susceptibles la vacuna y a las 24 hrs. pueden recibir la transfusión .

Otras contraindicaciones para la vacuna MMR son conocidas alergias sistémicas a neomicina, enfermedades inmunodeficientes, alta temperatura, tuberculosis activa así como embarazo a cualquier estadio entre otras. ( 43 )

## 7. FUNDAMENTACION DEL TEMA.

La primera relación causal entre rubéola materna en el embarazo y defectos congénitos fué establecida por Sir Norman Gregg en 1941 después de la extensiva epidemia de rubéola en Australia entre 1939 y 1941, y aunque similares defectos habían ocurrido antes, la relación no había sido apreciada.

La siguiente pandemia de los años 1962 - 1963 y hasta 1965 que afectó a los E.U. proporciona una visión más clara y ratificó las observaciones de Gregg, de tal manera que proporciona bastante material para entender y estudiar a la rubéola congénita. Así mismo despertó el interés por parte de investigadores y científicos en todo el mundo, que establecieron un significado mucho más serio a esta enfermedad relativamente moderada y que es quizás el aspecto más importante de la rubéola como enfermedad.

La relevancia que encierra el virus de la rubéola tal vez sea su efecto teratogénico hacia el feto, principalmente durante el primer trimestre de embarazo; por lo que la incidencia de abortos terapéuticos y espontáneos es más alto en embarazos complicados. Los signos clínicos y las consecuencias de la infección "in utero" varían de acuerdo al tiempo en que la infección ha sido contraída en el embarazo, que pueden ir desde muerte fetal, nacimientos vivos con anomalías que incluyen cataratas, problemas cardiovasculares, sordera, trombocitopenia, hepatitis, microcefalia, retardo en el crecimiento, lesiones de huesos largos, retinitis y encefalitis entre otros, hasta

infantes normales sin evidencia de anomalía alguna.

Aún después del nacimiento los infantes infectados continúan excretando el virus hasta los 18 meses de edad, aún en la presencia de anticuerpos específicos, lo que ha despertado el interés sobre defectos en los mecanismos de inmunidad celular. De aquí que se hallan establecido diferentes métodos y técnicas para el diagnóstico de rubéola postnatal y prenatal, así surgen métodos y técnicas que varían en cuanto a confiabilidad, costo y tiempo, tales como pruebas de neutralización, de fijación de complemento, hemaglutinación, inmunofluorescencia, ELISA, entre otras.

Por lo que en este estudio nos proponemos estructurar una técnica que sea lo suficientemente confiable, rápida y económica para integrarla como una prueba de gabinete en el diagnóstico y prevención de rubéola congénita.

## 8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

El síndrome de TORCH incluye alteraciones clínicas que producen severas alteraciones en el producto. La infección por el virus de la rubéola se caracteriza por provocar malformaciones de magnitud extrema en diferentes órganos o sistemas estructurales del cuerpo humano; en el mayor porcentaje de las infecciones congénitas provocadas por el virus de la rubéola son abortados, pero existe alrededor de un 10 % de productos que nacen vivos con malformaciones inducidas o producidas por este virus, y un porcentaje más alto que puede presentar alteraciones fenotípicas, lo cual es necesario correlacionar con el agente etiológico, inductor preciso de este cuadro, por lo que proponemos establecer una correlación entre las alteraciones fenotípicas en neonatos con la presencia de anticuerpos de la clase Ig M contra el virus de la rubéola, lo cual es indicativo de la presencia de infección activa en estos casos.

### 9. OBJETIVOS:

- Determinar la presencia de anticuerpos Ig M contra rubéola en sueros de pacientes con síndrome de TORCH menores de un año mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

- Observar la importancia de bloquear anticuerpos Ig G con proteína A para disminuir la interferencia en la determinación de anticuerpos Ig M por Hemaglutinación pasiva.

- Correlacionar la presencia de Ig G e Ig M en sueros de pacientes menores de un año, mediante la técnica de hemaglutinación pasiva e inmunofluorescencia indirecta respectivamente.



## 10. HIPOTESIS:

La determinación de anticuerpos de la clase Ig M específicos contra rubéola en sueros de pacientes con síndrome de TORCH menores de un año es indicativo de infección reciente. Por lo que en niños menores de 3 meses de edad la presencia de Ig M específica contra el virus de la rubéola debe ser altamente indicativo de infección congénita.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS:

Tubos de ensayo 12 x 75 mm.

Gradillas.

Placas de polipropileno fondo en V.

Micropipetas.

Puntas.

Microdilutores ( 0.050 ml )

Centrifuga fría.

Baño serológico.

Refrigerador.

Congelador (-20 C)

Mechero Fisher.

Balanza analítica.

Estufa.

Potenciómetro.

Cámara húmeda.

Placas para inmunofluorescencia.

Cubreobjetos de 50x24 mm.

Matraz Erlenmeyer.

Vasos de precipitados.

Microscopio de luz U.V.

90 sueros de niños menores de un año con síndrome de TORCH  
(Obtenidos en el hospital infantil "Federico Gómez" de la  
ciudad de México.)

## 11.1 SOLUCIONES:

P.B.S. ( Solución balanceada de fosfatos )

Globulos Rojos humanos grupo " 0 " ( 2% )

Solución salina isotónica. ( SSI )

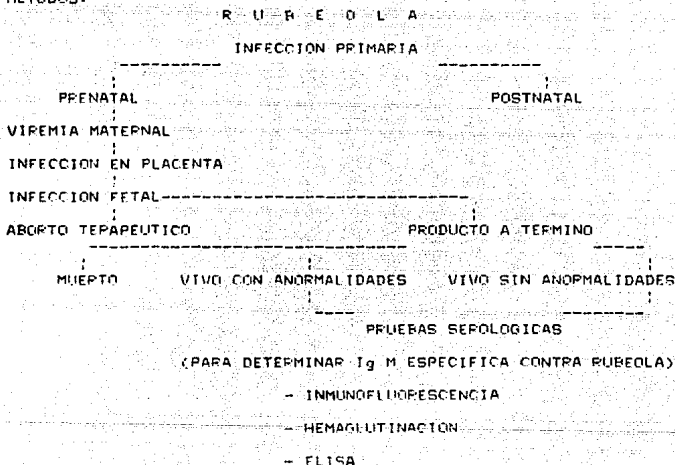
Auletta.

Cann.

Suspensión de Staphylococcus aureus Cowan I.

===== ( ver anexo ) =====

## METODOS:



## 11.2 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

Monocapa de células HELA infectados durante 5 días con el virus de la rubéola, son utilizadas para el ensayo de IF. Separamos el sobrenadante del cultivo, el cual fue centrifugado 15' a 2 500 rpm, el botón se resuspende en un poco de PBS de tal manera que no quede demasiado diluido, se colocan 0.015 ml en cada pozo (aproximadamente  $2 \times 10^4$  células) de las laminillas para inmunofluorescencia, se dejan secar a temperatura ambiente, se fijan con acetona durante 5' y son guardados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Los sueros problema se inactivan a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 10', de aquí se diluyen en placas de fondo U ó V, se adicionan en el primer pozo 0.010 ml de suero y 0.090 ml de P.B.S. y en los subsiguientes 0.050 ml de P.B.S. de aquí con microdilutores de 0.050 ml se hacen diluciones por duplicado del suero problema. Así como de un control (+ y -). Las laminillas con las células fijadas son lavadas con P.B.S. Se colocan 0.015 ml de las diluciones necesarias a ocupar en los pozos de las laminillas de mayor a menor dilución. Se incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 45' en cámara húmeda, después de este tiempo las laminillas se lavan con P.B.S. durante 5' un par de veces y se secan al aire. Se adiciona conjugado anti-inmunoglobulina Ig G ó Ig M según sea el caso; se vuelve a incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  por 45' en cámara húmeda; después de este tiempo fueran lavados en las mismas condiciones ya descritas y se secan al aire, por último se adiciona glicerina tamponada pH 8.0 y se cubre, con cubreobjetos para ser leído al microscopio de luz U.V. comparandolas con los controles (+ y -).

**Nota:**

Las diluciones empleadas fueron 1:10, 1:20, 1:80 para los sueros problema.

La dilución para el control positivo fué de 1:20.

**11-3. HEMAGLUTINACION PASIVA:**

Esta prueba utiliza G.R. "O" humanos sensibilizados, dichos eritrocitos previamente fijados con glutaraldehido se lavan con SSI 4 veces, de aquí se prepara la suspensión celular al 2.5% en SSI después de lo cual se mezcla con 1 volumen de células estandarizadas al 2.5 % con un volumen de Acido tánico diluido 1:2000 en SSI. Se incuba a 37 C por 10', hecho esto se centrifuga a 1500 rpm 5', posteriormente se lava el paquete celular con amortiguador fosfato - salina 0.15 M pH 7.2 (PBS) 1 vez y se suspende en el amortiguador al 50%; dicha suspensión se mezcla con el antígeno de rubéola ( concentración 0.125 mg/ml ) en proporción de: solución de G.R. al 50% (20%), Ag de rubéola 25% ,PBS - 55% ; que se incuba a 37 C por 30' ; después de esto se centrifuga a 2000 rpm durante 5' , se lava el paquete celular con Cloruro de Sodio 0.15 M un par de veces y 1 vez con PBS , hacer una dilución al 2% final de GR en PBS, dicha solución se conserva a 4 C .

Para la adsorción de Ig G, los sueros problema fueron inactivados a 56 C durante 10' después de lo cual se colocaron 0.025 ml de suero problema con 0.040 ml de la suspensión

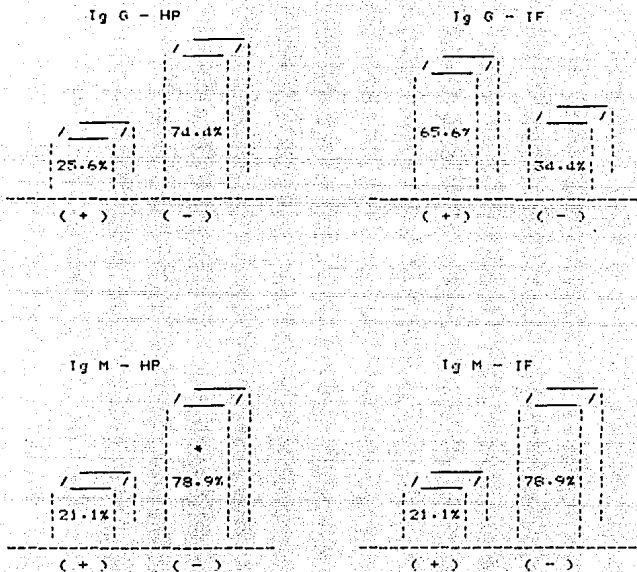
bacteriana de Staphylococcus aureus Cowan I al 50 %, se incubó a 37 °C por 15', fue centrifugada a 11 000 rpm durante 5' en una centrifuga fría y fue separado cuidadosamente el sobrenadante ( suero adsorbido ).

Dichos sueros adsorbidos, son colocados en los primeros pozos de las placas de fondos en V en cantidad de 0.025 ml; con 0.025 ml de F.B.S. en estos y todos los pozos restantes a utilizar, así de esta manera son diluidos los sueros a diluciones dobles contando con un control ( + y - )

Se agregaron 0.050 ml. de la suspensión de eritrocitos ( 2 % ) sensibilizados con antígeno de rubéola como revelador. Se mezclan suavemente y se dejan en refrigeración ( 4 °C ) por 1 hr., después de lo cual se aprecia aglutinación comparado con los patrones (+) y (-) .

## 12. RESULTADOS:

12.1 % de anticuerpos para Ig G e Ig M por IF y HP respectivamente donde se observa la diferencia de sensibilidades para Ig G y en menor grado para Ig M.

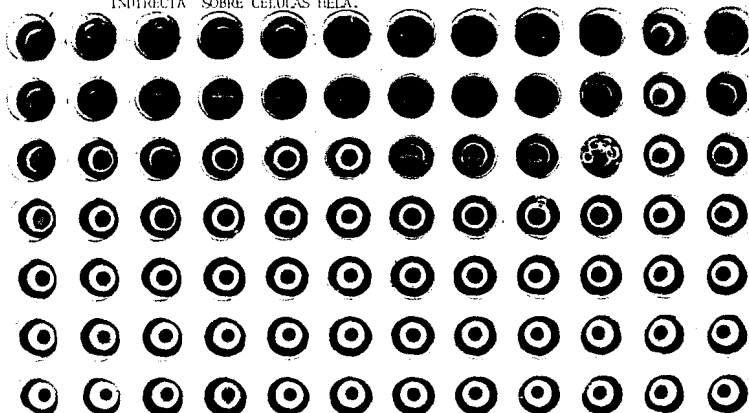


\* Este valor se incrementa con 2 falsos positivos a 81.1 %



PRUEBA PARA Ig M CONTRA RUBEOLA POR INMUNOFLORESCENCIA

INDIRECTA SOBRE CELULAS HELA.



PRUEBA PARA Ig M CONTRA RUBEOLA POR HEMAGLUTININACION PASIVA, PREVIA

ABSORCION DE Ig G DEL SUERO CON PROTEINA "A" DE Staphylococcus aureus

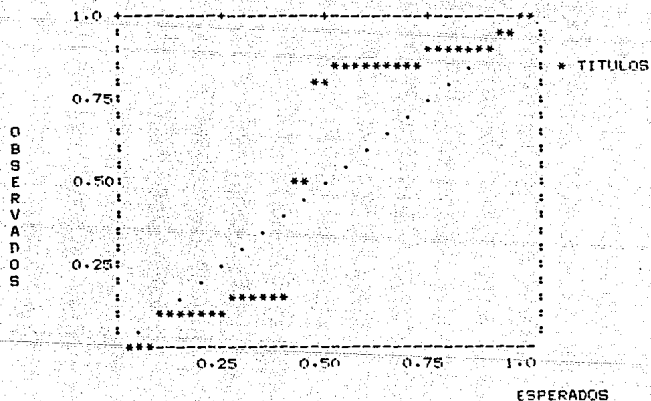
COWAN 1.



12.2 Tomando como variable dependiente Ig G por HP se obtiene:

- Una correlación del 26.6 % entre ambas técnicas para Ig G.
- Una ecuación teórica ( $y=mx+b$ )  $IgG-HP = 2.17489 + d.12456(IgG-IF)$ .
- Una gráfica de residuales entre los valores observados y los valores esperados se observa que existe una relación baja entre los títulos de IgG-HP e IgG-IF, es decir no guardan correlación entre sí. (Gráfica V)

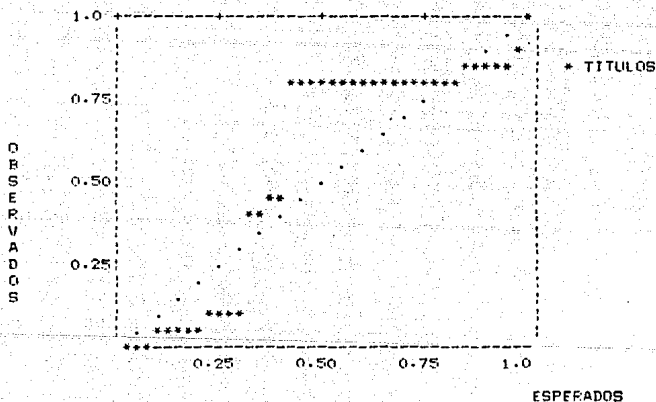
GRAFICA V



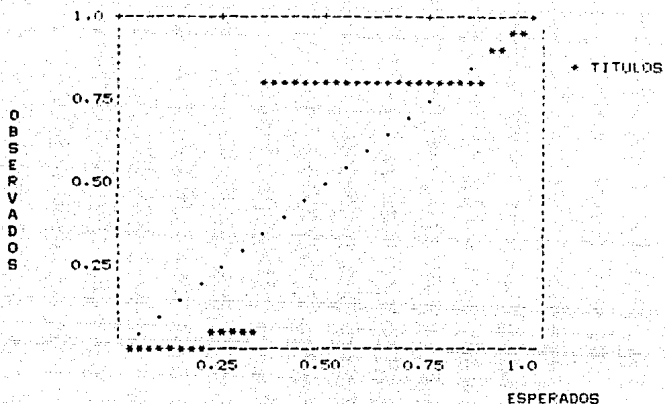
12.3 Para Ig G-IF como variable dependiente se obtiene:

- Una correlación del 26.62 % entre ambas técnicas para Ig G.
- Una ecuación teórica ( $y=mx+b$ )  $IgG-IF=1.97121+0.06455(IgG-HP)$ .
- Una gráfica de residuales entre los valores observados y esperados en los cuales se observa una baja relación, entre los títulos de IgG-IF y los de IgG-HP por lo que no existe correlación entre sí. (Gráfica VI)

GRAFICA VI



GRAFICA VII



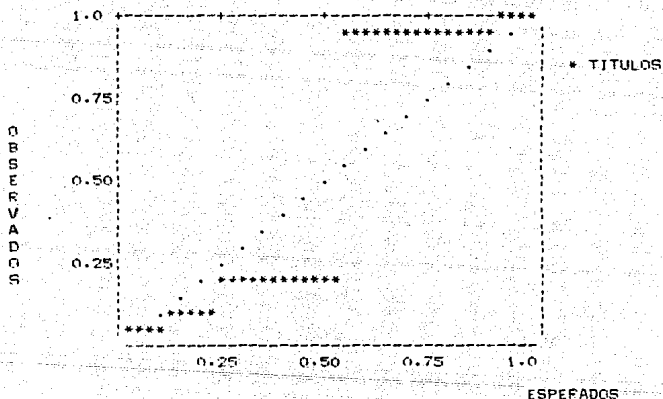
12.4 Para IgM-HP como variable dependiente se obtiene:

- Una correlación del 48.52 % entre ambas técnicas para IgM.
- Una ecuación teórica ( $y=mx+b$ )  $IgM-HP=0.20343+0.19092(IgM-IF)$
- Una gráfica de residuales entre valores observados y esperados con una baja relación entre los títulos de IgM-HP e IgM-IF por lo que no existe correlación entre sí. (Gráfica VII)

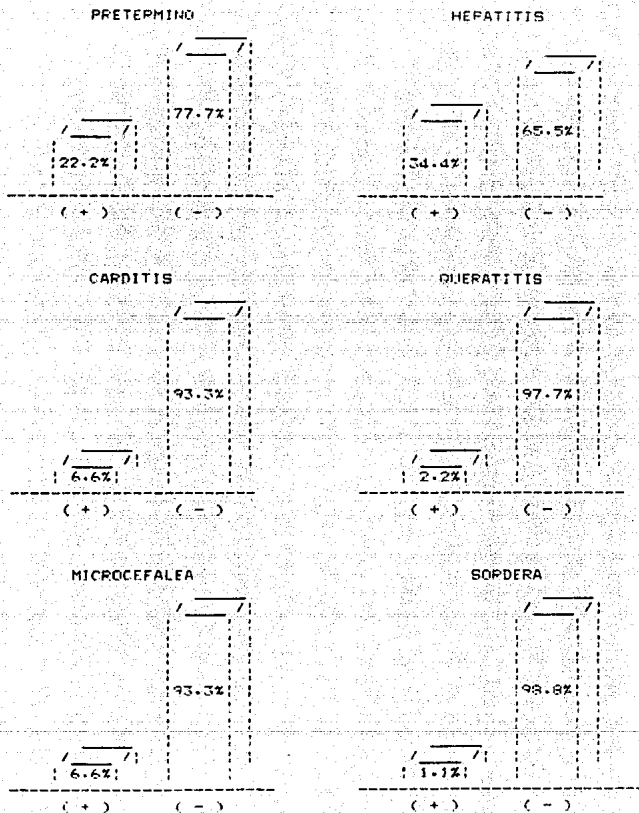
12.5 Para IgM-IF como variable dependiente se obtiene:

- Una correlación del 48.52 % por ambas técnicas para Ig M.
- Una ecuación teórica ( $y=mx+b$ )  $IgM-IF = -0.19674 + 2.54161(IgM-HP)$ .
- Una gráfica de residuales entre los valores observados y esperados con una baja relación entre los títulos de IgM-IF y los de IgM-HP por lo que no existe correlación entre sí. (Gráfica VIII).

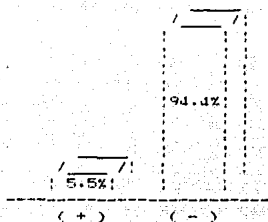
GRAFICA VIII



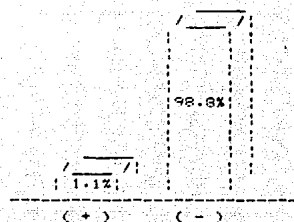
12.6 % de frecuencia de signos clínicos en pacientes con síndrome de TORCH, en donde Hepatitis ocupa el mayor porcentaje de aparición.



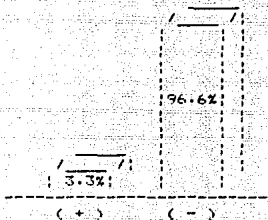
## DEFUNCIÓN



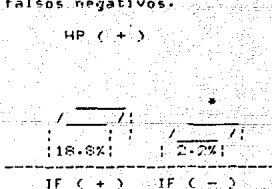
## ENCEFALITIS



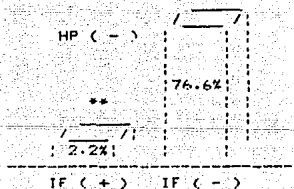
## ANTECEDENTES DE RUBÉOLA



12.7 Relación para los títulos de Ig M por HP e IF donde se aprecia que cuando HP resulta positivo e IF (-) obtenemos un porcentaje de falsos positivos y de manera inversa se obtienen los falsos negativos.

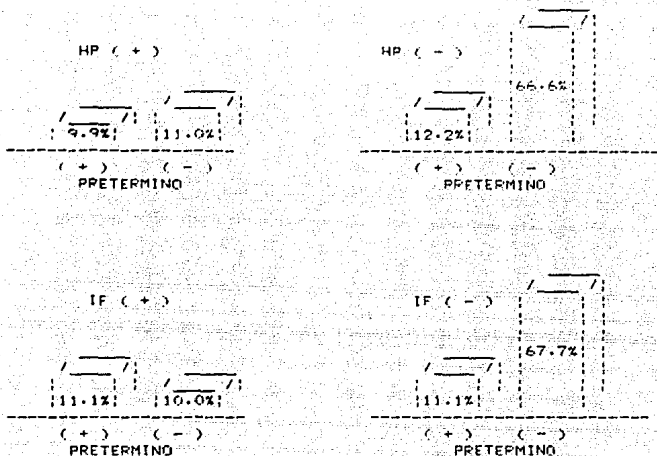


\* FALSOS POSITIVOS

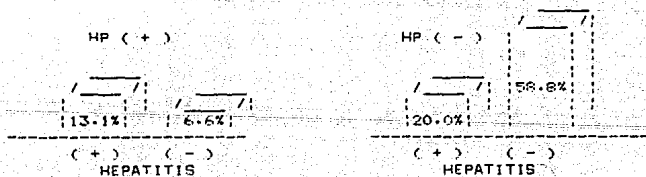


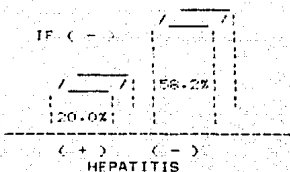
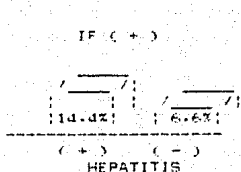
\*\* FALSOS NEGATIVOS

12.8 Relación del hallazgo de Ig M por HP e IF con signo clínico de PRETERMINO, donde la diferencia por ambas pruebas es mínima.

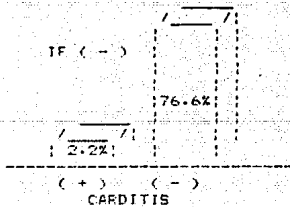
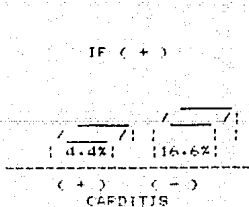
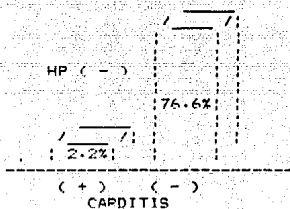
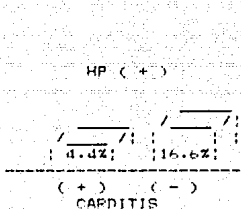


Relación del hallazgo de Ig M por HP e IF con el signo clínico de HEPATITIS, donde la diferencia por ambas técnicas es mínima, cuando ambas pruebas determinan Ig M positivo y el signo clínico está presente, en las determinaciones restantes los porcentajes son iguales.



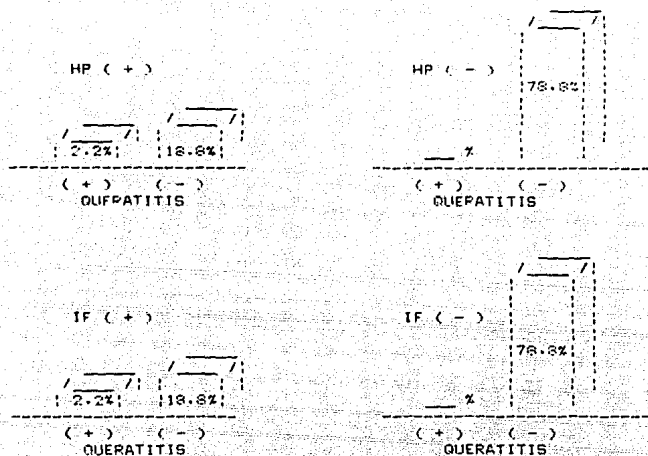


Relación del hallazgo de Ig M por HP e IF con el signo clínico de CARDITIS, el cual es un signo típico en rubéola congénita, así se observa que los porcentajes obtenidos son iguales.

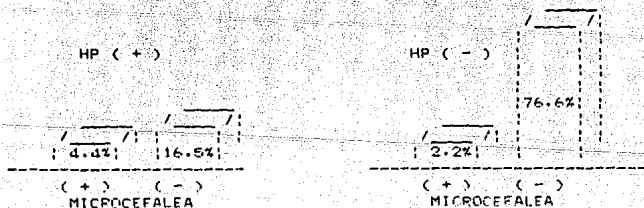


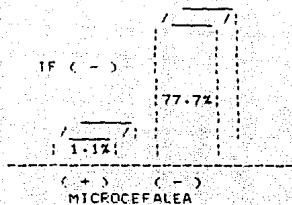
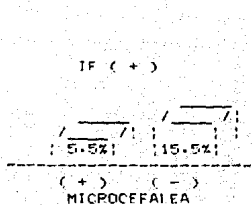


Relación del hallazgo de Ig M por HP e IF con el signo clínico de QUERATITIS, el cual es otro signo típico de rubéola congénita, en donde los porcentajes obtenidos son iguales.

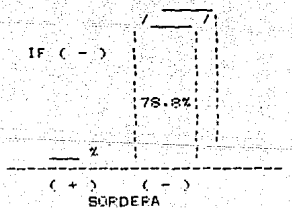
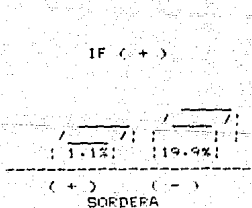
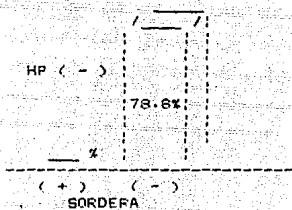
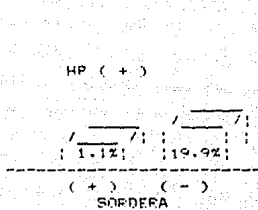


Relación del hallazgo de Ig M por HP e IF con el signo clínico de MICROCEFALEA, en donde se aprecia una diferencia mínima en los porcentajes por ambas técnicas.

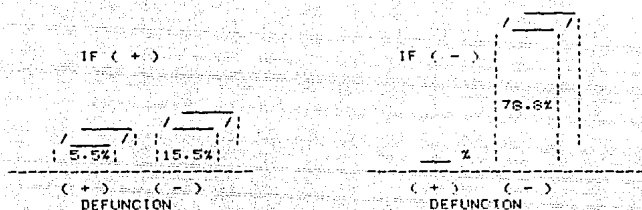
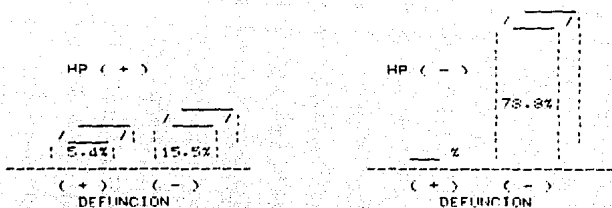




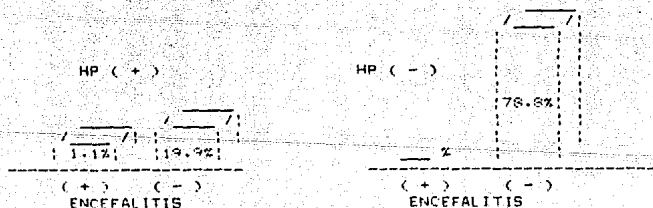
Relación del hallazgo de Ig M por HP e IF con el signo clínico de SORDEZA, el cual es otro signo típico de rubéola congénita, así se observa que los porcentajes obtenidos resultan iguales.

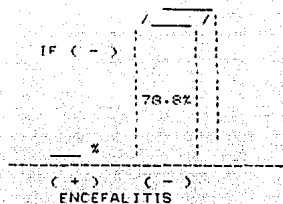
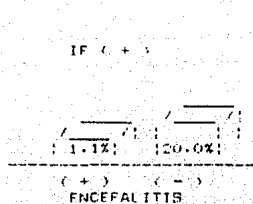


Relación del hallazgo de Ig M por HP e IF con el signo clínico de DEFUNCION, el cual no es un signo típico de rubéola congénita, aquí los porcentajes obtenidos fueron iguales.

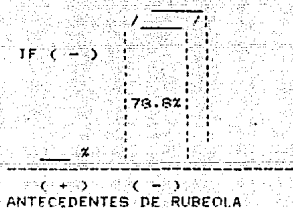
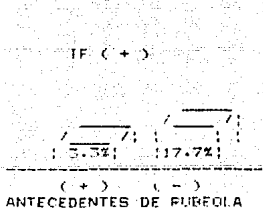
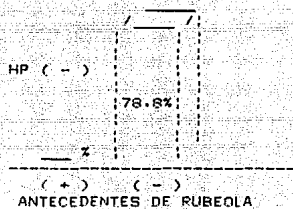
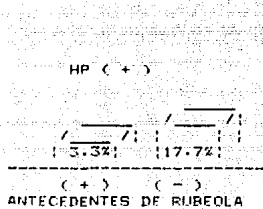


Relación del hallazgo de Ig M por HP e IF con el signo clínico de ENCEFALITIS, en donde se observa que la prueba por HP obtiene los mismos resultados que la prueba por IF.



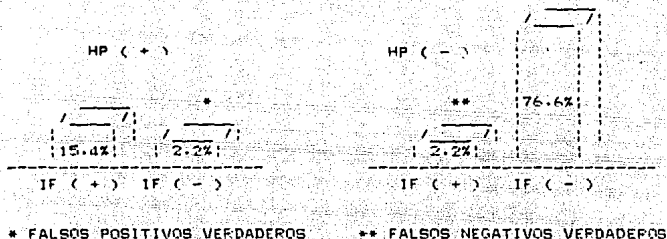


Relación del hallazgo de Ig M por HP e IF con el signo clínico de ANTECEDENTE DE RUBEOLA, en donde los resultados por ambas técnicas obtuvieron los mismos porcentajes.

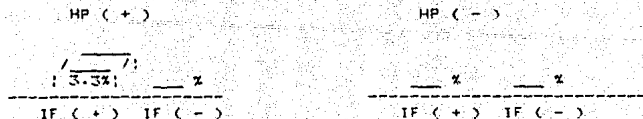


12.9 Pelación del hallazgo de Ig M por HP e IF con ANTECEDENTE DE RUBEOLA, en donde se obtienen porcentajes para falsos positivos y falsos negativos "verdaderos" es decir pasan por 2 factores ó un doble filtro. Así estadísticamente se obtiene que cuando ANTECEDENTES DE RUBEOLA es negativo la prueba funciona totalmente.

Antecedente de rubéola NEGATIVO



Antecedente de rubéola POSITIVO



Determinación de sensibilidad y especificidad de la prueba por HP

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{No (+)}}{\text{No (+) + F (-)}} \times 100 = \frac{17}{17 + 2} \times 100 = 89.47 \%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{No (-)}}{\text{No (-) + F (+)}} \times 100 = \frac{73}{73 + 2} \times 100 = 97.33 \%$$

### 17. DISCUSION

La detección de anticuerpos Ig M en los sueros de los 90 pacientes con síndrome de TORCH menores de un año mediante la técnica de IF alcanzó el 21.1 % de pacientes los cuales tuvieron anticuerpos dirigidos contra el virus de la rubéola; este porcentaje fué mayor aunque no con mucha diferencia que el % determinado por la técnica de hemaglutinación pasiva.

Dicho % aunque elevado puede ser considerado desde el punto de vista que los pacientes con síndrome de TORCH constituyen un centro de concentración para los casos de rubéola, ya que en otros estudios llevados a cabo en diferentes países, señalan el rango de infección de hasta 30 casos por 1 000 nacimientos vivos.

Generalmente en las pruebas de hemaglutinación para rubéola pueden participar tanto inmunoglobulinas Ig M como Ig G dependiendo del tipo de exposición primaria o secundaria, de tal forma que el título es indicativo de infección o memoria.

Esta prueba de hemaglutinación pasiva contempló la determinación de Ig M, ya que el tratamiento del suero con proteína A de Staphylococcus aureus Cowan I fija la fracción Fc de las inmunoglobulinas Ig G excepto la subclase Ig G3 de la cual solo adsorbe el 1.5 % de esta subclase y de Ig M únicamente el 2.5 % por lo que dichos porcentajes no afectaron de manera sensible la determinación por esta técnica. La cual obtuvo un porcentaje menor a la técnica de inmunofluorescencia que sirvió como referencia.

Para obtener una mejor visión del estado inmunológico del paciente, se determinó la presencia de Ig G tanto por IF como por HP, como se esperó el porcentaje de determinaciones por IF fue mayor que por HP señalando la diferencia de sensibilidades de las pruebas, aquí no fue necesario adsorber los sueros con proteína A de Staphylococcus aureus Cowan I

El % fue mayor para títulos de 1:64 por HP lo que constituyó memoria inmunológica o bien para pacientes menores de 12 semanas son los anticuerpos transmitidos por la madre.

El bajo % de títulos (>1:64) por HP para Ig G fue alrededor del 3% lo cual como en muchos otros estudios realizados señaló que existe entre pacientes con síndrome de rubéola congénita una pérdida más pronunciada de anticuerpos HAI a través del tiempo, en muchos casos alrededor del 5% que llegan a la seronegatividad, lo que no ocurre con las infecciones postnatales o en las madres de los niños afectados.

Aún existen otros estudios en los cuales existe un % apreciable de pacientes con síndrome de rubéola congénita y depresión sensible de Ig G .

Así se observó que aproximadamente el 68 % de los pacientes positivos muestran una edad que fluctúa hasta las 12 semanas de edad. Así que aunque el porcentaje por HP fue bajo, el porcentaje por IF apoya la transmisión maternal hacia el feto y/o la producción de dicha inmunoglobulina por infección intrauterina debido a rubéola, aunque cabe mencionar que resultaría bastante difícil si se tratase de este último caso, diferenciar o cuantificar por separado los Ig G producidos por el feto y los



transmitidos por la madre en el suero de estos pacientes.

De tal manera que al realizar o llevar a cabo un estudio para observar la correlación que existe entre los títulos de Ig G determinada por HP e Ig G determinada por IF, se obtuvo una correlación del 26.62% teniendo como variable dependiente Ig G por HP, el cual constituyó un % bajo estadísticamente para su significado.

Así mismo al realizar una gráfica de residuales para observar la correlación que existe entre Ig G por HP e Ig G por IF, se observó que entre los valores no existe equivalencia significativa para dichos títulos.

De aquí que el fenómeno se comportó de igual manera al observar la correlación entre ambas, pero como variable dependiente Ig G - IF es decir, existió el mismo % de correlación de 26.62% y al igual no existe equivalencia significativa entre el fenómeno esperado y el fenómeno obtenido.

De esta misma manera se realizó un estudio para observar el grado de correlación que existe entre los títulos de Ig M por HP y los títulos de Ig M por IF teniendo tanto a Ig M por HP como variable dependiente, como a Ig M por IF, obteniendo de ambas una correlación del 48.52% que continua constituyendo un porcentaje bajo para señalar la correlación entre los títulos por ambas técnicas; al realizar así las gráficas de residuales que se esperó obtener de la equivalencia entre ambas técnicas para IgM, se observó que dicha relación no fue estadísticamente significativa.

En cuanto a padecimientos o signos clínicos en los

pacientes, figura el de Pretérmino que alcanzó el 22.2% y que en muchos estudios figura como uno de los signos que se presenta con frecuencia junto con el bajo peso al nacimiento, dado que como es sabido el virus al infectar al feto en los primeros estadios del embarazo, perturba la embriogénesis dando origen a diferentes afecciones, de las cuales la más común es la inhibición de la mitosis originada por un incremento en la ruptura cromosómica en las células infectadas que trae consigo un menor número de células en diferentes órganos del producto. De igual manera la hepatitis que alcanzó el 34.4% y cuya participación no ha sido notada solamente en niños con rubéola congénita sino en niños con infección postnatal, en estos últimos en menor proporción que en los infectados "in utero", por la infección generalizada que se da durante la gestación. Además a menudo en la infección postnatal el agente etiológico no está relacionado con rubéola, por ser considerada como una enfermedad autolimitante de tipo benigno, que solo en muy pocos casos requiere un escrutinio médico a fondo.

Para los casos de carditis el % encontrado fué del 6.6%, para queratitis el 2.2% y sordera el 1.1% lo que se ha dado a llamar la triada de la rubéola ya que son las 3 anomalías típicas para los pacientes con rubéola congénita.

Las cataratas se presentaron en forma unilateral, además de estos signos típicos se encontró para los pacientes con Ig M (+) por IF otros como defunción que alcanzó un 5.5% así como microcefalia de 6.6% y encefalitis de 1.1%; en cuanto a los antecedentes en la madre de posible contacto con rubéola se obtuvo una respuesta positiva del 3.3%, sin embargo no se puede descartar la idea de que algunas madres hayan cursado con

infección asintomática o subclínica, cuyos reportes no mencionan infección y que al igual que otros estudios se ha demostrado que conducen a la infección fetal.

Para evaluar nuestra prueba fue comparada con la técnica de IF de tal manera que, no existió gran variación en cuanto a la detección de títulos positivos, así para Ig M positiva por HP e Ig M positiva por IF se encontró un 18.8%, y en cuanto a la determinación negativa para la misma inmunoglobulina por ambas técnicas correlacionaron hasta en un 76.6%, por otro lado se encontró que un 2.2% de las muestras tenían una determinación negativa por HP para Ig M, pero positiva por IF por lo cual se considera como falso negativo, así siguiendo la misma referencia obtuvimos un 2.2% de muestras por HP positivo para Ig M y por IF negativo, de tal manera que este % lo consideramos como falsos positivos.

Para observar la relación que guardan los signos clínicos con los resultados de Ig M, se relacionaron ambas por separado, de tal manera que para Pretérmino su relación con la prueba de IF arrojó un 11.1% de pacientes positivos, así como un restante 67.7% de negativos, pero existieron casos en que la prueba IF resultó negativa y tuvo signo clínico positivo que alcanzó un 11.1%, esto puede tomarse como producto de otra causa, anomalía o enfermedad diferente de rubeola congénita ya que dicho signo no es exclusivo; así se encontró que el resultado fue (+) y el signo clínico fue negativo alcanzando un 10%, lo cual como en muchos otros signos clínicos puede o no aparecer, señalando así un % aproximado de frecuencia.

Comparando la prueba de HP, se obtuvo en cuanto a los resultados positivos, que HP fue menor que IF ya que alcanza 9.9% y en cuanto a los resultados (-) detecta menor % teniendo solo el 66.6%, así para los pacientes con HP (-) y signo clínico (+) alcanzó un mayor % que IF, lo cual podría ser reflejo de sensibilidad, la que independientemente de esto se puede atribuir otra causa al pretérmino. En cuanto a los pacientes con HP (+) y pretérmino (-), señala como se dijo, el % de frecuencia del signo clínico en la enfermedad así como la sensibilidad de la prueba que fue menor alcanzando el 11%.

De igual manera para hepatitis; como en el signo anterior se observó un valor positivo un poco más alto por IF que por HP, aún cuando todos los otros aspectos permanecieron casi iguales, pero este signo constituyó el % de mayor frecuencia en los pacientes. En lo que toca a carditis, queratitis, microcefalea, defunción, sordera, encefalitis y antecedentes de rubéola, todos tuvieron porcentajes similares por ambas técnicas y con la misma interpretación.

En un estudio referente al signo clínico de antecedente de rubéola durante el embarazo relacionándolo con el resultado de IF y HP al mismo tiempo, se observó que cuando no existen antecedentes de rubéola existe una positividad para ambas pruebas del 15.4% y una negatividad del 76.6%, pero para HP (+) e IF (-) existe un 2.2% el cual se considera como un falso positivo verdadero, así como para HP (-) e IF (+) constituyen un falso negativo verdadero, es decir ambos se constituyen después de pasar por un "doble filtro".

En cuanto se determina antecedente de rubéola positivo, las cosas cambian y se tiene que el % de positividad de HP con IF alcanza el 100%, no existen falsos (+) ó (-), ni determinaciones negativas, de tal manera que determinando rubéola en el embarazo, la prueba es estadísticamente confiable.

Aunque existe la misma proporción para carditis, queratitis, sordera, encefalitis, y defunción, pensamos que ya que estos pueden ser ocasionados por algún otro agente y no ser exclusivos de rubéola, el signo de antecedente de rubéola puede ser el más confiable, que una vez determinado puede seguir el razonamiento antes expuesto para la determinación por HP.

#### 14. CONCLUSIONES :

Como los resultados demostraron existe un mayor % de resultados positivos, para ambas inmunoglobulinas Ig G e Ig M por IF sobre HP. Dicha referencia puede deberse como se ha señalado a que existe una disminución de anticuerpos HA más aguda en los pacientes con síndrome de rubéola congénita que en sus madres o en los controles, así lo demuestran varias teorías; entre otros estudios, recientes sobre el virión de la rubéola señalan una glicoproteína de la envoltura llamada E1 que se cree contiene la principal actividad hemaglutinante, por lo cual una disminución en dicha proteína o un aumento en las restantes (E2 y NC) origina una disminución en los títulos del paciente.

Aunque no existió para la determinación de Ig M una gran diferencia por ambas técnicas. Los resultados obtenidos por HP para Ig M mediante la adsorción de Ig G del suero con proteína A de Staphylococcus aureus Cowan I señalan una sensibilidad (89.4%) y una especificidad (97.3%) aceptables. Cabe decir que los pacientes muestreados tenían un perfil de TORCH por lo que puede explicarse el porcentaje elevado para rubéola, como resultado del factor de concentración que ejerce dicho síndrome. Se observó de igual manera que aproximadamente el 68 % de los pacientes positivos tuvo una edad de hasta 12 semanas de vida, el porcentaje restante lo constituyen pacientes con edad mayor a 12 semanas y menor a 12 meses en estos debido a los signos clínicos asociados ya sea típicos o que acompañan con menor regularidad a rubéola congénita y aunado a hallazgos de Ig M contra rubéola, son altamente significativos de infección prenatal, aunque no

puede descartarse la posibilidad de infección postnatal para estos casos.

Para ambas inmunoglobulinas es decir Ig G por IF y por HP, e Ig M por IF y por HP no se encontró en ambas después de un estudio estadístico, una correlación estadísticamente aceptable ( >95% ) ya que solo alcanzó para Ig G el 26.62% y para Ig M el 48.52% . Por lo cual no existe correlación entre los títulos para ambas inmunoglobulinas .

En cuanto a los signos clínicos de rubéola, la hepatitis constituyó el mayor % entre los pacientes positivos alcanzando el 34.4% seguido por el signo de pretermino que alcanzó el 22.2%. Así como un signo importante fue encontrado el de defunción que alcanzó el 5.5% . En cuanto a los signos típicos de rubéola, los cuáles se han dado a llamar la triada de rubéola, problemas cardiovasculares, cataratas y sordera, alcanzaron un % de 6.6%, 2.2% y 1.1% respectivamente, aunque dichos %'s son inferiores a otros estudios realizados en otros países, aquí un factor importante fue, que dichos pacientes fueron seguidos después del nacimiento hasta la edad de 1 año, es decir, los productos no fueron observados desde el embarazo por lo cual pudieron o no haber tenido infección por rubéola, o bien las madres pudieron haber padecido rubéola subclínica, en cualquier caso se desconoce la edad gestacional a la cual fue infectado el feto si hubo infección, y esto invariablemente influye en la aparición de defectos típicos o que acompañan con menos regularidad a rubéola congénita .

Los porcentajes obtenidos de la relación entre los signos

clínicos y la prueba de HP en su mayoría se relacionan en cuanto a sus resultados comparados con la prueba patrón de IF, lo cual muestra una buena especificidad y sensibilidad de la prueba por HP, excepto para Pratermino, Hepatitis, Microcefalea en los cuales la diferencia es mínima.

Aun relacionando ambas pruebas con los signos clínicos se encontró estadísticamente hablando de acuerdo a los resultados obtenidos, que cuando se confirma antecedentes de rubéola durante el embarazo, la relación entre ambas técnicas es del 100%, es decir, la prueba de HP funciona en su totalidad.

Aunque existe similar relación entre otros signos invariablemente, éstos últimos pueden ser originados por otras causas no siendo exclusivas, mientras el determinar antecedente de rubéola si es exclusivo de dicho padecimiento.

La determinación de Ig M contra rubéola, es un factor importante para el diagnóstico de rubéola congénita en fetos o pacientes recién nacidos, los cuales generalmente no alcanzan la madurez de su sistema inmune hasta después de los 12 meses. Esta prueba de hemaglutinación pasiva puede ser útil, ya que estructurada mediante la ayuda de proteína A de Staphylococcus aureus Cowan I para adsorber IgG y dejar reaccionar en nuestro sistema Ig M específica contra rubéola se convierte en una prueba más sensible que puede ser comparada con una técnica como IF.



Así concluimos que esta técnica de HP determina hasta en un 90% los sueros positivos para Ig M contra rubéola y dado que dicha prueba presenta una ventaja en cuanto a tiempo de ensayo y costo, con la sensibilidad y especificidad antes señaladas constituye una buena alternativa para la determinación de rubéola congénita, la cual puede ser implementada en laboratorios con bajos recursos económicos o en poblaciones donde una prueba por IF no puede ser llevada a cabo.

10. PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES :

Se recomienda un estudio con seguimiento desde la infección durante el embarazo hasta 2 años después del nacimiento con apoyo médico y con la participación de esta técnica (HP) llevarían a un resultado conjunto y complementario que originaría un mayor alcance y comprensión del tema y muy posiblemente cubriría bastantes diagnósticos en recién nacidos los cuales son debidos a infección "in utero" y que se reportan como de etiología desconocida.

Aunque existe falta de correlación en cuanto a títulos y no en cuanto al resultado en el presente estudio, proponemos realizar estudios para determinar si no existe cruce antigénico del virus de la rubéola con otros virus aunque se dice que solo hay un tipo serológico; y que en caso de existir cruce podría disminuir los casos de determinaciones erróneas o falsos positivos.

Debido a que los títulos que se obtuvieron para correlacionar inmunoglobulina Ig M contra rubéola que en fetos o en recién nacidos es indicativo de infección congénita, resultaron bajos por ambas técnicas, proponemos realizar dichas determinaciones fragmentando a Ig M con 2-mercaptoetanol o algún otro agente para obtener Ig M monomérica de tal suerte que los títulos se incrementen, la correlación por ambas técnicas sea más significativa originando así una analogía cuantitativa con la prueba de I.F.

16. ANEXOS:

Preparación de:

CAM

- Albumina bovina 0.25 %
- Agua destilada 250 ml

===== Aforar a un litro con aulleta =====

AULLETA

- Cloruro de sodio 0.9 g
- Cloruro de calcio(anhidro) 0.1 g
- Mg SO<sub>4</sub> . 7 H<sub>2</sub>O 0.1 g
- Agua destilada c.b.p. 1 000 ml

P.B.S.

- NaCl 8.0 g
- KCl 0.2 g
- Na HPO<sub>4</sub> 1.15 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g
- Agua destilada c.b.p. 1 000 ml

S.S.I.

- NaCl 0.85 g
- Agua destilada c.b.p. 100 ml

Staphylococcus aureus Cowan I

I: PFACTIVOS:

A - Método de cultivo

Este medio esta basado en la modificación de Woodin de el "medio CCY" descrito por Gladstone y Van Heyningen.

- Caseina hidrolizada	40 g
- Extracto de levadura	10 g
- R-glicerofosfato disódico	20 g
- Lactato de sodio (40 %)	12.5 ml
- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.51 g
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4 g
- (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0 g
- dl-Triptofano	0.08 g
- l-Cistina	0.1 g
- Agua destilada	1 000 ml

Autoclave a 20 lbs. por 15'

B - Solución Stock de vitamina

- Tiamina	20 mg
- Niacina	40 mg
- Agua destilada	100 ml

Esterilizado por filtración a través de filtro 0.2 m.

C - Solución Stock de elementos "traza"

- $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.2 g
- $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$	0.1 g
- $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.05 g
- Acido cítrico	0.05 g
- Agua destilada	100 ml

Autoclave a 20 lbs. por 15'

II - Técnica de cultivo.

Día 1: Siembre Staphylococcus aureus Cowan I. (Productor de proteína A) o Wood 46 (Proteína A negativo) sobre un agar inclinado. Incube toda la noche a 37 C.

Día 2: Adicione 2 ml de cada una de las soluciones B y C a 16 ml de solución A. Incube la bacteria en esta solución. Incube a 37 C toda la noche.

Día 3: Transfiera el caldo de los cultivos (de toda la noche) de Staph a 1 lt. completo de medio conteniendo 1 gota de polipropilén-glicol para prevenir espuma. Incube el matraz a 37 C por 20-24 hrs. en un agitador magnético.

III - Preparación de la suspensión bacteriana:

- A - Alicuotas de caldo de cultivo en 4 de 250 ml tubos de centrifuga.
- B - Centrifuge a 2 000 rpm por 20'.
- C - Decante el sobrenadante -descartelo-.
- D - Adicione 10 veces el volúmen del botón de PBS, mezcle cerca

de 200 y reentrifuge por 10' a 2 000 rpm

- F - Repita el lavado como en el paso D.
- F - A el botón adicione 1.5 % de formaldehido en PBS una parte de bacteria a 9 partes de PBS-HCHO.
- G - Incube a temperatura ambiente en una agitador magnético por 1 1/2 hr.
- H - Repita el lavado de los pasos B a E.
- I - Suspenda el botón después del último lavado en pbs. La suspensión bacteriana debere estar al 10 %.
- J - Vacie la suspensión en un matraz tal que esta forme una capa delgada (menor que 1.5 cm) en el fondo del matraz.
- K - Agite el matraz en un baño a 60 C de agua por 5'-10'. Inmediatamente transfiera el matraz a un baño de hielo y agite de 5'-10'.
- L - Lave el botón bacteriano 3 veces como se describió arriba.
- M - Guarde a 10 C como una suspensión al 10 % en PBS conteniendo 0.1 % de azida de sodio.

## 17. BIBLIOGRAFIA

- 1 - Hanshaw B.J; Dudgeon A.J; Viral diseases of the fetus and newborn. 2a edition. Edit: W.B. Saunders Company. Philadelphia, 1985.
- 2 - Dudgeon J.A; Congenital rubella. Amer J Dis Child 1969; 118: 35-42.
- 3 - Ukkonen P; Bonsdorff C.H; Rubella immunity and morbidity: Effects of vaccination in Finland. Scand J Infect Dis 1988; 20: 255-259.
- 4 - Peltola H; Heinonen G.P; Karanko V; Valle M; Five-Year Experience in elimination of indigenous measles, mumps and rubella in Finland. 179 Program and abstracts of the Twenty-ninth Interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy. American society for microbiology. Houston Texas. 17-20 September 1989.
- 5 - Kaplan M.M; Cochi S.L; Edmonds L.R; Targeting rubella immunization strategies. 405 Program and abstracts of the twenty-eight Interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy. American society for microbiology. Los Angeles, California. 25-26, October 1988.
- 6 - Jimenez B.E; Salamanca G.F; Martinez S; Bracho S.M; Estudio de malformaciones congénitas en 105,825 nacimientos consecutivos. Bol Med Hosp Infant Mex. 1985;42: 744-747.
- 7 - Best J.M; Welch J.M; Baker D.A; Banatvala J.E; Maternal rubella at St. Thomas hospital in 1978 and 1986; Support for augmenting the rubella vaccination programme. Lancet 1987; ii: 88-90

- 8 - Lennette H.E; Schmidt J.N; Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infection. 5a edition. Edit: American public health association. Washington D.C. 1979.
- 9 - Barrous J; Hiero F.R; Leono P; Casademont P.M; Hepatitis rubéolica: descripción de un caso clínico. Arch Pediat 1987; 78:359-362.
- 10 - Sugaya N; Nirasawa M; et al. Hepatitis in acquired rubella infection in children. Amer J Dis Child 1988; 142:817-818.
- 11 - Burmovici E; Weiss E.E; Cooper L.Z; Interferon production in lymphocyte cultures after rubella infection in humans. J Infect Dis 135:380-385, 1977.
- 12 - Enders G; Pacher H.N; Miller E; Watson J.C; Outcome of confirmed periconceptional maternal rubella. Lancet 1988; i:1445-1446.
- 13 - Thanopoulos B.D; Pokas S; Frimas C.A; Mantagos S.P; Renatis N.G; Cardiac involvement in postnatal rubella. Acta Paediatr Scand 1989; 78: 141-144.
- 14 - Singer D.B; South M.A; Montgomery J.P; Fawls W.E; Congenital rubella syndrome. Amer J Dis Child 1969 ; 118: 54-61.
- 15 - Munro N.D; Sheppard S; Smithells P.W; Hozel H; Hones G; Temporal relation between maternal rubella and congenital defects. Lancet 1987; ii:201-204.
- 16 - Burmovici E; Lang P.B; Ziring P.P; Cooper L.Z; Impaired cell mediated immune response in patients with congenital rubella: correlation with gestational age at time of infection. Pediatrics 1979; 64:620-626.



- 17 - Hancock M.P; Huntley C.C; Sever J.L; Congenital rubella syndrome with immunoglobulin disorder. J Pediat 72 : 634-645 , 1968.
- 18 - White L.R; Leikin S; Villavicencio O; Abernathy W; Avery G; Sever J.L; Immune competence in congenital rubella: Lymphocyte transformation , delayed hipersensitivity, and response to vaccination. J Pediat 73: 229-234,1968.
- 19 - Ueda K; Tokogawa K; Fikushige J; Yoshikawa H; Nonaka S; Hemagglutination inhibition antibodies in congenital rubella syndrome . Amer J Dis Child 1987; 141:211-212.
- 20 - Hancock E.J; Pot K; Puterman M.L; Tingle A.J; Lack of association between titres of HAI antibody and whole virus ELISA values for patients with congenital rubella syndrome. J Infect Dis 1986; 154:1031-1032.
- 21 - Hardy B.J; Saver J.L; Gilkenson M.R; Declining antibody titres in children with congenital rubella. J Pediat 75: 213-219,1969.
- 22 - Grangeot L; Pillot J; Daffos F; Forestier F; Prenatal and post-natal production of Ig M and Ig A antibodies to rubella virus studied by antibody capture immunoassay. J Infect Dis Child 1988,153:138-142.
- 23 - Fitzgerald M.G; Pullen G.R; Hosking C.S; Low affinity antibody to rubella antigen in patients after rubella infection in utero. Pediatrics 1968;81:812-814.
- 24 - Cooper L.Z; Florman A.L; Ziring P.R; Saul Krugman. Loss of rubella hemagglutination inhibition antibody congenital rubella. Amer J Dis Child 1971;122:397-403

- 25 - Boue A; Boue J.G; Effects of rubella virus infection on the division of human cells.  
Amer J Dis Child 1969;118:45-48.
- 26 - Driscoll S.G; Histopathology of gestational rubella.  
Amer J Dis Child 1969;49-53.
- 27 - Morgan P; Capner; Thomas H.J; Serological distinction between primary rubella and reinfection.  
Lancet 1988; i:1397.
- 28 - Cruysberg J.N; Presumed congenital rubella syndrome : virus embryopathy or hereditary disease.  
Lancet 1988 i:529.
- 29 - Sheppard S; Wild N.J; Smithells R.W; Hosel H; Jones G; Onset and severity of hearing loss due to congenital rubella infection. Arch Dis Child 1989;64:1280-1283.
- 30 - Hosking C.S; Pyman C; Wilkins B; The nerve deaf child- intrauterine rubella or not ?  
Arch Dis Child. 1983; 58:327-329
- 31 - Schlesinger S; Schlesinger N.J; The togaviridae and flaviviridae. School of medicine; University.  
New York 1986.
- 32 - Schmidt N.J; Dennis J; Lennette E.A; 1971 . Rubella virus hemagglutination with a wide variety of erythrocyte species.  
Appl. Microbiol;22:469-470.
- 33 - Roberts P.C; Hobbs S.J; Evaluation of a new test system for rubella hemagglutination-inhibiting antibodies.  
J Clin Pathol 1977;30:1011-1014.

- 34 - Suni J; Vaheri A; Rubella specific Ig M determination of heat treated sera. Scand J Infect Dis 1986;18:379.
- 35 - Schmidt N; Dennis J; 1972 Modified hemagglutination inhibition test for rubella employing human group "O" erythrocytes. Appl Microbiol 23:471-475.
- 36 - Quirin E.P; Nelson D.B; Inhorn S.L; 1972 Use of trypsin modified human erythrocytes in rubella hemagglutination inhibition testing. Appl Microbiol 24:353-357.
- 37 - Auletta A.E; Geenick G.L; Whitmire C.E; Sever J.L; 1968 An improved diluent for rubella hemagglutination and hemagglutination inhibition tests. Appl Microbiol 16:691-694.
- 38 - Ankers J; Christensen P; Kjellen L; Kronval G; A routine diagnostic for Ig A and Ig M antibodies to rubella virus: Absorption of Ig G with Staphylococcus aureus J Infect Dis 1974;130:268-272.
- 39 - Margini R;  
 Immunoglogia e Inmunoquimica  
 3a. Edición - Edit; Panamericana  
 Buenos Aires ,1982.
- 40 - Deforest A; Long S.S; Lischner H.W; Jirone J.A; Clark J.L; Ranganathan S. et al. Simultaneous administration of measles, mumps, rubella vaccine with booster doses of diphtheria, tetanus, pertussis and poliovirus vaccines. Pediatrics 1988; 81:237-245.
- 41 - Miller E; Miller C; Regg N; Measles, Mumps and Rubella vaccine coverage. Lancet 1989; i:271-272.

- 42 - Drabu Y.J; Walsh B; Hoher T.J; Shclesinger P; Vijerathnam S; Hicks L; Maternal rubella: one problem in diagnosis and another in prevention. Lancet 1987; 11:561-562
- 43 - Juntunen K; Backman; Heikki P; Alf B; Osmo P.S; Safe immunization of allergic children against measles, mumps and rubella. Amer J Dis Child 1987 ; 141:1103-1105.