



30
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ANTICUERPOS CONTRA CITOMEGALOVIRUS
POR EL METODO DE FIJACION
DE COMPLEMENTO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
EMMA VICTORIA AVILES SOSA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

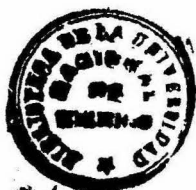
DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CLAS: Tesis
ADG: 1975
FECHA: 1975
PROC: MIC 30



QUINTO:

A MIS PADRES

CON PROFUNDO CARIÑO Y GRATITUD
POR SU GRAN ESFUERZO

A MIS QUERIDOS HERMANOS
JORGE Y ARTURO

CON VENERACION Y RESPETO
PARA MIS ABUELITOS PORFI
RIO, ESTHER Y FELIPE

A MI ASESOR DE TESIS DR. SALVADOR MARTIN SOSA POR SU ENTUSIASMO Y AYUDA EN LA ELABORACION DE ESTA TESIS.

A MIS MAESTROS POR SUS -
SABIAS ENSEÑANZAS

A MIS COMPAÑEROS -
DE TRABAJO POR SU
AYUDA Y SINCERA --
AMISTAD.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL
TEMA:

Presidente	Profra. Q.F.B. Magdalena Acosta S.
Vocal	Profra. Q.F.B. Carmen Reyna B.
Secretario	Prof. DR. Salvador Martín S.
1er. Suplente	Profra. Q.F.B. Ernestina Ballesteros R
2o. Suplente	Profra. Q.F.B. Socorro Cao Romero M

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO DE VIROLOGIA DEL HOSPITAL DEL
NIÑO

I. M. A. N.

NOMBRE DEL SUSTENTANTE:

EMMA VICTORIA AVILES SOSA

NOMBRE DEL ASESOR DEL TEMA:

DR. SALVADOR MARTIN SOSA

INDICE	Pag.
INTRODUCCION	1
CAPITULO I GENERALIDADES	
A) ANTECEDENTES HISTORICOS	3
B) CARACTERISTICAS DEL CMV	
Clasificación	5
Morfología	7
Composición bioquímica	8
Efecto de los agentes físicos y químicos	8
Crecimiento en cultivos de tejido	9
Características antigénicas	11
C) MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA INFECCION. INFECCION CON- GENITA Y ADQUIRIDA	
Infección congénita o neonatal	14
Infección adquirida o post-natal	19
Transmisión y patogenia	22
D) RESPUESTA INMUNOLOGICA	24
E) EPIDEMIOLOGIA Y CONTROL	28
F) TECNICAS SEROLOGICAS PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS	
Seroneutralización	33
Detección de anticuerpos por fluorescencia	35

	Pag.
Generalidades sobre la técnica de Fijación de Complemento	37
CAPITULO II MATERIAL Y METODOS	45
1.- Reactivos	45
2.- Preparación de material para - la prueba	50
3.- Metodología	50
4.- Material biológico	71
CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSION	72
CAPITULO IV CONCLUSIONES	79
BIBLIOGRAFIA	81

INTRODUCCION

Se sabe desde hace muchos años que los niños pueden ser infectados por un agente que produce inclusiones basofílicas en el núcleo y citoplasma de las células epiteliales de las glándulas salivales y de algunos órganos.

Las células afectadas se encuentran aumentadas de tamaño, de aquí el término "enfermedad de inclusión citomegálica". Suelen encontrarse inclusiones similares en células de las glándulas salivales de muchos otros animales normales cuando son examinados post-mortem. Por ejemplo, en cobayos, hamsters, ratones, borregos, cerdos, perros, monos, topos y chimpancés.

La infección en el hombre se presenta por lo menos en dos formas, clínica y patológicamente distantes.

a) La primera es la forma localizada, en la cual las inclusiones se encuentran solamente en las glándulas salivales. El virus causante de este tipo de infección, la cual ocurre también en animales, ha sido conocido como el "virus de las glándulas salivales".

b) La segunda forma de infección, en la cual se encuentran también células e inclusiones citomegálicas, es la forma diseminada, también conocida como enfermedad de inclusión citomegálica generalizada.

Durante largo tiempo se avanzó poco en el estudio de los virus asociados con cambios citomegálicos, hasta que de 1956 en adelante algunos investigadores lograron multiplicar cepas en cultivos celulares, especialmente de fibroblastos humanos.

Los agentes asociados con inclusión citomegálica en el hombre y en animales, están clasificados como miembros del grupo Herpes, y los virus causantes de esta infección son denominados actualmente citomegalovirus (CMV) o virus de inclusión citomegálica.

El descubrimiento por Weller y Hanshaw — de que este virus tiene actividad teratogénica ha despertado un interés considerable en el estudio de sus características patogénicas y epidemiológicas.

Diversos estudios serológicos y seroepidemiológicos sobre este problema han sido realizados en diferentes países incluyendo los de Golubjatnikov en México, pero desconocemos la magnitud del problema en grupos humanos de características disímiles, expuestas a condiciones ecológicas diferentes, de ahí que se considere necesario realizar estudios que nos permitan conocer la realidad epidemiológica de esta enfermedad. Este trabajo está orientado a contribuir al conocimiento de la seroepidemiología de la enfermedad producida por el virus de inclusión citomegálica.

CAPITULO I

GENERALIDADES

A) ANTECEDENTES HISTORICOS

A Von Glahn y Pappenheimer 1925, se debe el primer reporte de células citomegálicas en un adulto. Cole y Kuttner en 1926 demostraron que un virus filtrable era el responsable de la citomegalia en las glándulas salivales de cobayos.

Kuttner y otros, establecieron subsecuentemente que algunos agentes similares podían recuperarse de otros roedores, pero que eran específicos.

Andrewes en 1930 inició los estudios en cultivos de tejidos y observó cuerpos de inclusión en cultivos de tejidos de cuy inoculados con virus de esta especie. Sin embargo, los cultivos seriados de CMV fueron realizados por Smith en 1954. EL CMV del hombre no pudo ser manipulado en el laboratorio, hasta que Smith en 1956, Rowe y col. en 1956, y Weller y col. en 1957, lograron propagarlo en cultivos de células humanas. Las diferentes cepas fueron aisladas de las glándulas salivales, adenoides y vísceras, por Rowe y col, por Smith en 1956 separadamente, y por Weller en 1957.

Durante más de 50 años la valoración del papel patógeno del CMV en el hombre se basó en —

material post-mortem. En algunas autopsias de niños se encontraron evidencias de enfermedad generalizada (en 1-2%) y también se encontraron células citomegálicas en aproximadamente un 10% de glándulas salivales de niños que habían muerto por causas diversas, (Farber y Wolbach, 1932, Seifert y Dehme, 1957). En 1952 Fetterman diagnosticó la " enfermedad de inclusión citomegálica " antes de la muerte del enfermo, demostrando la presencia de células características en la orina. La forma generalizada de la infección se consideraba fatal, hasta que Margileth en 1955, usando técnicas de citología exfoliativa, observó que algunos niños pueden sobrevivir a la infección neonatal.

Poco después fueron desarrolladas técnicas adecuadas para la recuperación del virus y para estudios serológicos. La viruria y la excreción salival del virus en niños infectados, fueron demostrados por Weller y col. en 1957, y por Rowe y col. en 1958. Más recientemente ha sido posible demostrar que este virus está ampliamente diseminado en la población, así como su potencial teratogénico.

B) CARACTERISTICAS DEL CMV

CLASIFICACION

El grupo herpesvirus fue oficialmente propuesto en 1954 por Andrewes para incluir solamente a los virus de herpes simple, herpes simiano, pseudorabia, virus III y varicela-zoster. Más tarde, en el grupo NITA fueron clasificados aquellos virus que producen inclusiones nucleares tipo A (Andrewes 1961), como los virus de la rinotraqueitis bovina, rinotraqueitis felina, laringotraqueitis infecciosa y el de inclusión citomegálica (CMV).

En 1965, el Comité Provisional para la Nomenclatura de los Virus clasificó a los CMV en la familia Herpesviridae, la cual está compuesta por dos géneros: el género Herpesvirus y el género Citomegalovirus. Esta nomenclatura da reconocimiento a la similitud entre herpesvirus y citomegalovirus, como se ve por su ácido desoxiribonucleico (ADN), simetría icosaédrica, presencia de una envoltura sensible al éter y número de capsómeros (162).

MORFOLOGIA

Morfológicamente, el CMV es un miembro típico del grupo - Herpes, muy similar a los de herpes simple o de varicela-zoster.

Los estudios más informativos sobre la morfología del CMV provienen del trabajo con cultivos celulares examinados al microscopio electrónico y tinción negativa.

Por los estudios anteriormente citados se ha visto:

- a).- Que los viriones de CMV constan de tres partes principales: envoltura, cápside y nucleóide.
- b).- Que los viriones son de apariencia y tamaño uniforme, de simetría icosaédrica.
- c).- Que muchas células tienen inclusiones intranucleares e intracitoplásmicas características de una infección por CMV humano.

Según Wright y col. sus componentes tienen las medidas y características siguientes:

CUADRO No. 2

COMPONENTE	PARAMETRO	RANGO (en nm).	No. DE DE TERMINACIONES.	PRO-ME-DIO.
Nucleoide Cápside	Diámetro	65 - 83	100	75
	Diámetro	81 - 120	117	96
	Espesor	37 - 58	50	46
Capsómeros (de forma tubular)	Diámetro	7.5 - 13	87	9.4
	Longitud	11 - 14	38	13.5
	Halo axial	—	—	1.7
	Espacio entre capsómeros	—	—	3.6
	Diámetro	130 - 270	10	180
	Dimensión o espesor de la membrana.	—	—	12

COMPOSICION BIOQUIMICA

El genoma del CMV es ADN, lo cual ha sido demostrado por los siguientes hechos:

- a).- Al microscopio electrónico, la porción central de la partícula viral se tiñe con acetato de uranilo y fosfotungstato.
- b).- Las inclusiones celulares en cultivos infectados se tiñen de color verde-amarillento con anaranjado de acridina.
- c).- La replicación viral en células susceptibles es inhibida por antagonistas del ADN, tales como 5-fluorodesoxiuridina (FUDR), 5-iododesoxiuridina (IUDR) y citosina arabinósido.

Las cepas estudiadas de CMV humano son relativamente insensibles al efecto del interferón e inducen poca formación de esta sustancia.

EFECTO DE LOS AGENTES FISICOS Y QUIMICOS

La termoestabilidad del CMV infeccioso a -4°C está marcadamente influenciada por la composición del medio en el que se encuentre, así, el virus suspendido en agua destilada o en medio de Eagle sin bicarbonato es más estable que el virus suspendido en amortiguador TRIS y en medio de Eagle

o PBS con bicarbonato. La adición de suero de ternera a cualquiera de estos medios estabiliza parcialmente al virus.

Calentándolo a 50°C por 30 minutos y conservándolo a 4°C durante una semana, pierde infectividad. El virus es inactivado cuando se conserva a pH inferior a 5.0 y cuando se expone a pH 3.0 - Es sensible al éter al 2% durante 2 horas y al cloroformo.

El antígeno de CMV fijador del complemento es estable a 4°C pero inestable a 37°C durante un tiempo de incubación prolongada.

La infectividad de este virus es preservada a -60°C y parcialmente estabilizada por la presencia de sorbitol.

CRECIMIENTO EN CULTIVOS DE TEJIDO

In vivo, la infección por CMV involucra exclusivamente células epiteliales; in vitro el virus puede ser aislado y propagado solamente en tejido humano, preferentemente células de origen fibroblástico. Ha sido aislado en cultivo primario o en fibroblastos humanos derivados de varios tejidos diferentes como músculo embrionario, tejido de pulmón, y otros.

CUADRO No. 3

ESTABILIDAD DEL ANTÍGENO FIJADOR DEL COMPLEMENTO DE LAS CEPAS AD-169 y C-87 a 4°C Y 37°C EN DIFERENTES MEDIOS DESPUES DE INCUBACION A LAS TEMPERATURAS Y TIEMPOS INDICADOS.

EXP No.	CEPA VIRAL	MEDIO ORIGINAL	MEDIO DILUYENTE	TITULO DEL ANTÍGENO FIJADOR DEL COMPLEMENTO		
				min	4°C	37°C
1	AD-169	TRIS	Tris	0	8	8
				48	8	2
			Agua	0	4	4
				48	8	2
			Eagle ^b	0	16	16
				48	16	2
2	C-87	TRIS	Tris	0	4	4
				48	4	0 ^c
			Agua	0	4	4
				48	4	0
			Eagle	0	8	8
				48	4	0
3	C-87	AGUA	Tris	0	4	4
				48	4	1
			Agua	0	4	4
				48	4	1
			Eagle	0	4	4
				48	4	1

^b= Medio Eagle con 0.225% de bicarbonato y 10% de suero de ternera.

^c= Cero indica no actividad en material sin diluir.

Según Berzesh-Melnich y col., 1966

Algunas cepas diploides de músculo embrionario o de fibroblastos de pulmón (como la WI 38) ofrecen ventajas debido a que son tan susceptibles como las células primarias y, además, se pueden obtener comercialmente.

El efecto citopático que muestran las monocapas de fibroblastos inoculados con especímenes que contienen el virus, o cultivos derivados de biopsias o autopsias, aparece en algunos días o semanas, dependiendo de la cantidad de virus presente. Frecuentemente, los cultivos celulares secundarios de especímenes de biopsias o autopsias muestran el efecto antes que los cultivos primarios. En general el desarrollo del ECP en cultivos infectados es usualmente muy lento.

En monocapas fijadas con solución de Zenker y Bouin, y teñidas con hematoxilina-eosina, las células afectadas muestran núcleo alargado conteniendo una o más inclusiones eosinofílicas (amfófilas o basofílicas) dependiendo de la técnica de tinción empleada. Con frecuencia se encuentran células multinucleadas con inclusiones intranucleares y una lesión citoplásmica prominente.

CARACTERISTICAS ANTIGENICAS

Después de la infección por CMV se desarrollan anticuerpos neutralizantes (Nt) y fijadores del complemento (FC). No se sabe aún si cada -

uno de estos anticuerpos refleja diferentes antígenos en la partícula viral. Sin embargo, datos recientes indican que más del 50% del antígeno FC obtenido de preparaciones con CMV asociado a células es soluble y puede ser separado de la partícula viral por ultracentrifugación diferencial. En tanto que la infectividad viral, que es más estable a 37°C que a 4°C, el antígeno FC es fácilmente inactivado a 37°C pero es más estable a 4°C.

Estos hallazgos recientes pueden explicar porque no se encuentra actividad fijadora del complemento en flúidos clarificados de cultivos infectados con CMV.

El antígeno o los antígenos de CMV se demuestran fácilmente por la técnica de anticuerpos fluorescentes, pero no se han hecho intentos para aplicar este método al análisis de la composición antigénica del virus.

Aún no está claramente establecido si existe más de un serotipo de CMV. Un cierto grado de heterogeneidad ha sido sugerido por las pruebas de Nt o de FC con sueros de niños con enfermedad de inclusión citomegálica (EIC), y en estos sueros se han encontrado una reactividad mayor al virus homólogo excretado por ellos que a cepas heterólogas. Sin embargo, el suero de niños mayores y de adultos no puede discriminar entre los antígenos FC de cepas humanas diferentes. El antígeno-FC de la cepa AD-169, la cepa más ampliamente -

utilizada, parece ser generalmente más reactivo -- que los antígenos de otras cepas de CMV. No hay suficiente información para determinar si los sueros de niños mayores o de adultos pueden neutralizar preferentemente alguna, pero no a cualquiera -- de las cepas humanas conocidas.

En base a los resultados con el suero de -- niños infectados intrauterinamente, Weller y col. -- clasificaron tentativamente las cepas Davis y AD-169 en dos subtipos diferentes, con las cepas Kerr y -- Espaillet formando posiblemente un tercer subtipo.

C) MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA INFECCION. INFECCION CONGENITA Y ADQUIRIDA.

Los CMV son conocidos como parásitos -- muy comunes del hombre, sin embargo, el virus po-- cas veces produce enfermedad, pero persiste por -- largos periodos como una infección crónica latente-- de las glándulas salivales.

El nombre de " virus de las glándulas sali-- vales " se debe a la localización de las células -- características en las glándulas salivales o en los -- túbulos renales de muchos niños asintomáticos.

Las infecciones producidas por el CMV son esencialmente de dos tipos:

a) Infección congénita o neonatal.

Esta infección se adquiere en forma trans-- placentaria y se le conoce como " enfermedad de -- inclusión citomegálica del recién nacido ".

Stern y Tucker afirman que la infección -- congénita con frecuencia no es fatal, sino más bien subclínica, pero en general se acepta que la morta-- lidad es del 1% aproximadamente.

Los virus atraviesan la placenta y se esta-- blecen en las glándulas salivales, cerebro y víscer-- as abdominales del feto, pudiendo producir muerte

fetal.

La infección más importante producida por CMV es la enfermedad grave y usual que ocurre -- en niños prematuros; la patogénesis de este tipo de -- infección depende del curso de la naturaleza de la -- infección primaria materna durante el embarazo.

Si la enfermedad se generaliza, el produc- to usualmente será abortado o nacerá prematura- - mente. Sí, por otro lado, la infección intrauterina es localizada y relativamente poco severa, el niño -- puede no desarrollar signos de la infección, sino -- hasta más tarde en la niñez o aún en la edad adul- ta. Puede no haber nunca ninguna evidencia clíni- -- ca de tal infección.

Las alteraciones que presenta el niño con -- enfermedad generalizada neonatal son: hepatoesple- - nomegalia con ictericia, púrpura trombocitopénica, anemia hemolítica, hemorragia petequial, anuria, -- bronconeumonía y enteritis.

Cuando el niño sobrevive por 1 a 2 años a la infección, queda por lo general con necrosis ce- rebral periventricular y calcificación, además de -- otras anormalidades cerebrales. También pueden -- presentarse infecciones recurrentes del tracto respi- ratorio y signos de disfunción hepática.

No hay reportes bien documentados que indi- quen la posibilidad de que una madre de nacimiento

a un segundo hijo citomegálico. El hecho de que -- los niños de embarazos posteriores no se vean afec--
tados, indica que la viremia en la madre no persis--
te por más de unos cuantos meses.

Los datos serológicos sugieren que aproxi--
madamente el 6% de la población femenina en edad
reproductiva adquiere la infección durante el emba--
razo.

Por estudios hechos en los Estados Unidos
de Norteamérica por Alexander y col, se ha visto --
que el CMV puede ser aislado del 3.5% de mujeres
embarazadas sanas y en la Isla de Taiwan se ha --
encontrado en el 13% del cervix de mujeres gestan--
tes (Alexander, 1967). Estudios realizados en--
Boston, Filadelfia y Bethesda, han indicado --
un 29.5%, 56.5% y 51.8% de incidencia de anticuer--
pos FC a este virus, respectivamente, en grupos --
de mujeres en etapa reproductiva.

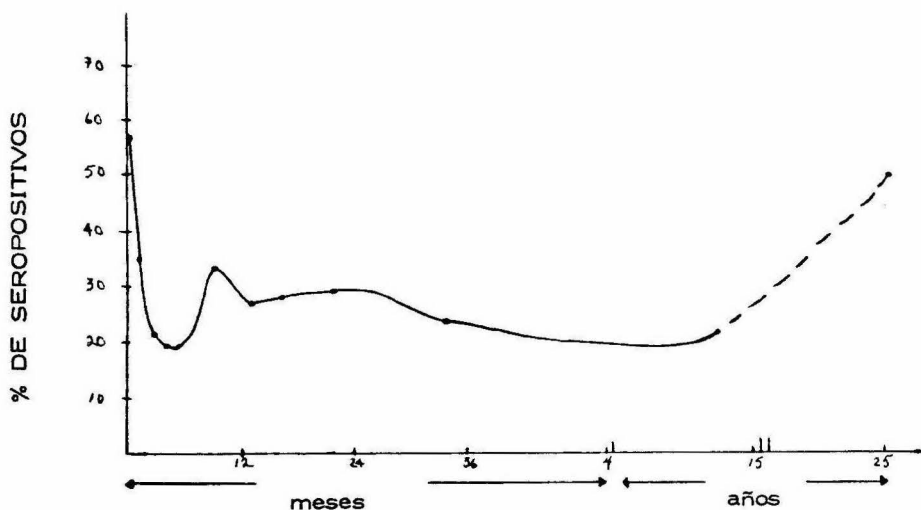
Se postula, y ésto ha sido confirmado por
Wentworth y Alexander, que la prevalencia de anti--
cuerpos en mujeres puede deberse a una combina--
ción de factores, uno de los cuales puede ser el em--
barazo. El aumento en la prevalencia en mujeres --
de 30 a 40 años puede deberse a su contacto con --
niños que han tenido una infección primaria, los --
que actuarían como fuente de la infección y como --
un estímulo para una respuesta secundaria en sus --
madres.

Otros autores, entre ellos Feldman, han reportado el aislamiento del CMV de la orina de mujeres embarazadas.

Se ha encontrado que en el 1% de los abortos, la mayoría — de los órganos del cuerpo contienen células indicadoras de citomegalia. Las células citomegálicas se encuentran también en los vellos — coriónicos placentarios y el virus mismo en la orina de la madre.

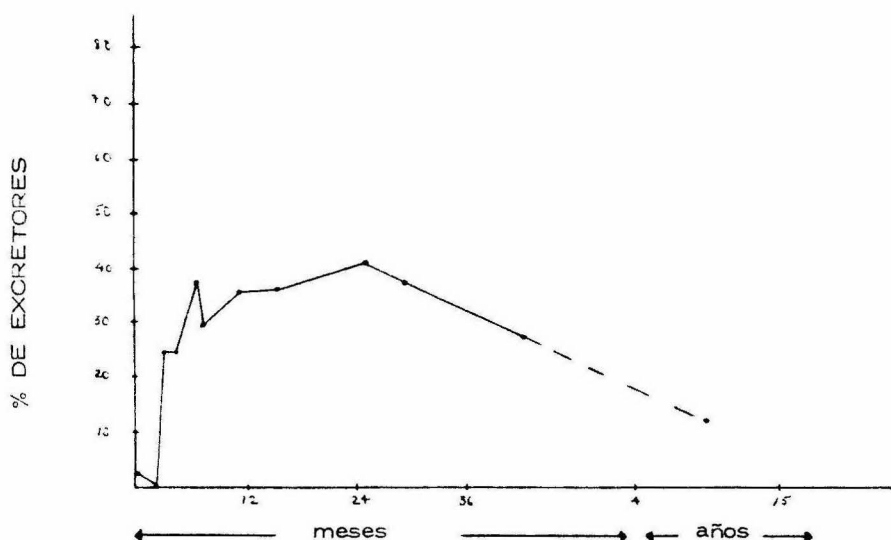
Un reciente reporte del Japón (Wright y Goodheart) revela — un alto porcentaje (60%) de infección inaparente entre niños sanos de — 5 a 9 meses de edad. Si el mecanismo de la infección es, como ya se dijo, vertical madre-hijo, debe encontrarse una alta incidencia a — una edad muy temprana entre poblaciones diferentes, y de hecho ésto ha sido demostrado por Leinikki, Heinonen y Petay en 1972 (Gráfica — 1).

NUMERO DE SEROPOSITIVOS EN DIFERENTES GRUPOS DE EDAD



Los mismos autores han demostrado que la citomegaloviremia persiste por algunos meses después del nacimiento, en un trabajo realizado para estudiar la persistencia de la excreción del virus en la orina de los niños. La excreción varía considerablemente en diferentes grupos de edad (Gráfica 2).

EXCRETORES EN DIFERENTES GRUPOS DE EDAD



Se han encontrado títulos mayores de anticuerpos en excretors recién nacidos, y esto probablemente indica que los anticuerpos maternos protegen contra la infección.

También se sugiere que el virus puede ser uno de los agentes responsables de anomalías congénitas del corazón, lo que se ha encontrado más usualmente en infección por rubéola. Esto sugiere que el CMV puede infectar al producto no sólo en los últimos me-

ses del embarazo, sino también en el primer trimestre, en estos casos la infección puede producir defectos semejantes a los observados en la rubéola congénita.

La EIC generalizada puede estar asociada con otros estados patológicos: tosferina, enfermedad neoplásica generalizada, angiosarcoma retroperitoneal, malformaciones congénitas del corazón, leucemia, cataratas, diabetes, hipogamaglobulinemia con timoma, granulomatosis de Wegener, púrpura trombocitopénica y enfermedad de Hodgkin, anemia hemolítica, aspergilosis y candidiasis generalizada, e infección por Pneumocistis carinii.

b) Infección adquirida o post-natal.

Se adquiere por la vía respiratoria y conduce a condiciones de portadores crónicos, en general inaparentes, pero que ocasionalmente se presentan como hepatitis insidiosa o pneumonitis.

Algunos estudios han demostrado que el virus puede ser adquirido por un niño sano a los seis meses después del nacimiento. Por lo tanto, las encuestas serológicas de CMV requieren la disponibilidad de especímenes tomados tempranamente durante la gestación para documentar una infección adquirida.

La patogénesis de la infección adquirida --

por el niño cuando está en contacto con el virus parece estar dilucidada de acuerdo con Weller y Hanshaw, no así la de la infección adquirida por el adulto.

Las razones que expliquen el que la infección por CMV sea causante de muerte en niños no están claramente dilucidadas, pero sí se sabe que los problemas que produce son: inflamación del hígado y del bazo, gastroenteritis y neumonitis. En adultos, el CMV causa neumonía, hepatitis, colangitis e insuficiencia suprarrenal.

En la forma generalizada, una infección latente puede ser estimulada por factores que afectan adversamente a la médula ósea, tejido linfóide o sistema retículo-endotelial. Por ejem: linfoma maligno, leucemia, anemias, drogas quimioterapéuticas, corticosteroides, drogas antileucémicas, rayos X y terapia inmunosupresora.

Hanshaw, Weller y Medearis han documentado una neumonía como complicación de enfermedad maligna del sistema retículo endotelial o de otras enfermedades crónicas debilitantes.

La forma más frecuente de transmisión de la infección es la directa, o bien el virus puede ser transmitido por transfusión sanguínea. Presumiblemente, los vehículos usuales de transmisión en tales casos son: la orina, heces, la saliva o go

tas de secreción respiratoria.

Uno de los problemas en los bancos de sangre hoy día es la inducción de infección por CMV como consecuencia de una transfusión sanguínea. Por este medio se pueden adquirir el llamado "síndrome post-transfusional" y la mononucleosis infecciosa, las cuales se han correlacionado con seroconversión y/o demostración de viremia.

La recuperación del virus en presencia de anticuerpos circulantes sugiere que el virus en la sangre está probablemente intracelular y protegido de los anticuerpos. Lang y Noren han presentado datos sugestivos de que el CMV puede ser diseminado por leucocitos periféricos, y que éstos pueden participar en el mantenimiento de un estado de latencia.

La incidencia de anticuerpos contra CMV encontrada por Perham, Conway y Watt es muy similar a la encontrada por Stern y Elek en una población normal y a la reportada por Klemola y col. en 1969 en 187 donadores.

El síndrome post-transfusional se puede adquirir en cirugía del corazón y otras, en el 3 a 11% de pacientes, sobretodo cuando hay necesidad de aplicar al enfermo volúmenes importantes de sangre. La seroconversión de negativos a positivos representa infección primaria debida a la transmi-

si3n del virus por la vfa sangufnea; en tales casos, el mecanismo de este s3ndrome representa la reactivaci3n de una infecci3n latente preexistente, y las manifestaciones cl3nicas son precipitadas por la -- circulaci3n extracorporal y transfusi3n masiva. (Weller, 1971)

TRANSMISION Y PATOGENIA

El hombre es el 3nico reservorio conocido para este virus, pero es probable que otros CMV -- no infecciosos para el hombre puedan encontrarse -- en otros mam3feros.

El contagio es m3s frecuente por vfa a3rea debido a que la multiplicaci3n viral se lleva a cabo como ya se expuso anteriormente en las gl3ndulas -- salivales. No est3 bien definido el periodo de incubaci3n. La infecci3n in 3tero puede ocasionar -- una enfermedad aguda ya sea antes o inmediatamente despu3s del nacimiento. Es obvio que la mayo -- rfa de los individuos se infecta en forma subcl3nica por alguna otra vfa que no sea transplacentaria, ya que la proporci3n de inmunes en la comunidad au -- menta continuamente con la edad.

El virus contra3do in-3tero pasa directa -- mente a las gl3ndulas salivales, ah3 permanece la -- tente y se activa m3s tarde por alg3n otro factor -- precipitante. La evidencia de transmisi3n transpla -- centaria proviene del descubrimiento de c3lulas ci -- tomeg3licas en la placenta de reci3n nacidos infec -- tados.

Debido a que la infección con CMV en el -
adulto es por lo general inaparente, muy poco se -
conoce de cómo o cuando la madre se infecta y ba-
jo que condiciones puede transmitir el virus al fe-
to. Medearis en 1964 demostró citomegaloviruria -
en madres de niños citomegálicos, por lo cual es -
posible que la infección congénita refleje una recien-
te infección primaria de la madre, implicando una -
viremia en ausencia de anticuerpos preexistentes.

D) RESPUESTA INMUNOLOGICA

En la infección por CMV se encuentran niveles significativamente elevados de inmunoglobulinas IgM e IgA como respuesta a un estímulo antigénico, no así los niveles de IgG los cuales son comparables a los niveles normales, como puede observarse en el Cuadro No. 4

Según Mc Cracken y col. (1965) las medias normales de IgG, IgA e IgM encontradas (promedio de 10 niños normales) son: 1,221, 0 y 15.8 mg/100 ml. respectivamente. Con variaciones de 1,070- 1,550, 0 y 11-19 mg/100 ml. respectivamente.

CUADRO No. 4

PESO AL NACIMIENTO, AISLAMIENTO DEL VIRUS, PRESENCIA DE ANTICUERPOS Nt y FC, CONCENTRACIONES DE INMUNOGLOBULINAS IgG, IgA e IgM.

Infante edad (días)		Peso (gm)	Aislamiento del Virus	Presencia de Ac Fc Ac Nt		Conc. de IG (mg/100 ml)		
						IgG	IgA	IgM
1	2	2,200	+	+	+	970	22	40
2	1	2,500	+	0	+	2,000	22	130
3	11	2,200	+	0	+	2,200	20	120
4	5	2,800	+	+	+	1,400	26	30
5	2	1,900	+	+	+	1,600	74	60
6	2	1,500	+	+	0	550	22	35
7	2	2,600	+	+	+	2,600	18	30
8	3	1,600	+	-	+	1,600	25	130
Promedio						1,503	28.6	71.9
Límites						550-2200	18-74	30-130
Desviación								
Standard						539	18.5	46.4

+ Presencia

0 Ausencia

- No se hizo

Tomado de Mc Cracken y col., 1965

Los niveles significativamente elevados de IgM en niños con EIC son un reflejo de la capacidad del feto para producir anticuerpos en respuesta a un estímulo antigénico, ya que la cifra normal de IgM en el recién nacido es hasta de 25 mg/100-ml. equivalente a 30 UI/ml.

Langenhuysen y col. han encontrado que no es posible detectar IgM en sueros obtenidos pocos días después de la infección, sino hasta más tarde, cuando alcanzan niveles máximos. Se sugiere que títulos de 1: 8 o mayores son evidencia de una infección reciente por CMV y tales títulos sólo han sido demostrados en suero de pacientes con la enfermedad.

La IgA no pasa la barrera placentaria y su síntesis comienza hasta la tercera o cuarta semana de vida, siendo la cifra normal en el recién nacido hasta de 6 mg/100 ml. equivalentes a 3.5 UI/ml. Mc Cracken y col. demostraron la presencia de dicha inmunoglobulina en los niños con EIC a temprana edad (18-75 mg/100 ml), lo que demuestra que esta inmunoglobulina es producida por el feto infectado o por la placenta. La verificación de esto será mediante la utilización de técnicas inmunofluorescentes específicas para demostrar sitios de origen de IgA en el recién nacido infectado.

Los mismos autores reportan niveles ligeramente elevados de IgG en recién nacidos en comparación a los niveles maternos, lo cual va de --

acuerdo con una transferencia transplacentaria selectiva y direccional de estos anticuerpos al niño.

Parece existir una correlación entre infección por CMV y anticuerpos anti-gama globulina -- después de transfusión sanguínea. Estos anticuerpos se demuestran sobretodo en sueros de pacientes obtenidos en un periodo de 35 a 42 días después de la transfusión.

Langenhuisen y col. indican que una posible explicación para la presencia de anticuerpos anti-globulina gama en infecciones virales se debe a una estimulación no específica del aparato inmunológico.

Es posible detectar anormalidades inmunológicas en pacientes con mononucleosis o con síndrome post-transfusional como consecuencia de infección por citomegalovirus, y ésto ha sido demostrado por diversos investigadores (Kantor y Goldberg, Klemola y col. y Wager y col.).

Estas anormalidades incluyen la producción de una crioglobulinemia, elevación o disminución -- de los niveles de inmunoglobulinas en el suero y la presencia de autoanticuerpos humorales, incluyendo factor reumatoide, anticuerpos antinucleares, anticuerpos anti-células rojas y aglutininas frías. El mecanismo mediante el cual la infección viral induce estas anormalidades no está todavía claro.

Estudios serológicos, realizados por Bluestone y col. indican que estas anormalidades son escasas e insignificantes en niños y adultos asintomáticos, no así en individuos sintomáticos. Se han dado posibles explicaciones a lo anterior, entre las cuales están:

a).- Que la cepa causante del síndrome post-transfusional o mononucleosis atípica puede ser diferente de la cepa causante de infecciones asintomáticas en mujeres embarazadas y en recién nacidos.

b).- Que la infección en el adulto represente una segunda exposición al virus en casos de respuesta aparentemente primaria de anticuerpos, o bien, reactivación de una infección latente, que a su vez activa una respuesta de inmunidad en el huésped.

E) EPIDEMIOLOGIA

La infección por CMV está extensamente distribuida en Europa, Japón, África y Australia; sin embargo, la situación no es similar en todos los países citados, ya que la localización geográfica, el nivel socioeconómico de la población y el sexo influyen considerablemente en la susceptibilidad a la enfermedad.

En Latinoamérica los estudios realizados no son del todo completos para poder dar una idea de la diseminación de la infección.

Algunos investigadores han encontrado una mayor prevalencia de anticuerpos FC en personas del sexo femenino, según puede verse en el Cuadro No. 5

CUADRO No. 5

Población	No. de casos mujeres/hombres	Prevalencia de anticuerpos FC%				Referencia
		Total	M	H	Diferencia (M - H)	
Seattle	1928/2896	42.2	44.2	40.9	3.3	Wentworth y Alexander.
Easter Island	152/161	76.0	80.3	71.4	8.9	Haldane y col
West Berlin	463/102	46.4	47.1	43.1	4.0	Henneberg y Antoniadi.
Dallas	109/86	45.1	55.0	32.6	22.4	Luby y Shasby
Huixquilucan	333/307	15.9	19.2	12.4	6.8	Golubjatnikov y col.

Tomado de Luby y Shasby, 1972; Golubjatnikov, 1973.

Se ha podido observar una mayor prevalencia de anticuerpos FC en mujeres embarazadas como se indica en el cuadro No. 6

La infección con CMV es fácilmente transmitida a miembros de la misma familia, encuestas realizadas en familias eskimales por Sinha y Pauls en 1968 lo demuestran.

Así como la infección es fácilmente transmitida intrafamiliarmente e intrainstitucionalmente, no es fácil que un grupo aislado contraiga la enfermedad, como se demuestra en encuestas serológicas efectuadas en una base militar por Wenzel y col. en 1971.

También se ha observado que, en general, en zonas rurales y en islas los porcentajes de susceptibles son mucho más elevados que en las grandes zonas urbanas.

Algunas encuestas serológicas han mostrado una relación directa entre la prevalencia de anticuerpos en unidades de sangre para transfusión y el nivel socioeconómico. La prevalencia mayor de anticuerpos en donadores de sangre ha sido reportada en Rumania, Finlandia y Estados Unidos de Norteamérica. Menor frecuencia ha sido encontrada en Inglaterra, y todavía menor en Nueva Escocia y Australia.

CONTROL

No se ha desarrollado ningún procedimiento específico de control. Parece ser conveniente —

aislar los casos de infección neonatal con CMV, de otros niños sanos.

Los niños con la infección generalizada desarrollan un alto título de anticuerpos específicos. Sin embargo, la administración de gama-globulina hiperinmune puede ser utilizada en la infección generalizada en el adulto, ya que el proceso puede reflejar un estado de hipogamaglobulinemia.

Elek, Stern y Mc Dougall, han intentado la producción de una vacuna contra el CMV pero sin resultados satisfactorios. Weller y Dudgeon han puesto en evidencia los resultados obtenidos por Elek y col., debido a que los últimos usan virus no atenuado, lo que es peligroso por el potencial onco génico del virus en estudio.

Lo que si resulta evidente para estos investigadores es la necesidad de una vacuna como la de rubéola, porque en varios países del mundo hay alta incidencia de infección al nacimiento. Por ejemplo en Rochester, Nueva York, Cleveland, Washington y Londres de 0.5 a 1.5% de niños están infectados con el virus al nacimiento.

Investigadores científicos adscritos al St. George's Hospital de Londres (1975) han perfeccionado una nueva vacuna protectora contra CMV para la lucha contra esta infección. La vacuna fruto de 10 años de investigación protege contra el vi-

rus citomegálico causante de lesiones cerebrales en 200 a 600 pacientes infantiles, cada año, en Inglaterra y Gales.

Acaso hayan de invertirse otros 5 años en ensayos clínicos adicionales y, si los resultados -- fueran tan satisfactorios como se espera, la vacuna podría administrarse a muchachas adolescentes en una sola inyección juntamente con la vacuna contra la rubéola.

F) TECNICAS SEROLOGICAS PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS

Diversas técnicas han sido empleadas para la detección de anticuerpos contra CMV, en este trabajo se prefirió la utilización de la técnica de fijación de complemento por considerarse de mayor sensibilidad y rapidez.

SERONEUTRALIZACION

Cuando el virus se mezcla con un suero específico inmune se neutraliza su poder infectante. La explicación a este fenómeno es que los anticuerpos neutralizantes específicos envuelven a la partícula viral o bien bloquean el sitio de adsorción a la célula susceptible.

La combinación del virus y el anticuerpo generalmente es débil, así que el virus puede inactivarse durante el proceso y disociarse por simple dilución o cambios de pH, recuperando su infectividad.

En un principio sólo se contaba con la técnica de seroneutralización para la detección de anticuerpos; sin embargo, la dificultad para obtener datos reproducibles, así como el tiempo requerido para obtenerlos, son dos inconvenientes que hacen impráctico este método con fines epidemiológicos.

Con el empleo de reactivos estandarizados, la prueba puede usarse para identificar virus o cuantificar anticuerpos. Plummer en 1964 preparó un suero inmune específico para CMV por inoculación de monos con múltiples dosis de virus infeccioso; sin embargo, el suero así obtenido tiene bajo título de anticuerpos, así que se prefiere usar suero humano positivo.

Las pruebas de neutralización se llevan a cabo dentro de dos modalidades: por inhibición del efecto citopatogénico (ECP) en cultivos de tejidos, y por disminución en el número de placas, también en cultivos celulares.

El primer método se basa en la inhibición por anticuerpos específicos, del ECP característico producido por este virus, en cepas celulares como la WI-38.

Para efectuar esta técnica se preparan diluciones en serie del suero problema y se mezclan con una cantidad constante y conocida del virus CMV; se inoculan las mezclas en tubos de cultivo celular y el título se expresa como la más alta dilución de suero capaz de neutralizar el virus y por lo tanto de inhibir el efecto citopatogénico del mismo.

El método de reducción en placa fue sugerido tiempo después por la conveniencia de contar -

con una prueba que requiere menos tiempo y que es más precisa. Se basa en la capacidad del CMV para formar placas en cultivos celulares adicionados de metilcelulosa. Las células de mayor sensibilidad en este caso son las WI-38 (Células diploides humanas).

El suero inactivado y en diluciones seriadas se mezcla con el virus a volúmenes iguales. El título se expresa como la más alta dilución del suero que ocasiona un 60% de disminución en el número de placas.

DETECCION DE ANTICUERPOS POR FLUORESCENCIA.

En 1968 Hanshaw y col. describieron la técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos frente al CMV. Emplearon una cepa de fibroblastos humanos diploides (WI-38), infectada con el virus, como fuente de antígeno. Así mismo, Langenhuisen y col, han empleado esta técnica con algunas modificaciones, utilizando cultivos celulares de la cepa GaBi.

Para este fin utilizaron diluciones seriadas del suero problema, las que aplicaron sobre células WI-38 infectadas previamente con virus de CMV y fijadas. Después de incubar y lavar se cubrieron las preparaciones con globulina antihumana marcada con isotiocianato de fluoresceína. El título de

anticuerpos se expresó como la más alta dilución -- de suero que mostró fluorescencia definida. La -- fluorescencia positiva está caracterizada por la presencia de inclusiones intranucleares aumentadas en tamaño y la formación de una gran vacuola en el citoplasma.

La prueba es útil, conveniente y sensible.

GENERALIDADES SOBRE LA TECNICA DE FIJACION DE COMPLEMENTO.

La primera descripción de un fenómeno de lisis como parte de una reacción inmunitaria fue la observación de Pfeiffer en 1894, de que el Vibrio - colera se lisaba en la cavidad peritoneal de un caba^{yo} inmunizado. Este fenómeno, sólo tiene lugar -- en animales específicamente.

Pfeiffer concluyó que se requerían, para la lisis celular, los anticuerpos, las células bacterianas y un componente termolábil del suero normal.

La bacteriolisis inmunitaria precedió en -- cuatro años los estudios de Bordet sobre hemólisis. Bordet conocía la necesidad de un componente ter-- molábil para el sistema bacteriolítico, y en esen-- cia, repitió estos estudios en el caso de la hemóli-- sis inmunitaria. Los estudios hemolíticos para de-- mostrar la presencia de la alexina (nombre dado -- por Bordet a este nuevo componente termolábil del-- suero normal) son mucho más fáciles de realizar-- que las pruebas de bacteriolisis. El término de -- complemento, creado por Erlich, sustituyó el de -- alexina propuesto inicialmente por Bordet. Este -- quien recibió el premio Nobel por su descubrimien-- to y sus estudios ulteriores con el complemento, -- creó con Gengou la primera prueba de fijación de-- complemento.

PROPIEDADES GENERALES DEL COMPLEMENTO .

1).- El complemento se encuentra en todos los sueros normales de mamíferos.

2).- La actividad lítica del complemento, en presencia de antígeno y anticuerpo desaparece por inactivación térmica del suero a 56°C durante 30 minutos. En estas condiciones, las inmunoglobulinas son estables. Los sueros calentados, al pasar el tiempo, recuperan parte de su actividad complementaria.

3).- El complemento interviene en todas las reacciones antígeno-anticuerpo, salvo las relacionadas con IgA e IgE. Es muy poca la especificidad de especie del complemento; de ordinario, el complemento de cobayo es compatible con los anticuerpos de cobayo, hombre, conejo y otras especies.

4).- Es un complejo formado por once proteínas séricas importantes, que actúan de manera concertada.

5).- Los once componentes resultan necesarios para que se efectúen las reacciones antígeno-anticuerpo de tipo lisis.

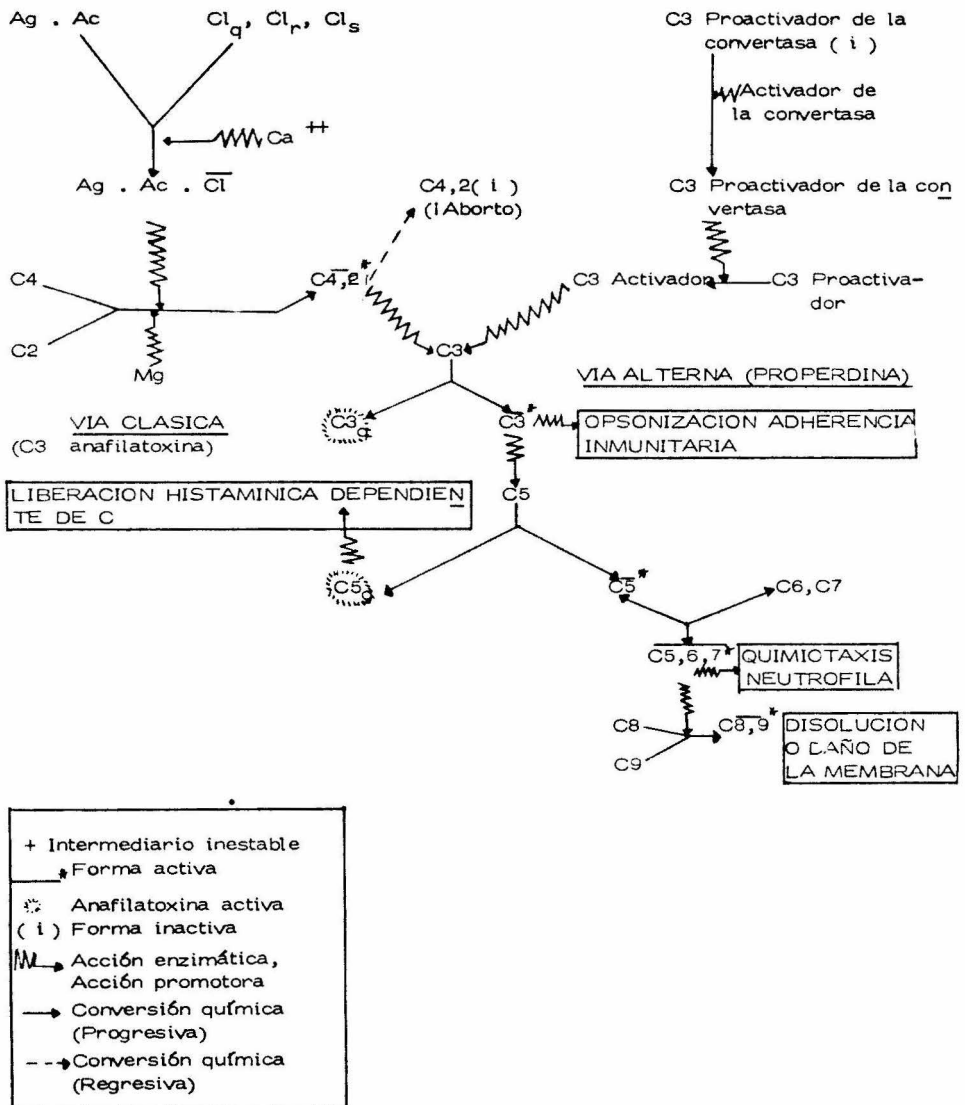
6).- Ciertas porciones del sistema complementario intervienen en la opsonización directa, fagocitosis, quimiotactismo, formación de anafilatoxina, adherencia inmunitaria y anafilaxia cutánea pasiva. Para los dos últimos se necesita complemento completo.

7).- La inmunización no aumenta la concentración del complemento.

La sucesión en que se activa el sistema -- del complemento mediante la vía clásica y alterna -- de la properdina, se muestra en la fig. No. 1 (Añadida posteriormente).

Vía clásica.- No todos los anticuerpos son capaces de fijar el complemento. Parece que la -- capacidad de activar al complemento mediante la -- vía clásica se limita a los anticuerpos IgM e IgG -- (exclusiva de la subclase gama cuatro). La fijación del complemento es una función de la región -- Fc de la molécula del anticuerpo. La sucesión se inicia con cambios en la conformación de esa región, después de la reacción de las regiones Fab -- de la molécula anticuerpo con el antígeno. Los cambios de configuración que ocurren dentro del Fc permiten a la molécula del anticuerpo ligar C1. C1 fijado adquiere actividad de esterasa, preparando el -- sitio de la reacción de antígeno-anticuerpo para la subsiguiente fijación de C4 y C2; a partir de entonces, la reacción puede proceder hasta su termina--

FIGURA No. 1



Tomado de Gordon B.L., 1975

ción o declinar, por medio de una sucesión abortiva.

Vía alterna.- Se ha demostrado que muchas sustancias son activadoras eficaces de la vía alterna (vía de la properdina). Estas incluyen varios tipos de agregados inmunoglobulínicos, polisacáridos, tales como inulina, gelosa, endotoxina y las paredes de las células de las levaduras, al igual que otras sustancias como una proteína proveniente del veneno de la cobra común (*Naja naja*) y las enzimas tripsina y plasmina.

FIJACION DE COMPLEMENTO

Consecutivamente a la inyección de glóbulos rojos extraños en un animal, éste desarrolla anticuerpos (hemolisinas) que son capaces de destruir a los glóbulos rojos de la misma especie.

Estas reacciones dependen de dos componentes: uno termoestable y el otro termolábil. Al termoestable se le conoce con diversos nombres, tales como amboceptor hemolítico o hemolisina, y es un anticuerpo específico provocado por la inyección de antígeno y capaz de combinarse con él. El componente termolábil está compuesto por un sistema complejo en el suero fresco de la mayoría de los animales y recibe el nombre de complemento; no es un anticuerpo, pero puede unirse a los complejos antígeno-anticuerpo, en cuyo caso se dice que el —

complemento se ha fijado.

La actividad del complemento depende de la fuerza iónica del medio, del p H (óptimo 7.2 a 7.6), del volumen, de la temperatura (óptimo 30- a 37°C) y de la presencia de iones Ca^{++} y Mg^{++} .

Las pruebas de fijación de complemento se efectúan en dos pasos: el primero es una reacción-antígeno-anticuerpo, más una cantidad constante de complemento titulado anteriormente. Si antígeno y anticuerpo son específicos uno a otro, se combinan fijando el complemento añadido. El segundo paso consiste en un sistema que demuestra la presencia de complemento libre, sin fijar; para ésto se adiciona al sistema glóbulos rojos sensibilizados con la hemolisina específica. Si el complemento ha sido fijado por el complejo antígeno-anticuerpo, no se encontrará disponible para lisar a los glóbulos rojos sensibilizados. Pero, si el antígeno y anticuerpo no son específicos uno a otro, o si alguno de los dos está ausente, el complemento se encontrará libre y se unirá a los glóbulos rojos sensibilizados, lisándolos. Por lo tanto en una reacción positiva no hay hemólisis mientras que en una negativa si la hay.

Para la correcta realización de esta prueba es necesario controlar todos los reactivos y las condiciones minuciosamente.

Esta prueba es laboriosa, pues depende de varios reactivos serológicos, uno de ellos termolábil. Por esta razón es necesario titular exactamente la cantidad de cada reactivo antes del uso, y se deben llevar paralelamente testigos adecuados.

La fijación de complemento se puede aplicar a numerosos sistemas antígeno-anticuerpo. Es especialmente útil cuando se dispone de pequeñas cantidades tanto de antígeno como de anticuerpo, porque se trata de un método serológico muy sensible; además, ciertas pruebas serológicas son difíciles de realizar por otros medios. Por ejemplo, los anticuerpos contra los virus se identifican mucho más rápidamente, con un costo mucho menor, a través de FC que mediante pruebas de neutralización en animales o en cultivos celulares. Si se dispone de un suero positivo conocido, se puede emplear en ensayos de FC buscando el antígeno correspondiente. De esta manera, la FC permite investigar tanto antígeno como anticuerpos.

La prueba de FC es uno de los procedimientos serológicos de mayor utilidad para el virologo. Puede emplearse para el ensayo de ciertos antígenos virales que no poseen infectividad o actividad hemaglutinante, por ejemplo: los llamados antígenos solubles de los mixovirus, las cápsides de los enterovirus y los neoantígenos producidos por ciertos virus oncogénicos (grupo Herpes).

Los antígenos empleados son componentes -

proteínicos (posiblemente capsómeros de los viriones). Una consideración primaria importante en la preparación de estos antígenos es su potencia; deben estar libres de materiales del huésped y libres de actividad anticomplementaria.

La prueba puede realizarse por microtécnica o por macrotécnica. El procedimiento de la microtécnica, desarrollado, por Takatsky (1950) y modificado por Sever (1962), ha hecho más factible el ensayo de antígenos virales y anticuerpos. Debido a que los antígenos tienen con frecuencia título bajo, el uso de macrométodos puede ser prohibitivo.

CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS

1.- Reactivos.

a).- Antígeno específico para Citomegalovirus de la cepa AD-169, obtenido de fuente comercial en forma liofilizada, rehidratado con 1 ml de agua destilada al momento de emplearse en la prueba. Se mantiene a temperatura de 4°C - 6°C durante una semana para evitar que baje el título inicial.

b).- Antígeno negativo (tejido), obtenido de fuente comercial en forma liofilizada y rehidratado con 1 ml de agua destilada. Se mantiene de 4°C - 6°C durante una semana.

c).- Controles positivo y negativo obtenidos de fuente comercial en forma liofilizada, rehidratados con 0.5 ml. de agua destilada al momento de emplearse. Se mantiene de 4°C - 6°C durante una semana.

d).- Amortiguador (GVB)

Solución de cloruro de magnesio - cloruro de calcio.

MgCl ₂ . 6H ₂ O	10 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	4 g
Agua destilada c.b.p.	100 ml.

Solución I

NaCl	85 g
Dietil-barbiturato de sodio	3.25 g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml.

Solucion II

Agua destilada caliente	900 ml.
Ac. dietil-barbitúrico	5.75 g
Gelatina	2.0 g

PREPARACION

En un matraz volumétrico de 1000 ml. se colocan las sales de la solución I, se agrega agua-destilada hasta su disolución completa, se mezcla, - se adicionan 5 ml. de la solución de cloruro de -- magnesio-cloruro de calcio y se afora a la marca - con agua destilada.

En otro matraz de 1000 ml poner volumen de 250 ml. de agua destilada calentada previamente a punto de ebullición, agregar la gelatina hasta di-- solución y en seguida el ácido dietil-barbitúrico; -- una vez que la mezcla está perfectamente disuelta, dejarla enfriar a temperatura ambiente.

Mezclar ambas soluciones en un matraz --

volumétrico de 2000 ml y aforar con agua destilada. Verificar que el pH sea de 7.6 y guardar la solución a temperatura de 4°C.

e).- Solución anticoagulante de Alsever.

La solución Alsever es una solución isotónica que permite preservar la sangre en refrigeración cerca de 10 semanas.

Fórmula:

Dextrosa	20.50 g
Citrato de sodio	8.0 g
Ac. cítrico	0.55 g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

Disolver los ingredientes en agua destilada y la solución resultante esterilizarla en autoclave a 15 libras (121°C) durante 15 minutos. El pH de la solución esterilizada debe ser 6.1

f).- Eritrocitos de carnero.

Para la obtención de los eritrocitos de carnero utilizados en la prueba, el procedimiento a seguir es el siguiente:

En condiciones de esterilidad se toma porción de la yugular externa el volumen requerido de sangre y se pasa a una bolsa de plástico o frasco que contenga un volumen igual de Alsever, mezclado muy bien. Dejar en refrigeración durante tres días para permitir que los eritrocitos maduren y guardar en tubos de 13x100 mm la cantidad requerida para cada prueba. Así los eritrocitos son es-

tables por 30 días.

g).- Suspensión de eritrocitos de carnero al 2%.

Los eritrocitos se lavan con GVB tres veces sucesivas, centrifugando durante 8 minutos a 2000 rpm; del paquete obtenido se hace una suspensión al 2% en GVB, en cantidad suficiente para toda la prueba.

Esta suspensión se estandariza colorimétricamente de la siguiente manera: se lisan 0.8 ml de la suspensión con 3.2 ml de agua destilada y se determina la densidad óptica (D.O.) de la solución resultante de hemoglobina a 550 mμ en un espectrofotómetro Coleman, usando celdas de 12x75 mm. La concentración de la suspensión celular se ajusta para obtener una D.O. de 0.47 usando la fórmula:

$$V_2 = \frac{V_1 \times D.O._2}{D.O._1}$$

V_1 = volumen total

V_2 = volumen requerido

D.O.₁ = densidad óptica requerida

D.O.₂ = densidad óptica obtenida

Ejemplo: si la densidad óptica obtenida es de 0.51

$$V_2 = \frac{24.7 \times 0.5}{0.47} = 26.25 - 24.7 = 1.55$$

$$V_1 = 25.5 - 0.8 = 24.7$$

$$V_2 = ?$$

$$D.O._1 = 0.47$$

$$D.O._2 = 0.5$$

1.55 es la cantidad de GVB que deberá añadirse a la suspensión celular para obtener la densidad óptica requerida de 0.47. Una vez ajustada la concentración de eritrocitos, se guardan a 4°C.

h).- Complemento

Se puede usar complemento de cuy comercial liofilizado, o bien complemento de cuy no liofilizado obtenido en el propio laboratorio.

Para la preparación de complemento en el laboratorio se obtuvo sangre total de cuy por punción cardíaca (50 a 80 ml), se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora y se separó el suero en frío. Por medio de centrifugación se eliminaron totalmente las células sanguíneas (todo en frío), y el complemento así obtenido se distribuyó en alícuotas en pequeñas copas de plástico, cada una con 0.3 ml, y se congelaron enseguida a -60°C para evitar pérdida del título.

i).- Hemolisina

Puede ser de fuente comercial o preparada en conejo. En este trabajo se utilizó una hemolisina al 50% en glicerol, preparada en el laboratorio de Virología de la I.M.A.N. por el método de Talmadge y col.

2.- Preparación de material para la prueba.

Lavado de las placas. Se usan placas excavadas con fondo en U propias para serología por microtécnica, las que deben estar perfectamente lavadas antes de usarse, para tener las condiciones óptimas de la prueba.

Una vez usadas deben enjuagarse con agua caliente para eliminar los reactivos y se colocan en un recipiente con formol dejándolas toda la noche. Al siguiente día se enjuagan perfectamente con agua de la llave y después con agua destilada; se dejan escurrir y se secan con un hisopo todas y cada una de las cavidades.

METODOLOGIA

La técnica empleada para la cuantificación de anticuerpos es la descrita por Schmidt.

Las partes de que consta este método son-

Control de eritrocitos: en un tubo poner —
0.2 ml de la suspensión de eritrocitos al 2% y 0.8
ml de amortiguador.

Esta titulación en "bloqueo" se realiza por —
duplicado para detectar errores en la manipulación—
de la técnica.

El contenido de los tubos se mezcla agitan—
do la gradilla y se incuban en baño de agua a 37°C
durante 30 minutos con agitación cada 10 minutos.
Al cabo de este tiempo, centrifugar los tubos duran—
te 5 minutos a 2,000 rpm para sedimentar los eri—
trocytos y facilitar la lectura.

El tubo que contenga la más alta dilución —
de hemolisina y que presente hemólisis total repre—
senta una unidad hemolítica (U). Usar dos unida—
des en la prueba; para calcular la dilución de tra—
bajo dividir el título resultante entre dos.

Ejemplo: si la dilución 1:1000 muestra he—
mólisis total y la dilución 1:2000 hemólisis parcial,
una unidad estará representada por la dilución — —
1:1000, por lo tanto dos unidades deberán estar con—
tenidas en la dilución 1:500 de hemolisina.

2).- Sensibilización de eritrocitos.

Para la sensibilización se prepara primero

una suspensión al 2% de eritrocitos y se ajustan a una densidad óptica (D.O.) de 0.47. En un matraz se añade hemolisina diluída en un volumen igual al de la suspensión celular, agitar rápidamente la mezcla (todo en hielo) e incubar durante 20 minutos a 37°C. El volumen de eritrocitos sensibilizados debe ser suficiente para toda la prueba.

3).- Titulación de complemento.

Preparar una gradilla con tubos de 13 x 75 mm, colocarla sobre hielo picado y hacer la titulación, a partir de una dilución aproximada de 1:60

CUADRO No. 9

T U B O No.

	1	2	3	4	5	6	7	8
Amortiguador ó Antígeno (-)	0.10ml	0.10ml	0.10ml	0.10ml	0.10ml	0.10ml	0.10ml	0.10ml
Complemento	0.12ml	0.11ml	0.10ml	0.09ml	0.08ml	0.07ml	0.06ml	0.05ml
Amortiguador	0.08ml	0.09ml	0.10ml	0.11ml	0.12ml	0.13ml	0.14ml	0.15ml
Eritrocitos sensibilizados	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml

Los tubos son incubados y agitados a 37°C, 30 minutos, agitan de cada 10 minutos. Centrifugar y leer. El tubo que contenga la menor cantidad de complemento y que muestre hemólisis total representa 1U; usar 2U en la prueba.

Fórmula usada para el cálculo de la dilución que debe dar — 2U.

$$\frac{\text{Dilución original}}{\text{Volumen de C'x2}} \times 0.1 = 2U$$

Ejemplo: Si, 0.09 ml de la dilución 1:60 de complemento es—

igual a IU exacta, entonces 0.18 ml de la dilución-1:60 de complemento es igual a 2U.

$$\frac{60}{0.18} \times 0.1 = 1:33 \text{ dilución de complemento}$$

4).- Titulación de Antígeno

Los antígenos son ensayados en una titulación "en bloque" probando diluciones seriadas del antígeno contra diluciones seriadas del control positivo.

En una gradilla se colocan seis tubos de 13x100mm para hacer las diluciones del antígeno, de 1:2 hasta 1:64 (por ser un virus con un título no muy elevado).

Mientras se están preparando las diluciones del antígeno, se inactivan el suero control (+) y el suero control (-) a 56°C 30 minutos.

Efectuar lo siguiente:

a).- Añadir a todas las cavidades con pipeta calibrada 0.025 ml de GVB (solución de trabajo).

b).- Con otra pipeta calibrada agregar 0.025 ml de suero control (+) en cada cavidad de la primera hilera vertical de la placa. Con los mi

crodilutores hacer diluciones desde 1:4 hasta 1:128. Descartar de la última cavidad 0.025 ml

c).- Adicionar a cada cavidad de la primera hilera horizontal 0.025 ml de la dilución de antígeno 1:2, a las cavidades de la segunda hilera horizontal 0.025 ml de la dilución de antígeno 1:4, y así sucesivamente hasta la dilución 1:64 del antígeno.

d).- Se corre un control de poder anticomplementario del suero positivo y para ello en una fila de cavidades donde ya hay diluciones desde 1:4 hasta 1:128 se añade a cada cavidad 0.025 ml de GVB.

e).- Para el control del antígeno de positividad conocida, se corren en otra hilera de pozos diluciones de suero positivo desde 1:4 hasta 1:128, agregando a cada cavidad 0.025 ml del antígeno positivo conocido previamente titulado y usado a su dilución óptima.

f).- Para control del tejido con el suero positivo se corren en otra hilera de cavidades diluciones del último desde 1:4 hasta 1:128 y se añaden 0.025 ml del tejido.

g).- Para el control de eritrocitos sensibilizados colocar en dos cavidades 0.075 ml de GVB.

h).- A todas las cavidades de la placa, excepto donde está el control de eritrocitos, se les añade 0.025 ml de complemento diluído conteniendo 2U.

En otra placa se corren los controles del complemento para comprobar que se están usando 2U de éste en la prueba, probando diluciones del antígeno, suero (+), suero (-), antígeno de positividad conocida y tejido contra diferentes concentraciones de complemento (2, 1.5, 1.0 y 0.5 U).

Las diluciones del complemento se preparan siguiendo el cuadro que se indica a continuación.

CUADRO No. 10

Complemento 2U	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
GVB	0.5 ml	1.0 ml	1.5 ml

Unidades obtenidas 1.5 U 1.0 ml 0.5 U

i).- A las cuatro cavidades de la primera hilera horizontal añadirles 0.025 ml de la dilución de antígeno 1:2, a la segunda hilera 0.025 ml de la dilución de antígeno 1:4 y así sucesivamente hasta la dilución 1:64. Agregar a cada cavidad 0.025 ml de GVB.

j).- Para los controles complemento-suero se coloca en cuatro cavidades 0.025 ml de suero -- positivo diluido 1:8 y 0.025 ml de GVB.

k).- Controles complemento-antígeno de po-- sitividad conocida. A cuatro cavidades ponerles -- 0.025 ml del antígeno usado a su óptima dilución y 0.025 ml de GVB.

l).- Controles complemento-tejido. A cua-- tro cavidades adicionarles 0.025 ml del extracto de -- tejido y 0.025 ml de GVB.

m).- Controles complemento-GVB. A cua-- tro pozos añadirles 0.050 ml de GVB (Ver figuras 1 y 2).

Adicionar a todas las cavidades complemen-- to en la siguiente forma:

n).- A cada una de las cavidades de la pri-- mera hilera vertical agregarles 0.025 ml de la di-- lución de complemento que contenga 2U; a la segun-- da hilera vertical 0.025 ml de la dilución de com-- plemento que contenga 1.5U, a la tercera hilera -- vertical 0.025 ml de la dilución de complemento -- que contenga 1.0U y a la cuarta hilera 0.025 ml de la dilución de complemento que contenga 0.5U.

o).- En esta placa correr el control del --

suero negativo poniendo en cada cavidad 0.025 ml - de una dilución del suero 1:8, 0.025 ml de antígeno (diluido desde 1:2 hasta 1:64), y 0.025 ml de complemento (2U). Este suero también se corre frente al extracto de tejido, colocando 0.025 ml de la dilución 1:8 del suero, 0.025 ml de tejido y 0.025 ml de complemento (2U).

p).- Agitar perfectamente las placas, cubrir las con papel parafilm y dejarlas a 4°C toda la noche.

q).- Al día siguiente sacarlas del refrigerador y dejarlas a temperatura ambiente 15 minutos. Preparar eritrocitos sensibilizados en volumen suficiente para toda la prueba y agregar a cada cavidad con pipeta calibrada 0.050 ml. Agitar las placas removiendo el botón de eritrocitos e incubarlas en estufa de 37°C, 15 a 30 minutos ó hasta que los controles del complemento muestren adecuado grado de hemólisis. Durante este periodo de incubación las placas se agitan cada diez minutos. Al cabo de este tiempo se sacan de la estufa y se llevan a refrigeración (4°C) unos 10 a 15 minutos para que las células no lisadas se sedimenten. Para facilitar la sedimentación es conveniente centrifugar las placas unos 3 minutos a 2,000 rpm, y las placas están ya listas para leerse.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

La más alta dilución de antígeno que muestre fijación 3+ o 4+ frente a la más alta dilución de suero positivo representa una unidad; usar dos unidades en la prueba de los sueros problema.

Los cálculos para la obtención de las unidades requeridas son los siguientes:

$$\text{Dilución de trabajo} = \frac{\text{Título del antígeno}}{\text{No. de unidades deseadas}}$$

Ejemplo: si el título del antígeno fue de 1:64 esto representa IU, y 2U serán $\frac{64}{2} = 32$

Interpretación de los controles de complemento: Las cavidades que contienen 2.0 y 1.5 unidades deberán mostrar hemólisis total, las que contienen 1.0 U de complemento, hemólisis total o parcial y las que contienen 0.5 unidades no deben mostrar hemólisis en grado apreciable. Si las cavidades que contienen 0.5U de complemento muestran hemólisis, un exceso de complemento se ha usado en la prueba, y si las que contienen 2.0 y 1.5U respectivamente no muestran hemólisis total, se usó en la prueba insuficiente cantidad de complemento.

5).- PRUEBA DE FIJACION DE COMPLEMENTO.

Los pasos a seguir son:

a).- Poner a inactivar los sueros problema, el suero control positivo y el suero control negativo a 56°C durante 30 minutos.

b).- En las filas impares de cavidades se efectúan las reacciones de los sueros problema con el antígeno (2U) y en las hileras pares el control de anticomplementaridad de cada problema.

c).- Medir 0.025 ml de GVB en todas las hileras y a la primera cavidad de cada par de filas adicionarles 0.025 ml de suero problema, hacer las diluciones seriadas desde 1:2 hasta 1:64. Lo anterior se hace para cada suero que se va a correr.

d).- A las hileras reacción (impares) añadirles 0.025 ml de antígeno diluido a (2U) y 0.025 ml de complemento (2U).

e).- A los controles de anticomplementaridad del suero en lugar de antígeno se les agrega 0.025 ml de GVB y 0.025 ml de complemento (2U).

f).- Para comprobar que los anticuerpos presentes en las reacciones positivas son frente a CMV y no frente a las proteínas del tejido que se

empleó para la obtención del virus, se corre un -- control con cada suero problema, con el suero po-- sitivo conocido y con el suero negativo conocido, colo-- cando 0.025 ml del suero diluído 1:2 respectivamen-- te y 0.025 ml de un extracto del tejido en que se -- cultivó el virus y 0.025 ml de complemento (2U).

En toda prueba debe correrse un control -- positivo y un control negativo para poder comparar con los resultados obtenidos en los sueros proble-- ma.

g).- Para el control del suero positivo co-- conocido hacer en tres hileras de cavidades diluciones desde 1:4 hasta 1:128; a la primera hilera agregarle 0.025 ml de antígeno (2U) y 0.025 ml de comple-- mento (2U). A la segunda hilera 0.025 ml de GVB y 0.025 ml de complemento (2U). A la tercera hi-- lera 0.025 ml de tejido y 0.025 ml de complemen-- to (2U).

h).- Hacer lo mismo para el control nega-- tivo.

i).- Para el control de eritrocitos sensibi-- lizados en dos cavidades colocar 0.075 ml de GVB.

En otra placa se corren los controles del -- complemento de la misma manera que se realizó -- en la titulación del antígeno (Ver figuras 1 y 2).

j).- Control complemento-antígeno.

k).- Control complemento-suero positivo.

l).- Control complemento-suero negativo: a cuatro cavidades ponerles 0.025 ml de suero negativo diluído 1:8 y 0.025 ml de GVB.

m).- Control-complemento-suero problema: a cuatro cavidades añadirles 0.025 ml de suero problema diluído 1:8 y 0.025 ml de GVB.

n).- Control complemento-GVB. (Ver figs. 1 y 2).

En las pruebas de diagnóstico de rutina los controles del complemento con el suero positivo, suero negativo y suero problema pueden omitirse.

Los resultados que deberán observarse en los controles del complemento (diferentes unidades) son los ya descritos en la titulación del antígeno.

o).- Agitar las placas, taparlas con papel-parafilm y dejarlas a 4°C toda la noche.

p).- Al siguiente día sacarlas del refrigerador y dejarlas a temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos. Preparar eritrocitos sensibilizados en volumen suficiente y añadir a cada cavidad 0.050 ml.

Agitar las placas removiendo el botón de eritrocitos e incubarlas a 37°C, 15 a 30 minutos o hasta que el grado de hemólisis sea el adecuado en los controles. Llevarlas a refrigeración (4°C) unos 10 a 15 minutos, o bien centrifugar a 2,000 rpm durante tres minutos y leer.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Para tener la seguridad de que la interpretación de los resultados es correcta deberá estar perfectamente bien formado el botón de eritrocitos en los controles de glóbulos rojos, así como el grado de hemólisis en los controles de complemento, en caso contrario debe repetirse la prueba incluso la titulación del complemento. Los controles positivo y negativo deberán tener lectura correcta, así como también el control de tejido.

Si los resultados en todos los controles son satisfactorios se leerán los títulos de cada suero problema anotando como resultado la dilución máxima en la cual se presente fijación 3+ o 4+ del complemento.

Los sueros que presentaron anticomplementaridad se trataron siguiendo la técnica de Takatsky. Se adiciona un volumen de complemento de cobayo fresco a tres volúmenes de suero problema, la mezcla se deja a 4°C toda la noche y al día siguiente se incuba a 37°C durante 30 minutos. Hacer dilu-

ción 1:4 o 1:8 del suero problema, inactivarlo a --
60°C por 30 minutos e iniciar la prueba de fijación
de complemento una vez más; si reincide la anti- --
complementaridad se considera negativo a la prueba.

TITULACION del ANTIGENO

		DILUCIONES DE SUERO POSITIVO					
		1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
DILUCIONES DE ANTIGENO	1:2	→					
	1:4			Cada pozo contiene:			
	1:8			0.025 ml. de suero (+) 0.025 ml. de antígeno 0.025 ml. de C' conteniendo 2 U			
	1:16						
	1:32						
	1:64						
CONTROL DEL SUERO	SUERO (+) GVB C' 2 U	0.025 ml. 0.025 ml. 0.025 ml. →					
CONTROL DE UN ANTIGENO POSITIVO CONOCIDO	SUERO (+) AG (+)* C' 2 U	0.025 ml. 0.025 ml. 0.025 ml. →					
CONTROL DE TEJIDO	SUERO (+) TEJIDO 1:8 C' 2 U	0.025 ml. 0.025 ml. 0.025 ml. →					

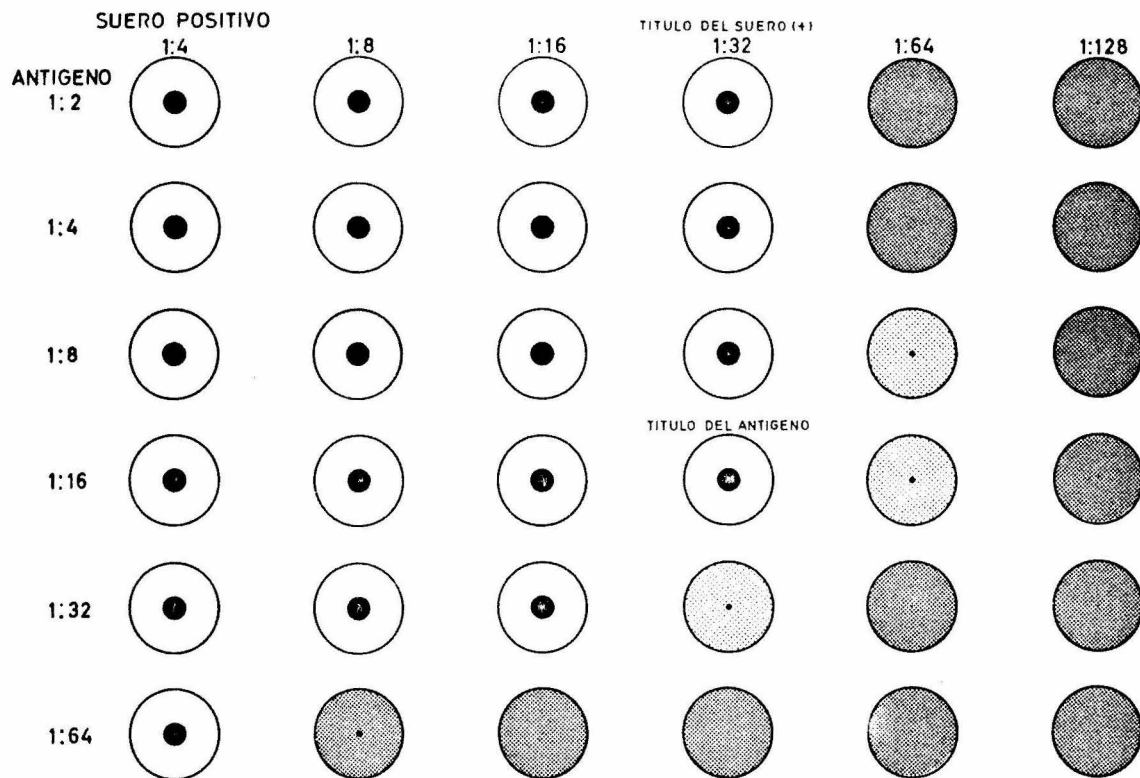
CONTROLES DE COMPLEMENTO

		2 U	1.5 U	1.0 U	0.5 U	SUERO NEGATIVO DILUIDO 1:8
CONTROLES C'-ANTIGENO	ANTIGENO 1:2 GVB COMPLEMENTO	0.025 ml. 0.025 ml. 0.025 ml. →				0.025 ml. Suero (-) 0.025 ml. Ag 1:2 0.025 ml. C'
	ANTIGENO 1:4 GVB COMPLEMENTO	0.025 ml. 0.025 ml. 0.025 ml. →				0.025 ml. Suero (-) 0.025 ml. Ag 1:4 0.025 ml. C'
	ANTIGENO 1:8 GVB COMPLEMENTO	0.025 ml. 0.025 ml. 0.025 ml. →				0.025 ml. Suero (-) 0.025 ml. Ag 1:8 0.025 ml. C'
	ANTIGENO 1:16 GVB COMPLEMENTO	0.025 ml. 0.025 ml. 0.025 ml. →				0.025 ml. Suero (-) 0.025 ml. Ag 1:16 0.025 ml. C'
	ANTIGENO 1:32 GVB COMPLEMENTO	0.025 ml. 0.025 ml. 0.025 ml. →				0.025 ml. Suero (-) 0.025 ml. Ag 1:32 0.025 ml. C'
	ANTIGENO 1:64 GVB COMPLEMENTO	0.025 ml. 0.025 ml. 0.025 ml. →				0.025 ml. Suero (-) 0.025 ml. Ag 1:64 0.025 ml. C'
CONTROL C'-ANTIGENO CONOCIDO	Antígeno Posi- tivo conocido* GVB COMPLEMENTO	0.025 ml. 0.025 ml. 0.025 ml. →				0.025 ml. Suero (-) 0.025 ml. Ag conocido 0.025 ml. C'
CONTROL C'-TEJIDO 1:8	TEJIDO GVB COMPLEMENTO	0.025 ml. 0.025 ml. 0.025 ml. →				0.025 ml. Suero (-) 0.025 ml. Tejido 0.025 ml. C'
CONTROL C'- GVB	GVB COMPLEMENTO	0.050 ml. 0.025 ml. →				0.025 ml. Suero (-) 0.025 ml. GVB 0.025 ml. C'
CONTROL C'-SUERO	SUERO(+)1:8 GVB COMPLEMENTO	0.025 ml. 0.025 ml. 0.025 ml.				
CONTROL DE ERITROCITOS SENSIBILIZADOS	GVB	0.075 ml.	0.075 ml.			

*LOTE DE ANTIGENO PREVIAMENTE TITULADO Y EMPLEADO A SU OPTIMA DILUCION.

INCUBAR A 4° C TODA LA NOCHE Y AL DIA SIGUIENTE AGREGAR 0.050 ml. DE ERITROCITOS SENSIBILIZADOS A CADA CAVIDAD.

INTERPRETACION DE LA TITULACION DE ANTIGENO



Prueba de Diagnóstico • Microtécnica

		DILUCION DEL SUERO					CONTROL DE TEJIDO
		1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	
ENSAYO DEL SUERO PROBLEMA	PRUEBA	Suero problema ANTIGENO 2 U C' 2 U	0.025 ml. 0.025 ml. → 0.025 ml.				0.025 ml. suero problema 1:8 0.025 ml. tejido 0.025 ml. C' 2 U
	CONTROL DEL SUERO	Suero problema GVB C' 2 U	0.025 ml. 0.025 ml. → 0.025 ml.				
ENSAYO DEL SUERO POSITIVO CONOCIDO	PRUEBA	SUERO (+) ANTIGENO 2 U C' 2 U	0.025 ml. 0.025 ml. → 0.025 ml.				0.025 ml. suero (+) 1:8 0.025 ml. tejido 0.025 ml. C' 2 U
	CONTROL DEL SUERO	SUERO (+) GVB C' 2 U	0.025 ml. 0.025 ml. → 0.025 ml.				
ENSAYO DEL SUERO NEGATIVO CONOCIDO	PRUEBA	SUERO (-) ANTIGENO 2 U C' 2 U	0.025 ml. 0.025 ml. → 0.025 ml.				0.025 ml. suero (-) 1:8 0.025 ml. tejido 0.025 ml. C' 2 U
	CONTROL DEL SUERO	SUERO (-) GVB C' 2 U	0.025 ml. 0.025 ml. → 0.025 ml.				
CONTROL DE ERITROCITOS SENSIBILIZADOS		GVB	0.075 ml.	0.075 ml.			

CONTROLES DE COMPLEMENTO

		C' 2 U	C' 1.5 U	C' 1.0 U	C' 0.5 U
CONTROLES C'-ANTIGENO	ANTIGENO 2 U GVB COMPLEMENTO	0.025 ml. 0.025 ml. 0.025 ml. →			
CONTROL C'-SUERO PROBLEMA*	SUERO 1:8 GVB COMPLEMENTO	0.025 ml. 0.025 ml. 0.025 ml. →			
CONTROL C'-SUERO POSITIVO*	SUERO (+) 1:8 GVB COMPLEMENTO	0.025 ml. 0.025 ml. 0.025 ml. →			
CONTROL C'-SUERO NEGATIVO*	SUERO (-) 1:8 GVB COMPLEMENTO	0.025 ml. 0.025 ml. 0.025 ml. →			
CONTROL C'- GVB	GVB COMPLEMENTO	0.050 ml. 0.025 ml. →			

* LOS CONTROLES C'-SUERO PUEDEN SER OMITIDOS DE LA PRUEBA DE DIAGNOSTICO DE RUTINA.

INCUBAR A 4° C TODA LA NOCHE, Y AL DIA SIGUIENTE AGREGAR 0.05 ML. DE ERITROCITOS SENSIBILIZADOS A CADA CAVIDAD.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

TITULO DE
ANTICUERPOS
EN UN SUERO POSITIVO



1:4



1:8



1:16



1:32



1:64



1:128

CONTROL DE
ANTICOMPLEMENTARIDAD



1:4



1:8



1:16



1:32



1:64



1:128

SUERO
PROBLEMA
NEGATIVO



1:4



1:8



1:16



1:32



1:64



1:128

CONTROL DE
ANTICOMPLEMENTARIDAD



1:4



1:8



1:16



1:32



1:64



1:128

SUERO
PROBLEMA
NEGATIVO



1:4



1:8



1:16



1:32



1:64



1:128

CONTROL DE
ANTICOMPLEMENTARIDAD



1:4



1:8



1:16



1:32



1:64



1:128

CONTROL DE GVB



CONTROL DE
CELULAS SENSIBILIZADAS



MATERIAL BIOLOGICO

El trabajo se realizó con 408 muestras de sangre obtenidas - por punción venosa en forma estéril. Estas muestras son representativas de diferentes poblaciones del estado de Chiapas y fueron proporcionadas para este estudio por el Dr. Fernando Beltrán, Director del Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste (CIES). Todos los sueros fueron separados en el Laboratorio del CIES en San Cristóbal de las Casas, Chiapas, y congelados fueron transportados por - vía aérea a la Ciudad de México. En el Laboratorio de Virología de la I.M.A.N. se conservaron a -20°C hasta el momento de la prueba.

CUADRO No. 1

PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS ESTUDIADAS

Población	No. de habitantes.	Número de muestras	% del total	% de la población total
Villa de Acala	13,000	96	23.5	0.74
Villa de Motozintla	28,000	68	16.7	0.24
Villa de Arriaga	27,000	89	21.8	0.33
Villa de Río Florindo, Pto. Madero y José Ma. Morelos.	3,106	95	23.3	3.06
Lacanjá	120	60	14.7	50.00
TOTAL		408	100.0	0.57

La fluctuación de edades se muestra en el Cuadro No. 2

Cuadro No. 2

Grupo de edad	No. de muestras	% del Total
0 - 5 años	20	4.9
6 - 14 años	181	44.4
15 - 44 años	176	43.1
45 ó + años	31	7.6
TOTAL	408	100.0

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

Se practicó titulación cuantitativa de anticuerpos frente al CMV por el método de FC a 408 muestras de suero sanguíneo, y se consideró que un título de anticuerpos correspondiente a la dilución 1:8 protege contra la re-infección.

Se encontró una frecuencia elevada de anticuerpos fijadores del complemento tanto en hombres como en mujeres de los grupos humanos estudiados, según puede verse en el Cuadro No. 5 La presencia de anticuerpos contra CMV tiene que estar asociada al antecedente de infección natural por este virus, ya que hasta ahora no se ha utilizado en nuestro país ningún material inmunizante específico.

La diferencia de seropositividad entre individuos del sexo masculino y del sexo femenino (80.2% y 78% respectivamente) no es significativa; en estudios realizados por diversos investigadores en otros grupos humanos (Cuadro No. 6), llama la atención que se encontró en todos los casos una mayor seropositividad en mujeres, si bien parece haber diferencia significativa (22.4%) sólo en el estudio de Luby y Shasby.

Si comparamos nuestros resultados globales (Cuadro No. 4) analizados por grupos de edad,

con los resultados de encuestas realizadas en las ciudades de Seattle y Dallas en los Estados Unidos de Norteamérica y en Huixquilucan, Estado de México, observamos el mismo aumento progresivo de seropositividad a medida que aumenta la edad del individuo. Sin embargo, en los grupos del estado de Chiapas encontramos una seropositividad bastante alta desde los primeros años de vida (80% en el grupo de menores de cinco años), pero debe tomarse en cuenta que solamente se probaron veintinueve sueros y que algunos de ellos podían contener anticuerpos residuales heredados de la madre. También llama la atención la baja incidencia de individuos seropositivos en el estudio de Huixquilucan, inferior a la comunicada en los trabajos de Seattle y Dallas. La baja seropositividad en esta población relativamente cercana a la Ciudad de México y a su área de influencia, no es fácil explicarla sobre la base de un aislamiento geográfico y ecológico que en realidad no parece existir ni entre los lacandones, grupo humano que efectivamente estuvo aislado en forma casi total durante largo tiempo. Las cifras de seropositividad en 60 pobladores de Lacanja, muestra que constituye el 50% de la población total de esa localidad, hacen difícil sostener ese argumento para explicar los resultados en Huixquilucan y, por otra parte, no presentan una diferencia significativa con las cifras promedio obtenidas por nosotros en diferentes grupos humanos del estado de Chiapas.

A pesar de que en esta serie el número de sueros probados en los grupos de menores de cinco años o más son relativamente pequeños (20 y

31 respectivamente), según se observa en el Cuadro No. 2, las cifras globales de seropositividad son congruentes con las de los otros grupos y presentan la ya mencionada tendencia hacia elevarse en los grupos de mayor edad.

De los resultados obtenidos en esta encuesta serológica parece desprenderse que el CMV es un virus ubicuo ampliamente diseminado en la naturaleza y fácilmente transmisible, tal vez a partir de individuos infectados pero asintomáticos principalmente. Bluestone y cols han encontrado diferencias serológicas entre individuos con enfermedad de inclusión citomegálica e individuos infectados pero asintomáticos, y presentan como posible explicación el que las infecciones asintomáticas en mujeres embarazadas y en recién nacidos sean producidas por una cepa de virus diferente de la que ocasiona el llamado síndrome post-transfusional; también cabría la posibilidad de que el virus se mantenga en estado de latencia, a partir de una exposición primaria, y que en tales individuos se estableciera una condición de portador crónico capaz de diseminar el agente patógeno aún en ausencia aparente de actividad viral.

Desgraciadamente no se dispone de mayor información epidemiológica para llegar a una explicación más completa. En el caso particular de La canjá, resulta difícil invocar mecanismos de transmisión del virus diferentes al contacto directo; la posibilidad de inoculación del virus por la vía transfusional seguramente puede eliminarse, vía que ha

sido invocada frecuentemente como mecanismo de transmisión (Perhan y col, Monif y col, Langenhuisen y col, Kantor y col).

En Inglaterra se ha estado trabajando activamente desde hace 10 años en la preparación de una vacuna efectiva CMV, con la cual se espera proteger principalmente a las mujeres en etapa reproductiva para reducir la frecuencia de casos congénitos con lesiones de tipo cerebral. A falta de un conocimiento integral de la seroepidemiología de este padecimiento en México, los resultados de esta encuesta serológica parecen indicar que el nivel de protección inmunológica es elevado, por lo cual el uso de un inmunizante específico tal vez tendría poco impacto en el panorama general del problema.

CUADRO No. 4

PREVALENCIA DE ANTICUERPOS FC CONTRA CMV
EN DIVERSOS ESTUDIOS POR GRUPOS DE EDAD

Grupos de Edad	Total de Sueros	Estudio de Seattle Positivos		Total de Sueros	Estudio de Dallas Positivos		Total de Sueros	Estudio de Huixquilucan Positivos		Total de Sueros	Estudio de Chiapas Positivos	
		No.	%		No.	%		No.	%		No.	%
0 - 5	0						176	32	18,2	20	16	80

5 - 14	631	119	18,9	62	13	21	428	61	14,3	181	131	72,4

15 - 17							36	9	25,0	37	29	78,4

18 - 14	3262	1233	37,8	66	32	48,5				139	118	84,9

45 6 +	931	684	73,5	67	43	64,2				32	27	87,1

CUADRO No. 5

PREVALENCIA DE ANTICUERPOS FC CONTRA CMV
EN HOMBRES Y MUJERES

Población	No. de casos Mujeres	No. de Posi- tivos	%	No. de casos hombres	No. de Posi- tivos	%	Diferencia (M - H)
Villa de Acala	58	40	69.0	38	29	76.3	- 7.3
Villa de Moto- zintla	36	30	83.3	32	30	93.7	-10.4
Villa de Arria- ga	55	40	72.7	34	24	70.6	- 2.1
Villa de Río - Florido, Pto. Madero y Eji- do J. Ma. Mo- relos	61	52	85.2	34	26	76.5	- 8.7
Lacanjá	36	29	80.6	24	21	87.5	- 6.9
TOTAL	246	191	78.1	162	130	80.9	- 2.7

CUADRO No. 6

CUADRO COMPARATIVO DE PREVALENCIA DE
ANTICUERPOS FC CONTRA CMV EN DIVERSOS
ESTUDIOS

Población	No. de casos Mujeres/hombres	Prevalencia de anticuerpos FC (%)			Diferencia	Referencia
		Total	Mujeres	Hombres		
Easter Island	152/161	76.0	80.3	71.4	8.9	Haldane y col
Seattle	1928/2896	42.2	44.2	40.9	3.3	Wentworth y col
West Berlin	463/102	46.4	47.1	43.1	4.0	Henneberg y col
Dallas	109/86	45.1	55.0	32.6	22.4	Luby y Shasby
Huixquilucan	333/307	15.9	19.2	12.4	6.8	Golubjatnikov y col.
Chiapas	246/162	78.7	78.1	80.9	-2.7	



CAPITULO IV

CONCLUSIONES

1).- El virus de inclusión citomegálica es un virus ampliamente diseminado, según se demuestra por la elevada prevalencia de individuos con anticuerpos específicos, aún en comunidades aparentemente aisladas como es el caso de Lacanjá.

2).- La infección por el virus parece iniciarse desde edad muy temprana, y aumenta paulatinamente su incidencia, lo cual se refleja en el incremento de seropositividad en los grupos de mayor edad.

3).- En los grupos estudiados la transmisión del virus se realiza muy probablemente por la vía directa, ya que resulta difícil invocar otros mecanismos como el transfusional.

4).- Se requiere información epidemiológica sobre malformaciones congénitas y causas de mortalidad perinatal para correlacionar con los niveles de aparente protección inmunológica y así evaluar el riesgo real de infección in útero.

5).- El método de F.C. en microplaca ofrece un medio rápido, preciso y relativamente sencillo para determinar la condición inmunitaria

contra CMV a través de la detección de anticuerpos específicos fijadores del complemento.

6).- Se requiere más información tanto de laboratorio como epidemiológica para establecer con mayor seguridad la magnitud de este problema, tanto en las propias comunidades objeto de esta encuesta como en el resto de nuestro país.

7).- No parecen existir actualmente condiciones que justifiquen la necesidad de desarrollar a corto plazo una vacuna efectiva contra este virus.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alexander, E.R. Maternal and neonatal infection with cytomegalovirus in Taiwan. Pediatric Research 1:210, 1967.
- 2.- Baron, J., Youngblood, L., Siewers, C.M.F. - The incidence of cytomegalovirus, herpes simplex, rubella, and toxoplasma antibodies in microcephalic, mentally retarded, and normocephalic children. Pediatrics 44:932, 1969.
- 3.- Barrett, T. James. Inmunología. Ed. Interamericana. 4a Edición, 1972.
- 4.- Benyesh-Melnick, M., Vonka, V., Probstmeyer, F. y Wimberly. Human CMV: properties of the complement-fixing antigen. J. Immunol. 96: 261, 1966.
- 5.- Benyesh-Melnick, M., Rosenberg, H.S., Watson, B. Viruses in cell cultures of kidneys of children with congenital heart malformations and other diseases. Proc. Soc. Exp. Biol. Med 117:452, 1964.
- 6.- Bernstein, M.T., Stewart, J.A. Indirect hemagglutination test for detection of antibodies to cytomegalovirus. Appl. Microbiol. 21:84, 1971.
- 7.- Birnbaum, G., Lynch, J. I., Margileth, A.M., Lonergan, W.M., Sever, J.L. Cytomegalovirus infections in newborn infants. Pediatrics 75:789, 1969.

- 8.- Black, P. H., Hatley, J.W., Rowe, W.P. Isolation of a cytomegalovirus from African Green Monkey. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112:601, 1963.
- 9.- Bluestone, R., Goldberg, L.S., Tucker, S.M., Stern, H. Serological studies in asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. Arch. Dis. Child. 48:738, 1973.
- 10.- Campbell, H.D., Garvey, S.J., Cremer, E. - N., Sussdorf, H.D. Methods in immunology. -- Ed. W.A. Benjamin, INC, 1963, pág. 244.
- 11.- Chambers, R.W. Propagation and purification - of high titer human cytomegalovirus. Appl. Microbiol. 22:914, 1971.
- 12.- Collaborative study. Cytomegalovirus infection - in the North West of England. A report on a - two-year study. Arch Dis. Child. 45:513, 1970.
- 13.- Crawford, L.V. y Lee. The nucleic acid of huuman cytomegalovirus. Virology 23:105, 1964.
- 14.- Dreesman, G.R. y Benyesh-Melnick. Spectrum of human cytomegalovirus complement-fixing anutigens. J. Immunol. 99:1106, 1967.
- 15.- Elek, S.D. Letter: vaccination against cytoume-galovirus? Lancet I:171, 1974.
- 16.- Embil, J.A., Haldane, E.V., Mac Kenzie, E. A.E. Prevalence of cytomegalovirus infection in a normal urban population in Nova Scotia. Canad.

Med. Ass. J. 101:730, 1969.

- 17.- Fenner, F.J., White, D.O. Virología Médica. La Prensa Médica, Edición 1973, pag. 244.
- 18.- Frenkel, J.K. Letter: cytomegalovirus infection and toxoplasma. Am. J. Dis. Child. -- 126:860, 1973.
- 19.- Golubjatnikov, R., Allen, V.D., Steadman, -- M., Blancarte Olmos, M.P., Inhorn, S.L. -- Prevalence of antibodies to Epstein-Barr virus, cytomegalovirus and toxoplasma in a mexican highland community. Am. J. Epidemiol. 97:116, 1973.
- 20.- Goodheart, C.R., Mc Allister, R.M., Filbert, J.E. DNA synthesis and migration in infected-cells studied autoradiographically. Virology -- 23:603, 1964.
- 21.- Gordon L.B. Lo esencial de la Inmunología. -- Ed. El Manual Moderno, S.A. Segunda Edición, 1975.
- 22.- Hanshaw, J.B. Clinical significance of cytomegalovirus infection. Post. Grad. Med. 35:472 1964.
- 23.- Hanshaw, J.B., Betts, R.E., Simon, N., -- Boynton, R.C. Acquired cytomegalovirus infection. Association with hepatomegaly and abnormal liver function tests. New. Engl. J. Med. 272:602, 1965.

- 24.- Hanshaw, J.B. Congenital and acquired cytomegalovirus infection. *Ped. Clin. N. Amer.* - 13:279, 1966a.
- 25.- Hanshaw, J.B. Cytomegalovirus complement-fixing antibody in microcephaly. *New. Engl. J. Med.* 275:476, 1966b.
- 26.- Hanshaw, J.B., Steinfeld, H.J., White, C.J. Fluorescent-antibody test for cytomegalovirus-macroglobulin. *New. Eng. J. Med.* 279:566, - 1968.
- 27.- Henle, W.G., Henle, M., Scriba, C.R., Joyner, F.S., Harrison R., Paloheimo, Klemola, E. Antibody responses to the Epstein Barr virus and cytomegaloviruses after open heart -- and other surgery. *N. Engl. J. Med.* 282:1068 1970.
- 28.- Hildebrandt, R.J. Sever, J.L., Margileth, -- A.M., Callagan, D.A. Cytomegalovirus in -- the normal pregnant woman. *Am. J. Obstet. - Gynecol.* 98:1125, 1967.
- 29.- Horsfall, F.L. y Tamm. Viral and Ricketssial infections of man. J.B. Lipincott company, -- Philadelphia. Edición 1965, pag. 926.
- 30.- Jack, I., Mc Auliffe, K.C. Sero-epidemiological study of cytomegalovirus infections in Melbourne children and some adults. *Med. J. -- Aust.* I:206, 1968.
- 31.- Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg, E.A. -

Manual de Microbiología Médica. 4a. Edición.
El Manual Moderno, S.A. México, 1970, 166.

- 32.- Kantor, G.L., Goldberg, L.S., Johnson, --
B.L., Derechin, M.M., Barnett, E.U. Immuno-
logic abnormalities induced by postperfusion
cytomegalovirus infection. *Annals of Internal --
Medicine* 73:553, 1970.
- 33.- Klemola, E., Von Essen, R., Wager, O., Hal-
tia, K., Koiviniemi, A. Salmi, I. Cytomega-
lovirus mononucleosis in previously healthy in-
dividuals: five new cases and follow-up of thir-
teen previously published cases. *Annals of Inter-
nal Medicine* 71:11, 1969.
- 34.- Lang, D.J. Noren, B. Cytomegaloviremia fo-
llowing congenital infection. *J. Pediatric.* 73:
812, 1968..
- 35.- Langenhuisen, M.M.A.C., Kapsenberg, J.G.
Demonstration of IgM cytomegalovirus-anti- --
bodies as an aid to early diagnosis in adults.
Clin. Exp. Immunol. 6:387, 1970.
- 36.- Langenhuisen, M.M.A.C. Antibodies against --
gamma globulin after blood transfusion and cy-
tomegalovirus infection. *Clin. Exp. Immunol.*
9:393, 1971.
- 37.- Leinikki, P., Heinonen, K., Pettay, O. Inci-
dence of cytomegalovirus infections in early --
childhood. *Scand. J. Infect Dis.* 4:1, 1972.
- 38.- Lennette, E.H., Schmidt, N.J. C Editores --

- 1969 Diagnostic procedures for viral and rickettsial infections. American Public Health Association, Inc. 4th. Edition. N.Y., 701.
- 39.- Luby, M.D., James, M.D., Shasby, D.M. A sex difference in the prevalence of antibodies to cytomegalovirus. *Jama* 222:1290, 1972.
- 40.- Luria, S.E., Darnell, J.E. General Virology. Second Edition. John Wiley and Sons, Inc., N.Y., 1967.
- 41.- Mc Allister, R.M., Ribbert, J.E., Goodheart, C.R. Human CMV. Studies on the mechanism of viral cytopathology and inclusion body formation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124:932, 1967.
- 42.- Mc Cracken, G.H., Shinefield, H.R. Immunglobulin concentrations in newborn infants with congenital cytomegalic inclusion disease. *Pediatrics* 36:933, 1965.
- 43.- Mc Dougall, J.K. Letter: vaccination against CMV? *Lancet* I:135, 1974.
- 44.- Medearis, D.N. Observations concerning human cytomegalovirus infection and disease. *Bull Hopkins Hosp.* 114:181, 1964.
- 45.- Monif, G.R., Hildebrandt, M.D., Weber, J.-M. Prevalence of complement-fixing antibodies to cytomegalovirus in a semirural southern country. *Am J. Obstet. Gynecol.* 108: 372, 1970.

- 46.- Monif. G.R., Adams, W.R., Flory, L.F. - - Complement-fixing antibodies to the AD-169 - strain of cytomegalovirus in banked blood. - Transfusion 14:58, 1974.
- 47.- Mundo Médico. El mundo de los niños. Vol. II, No. 17, 1975.
- 48.- Nagington, J. Cytomegalovirus antibody pro- - duction in renal transplant patients. J. Hyg. - (Camb.) 69:645, 1971.
- 49.- Numazaki, Y., Yano, N., Morizuka, T. Pri- - mary infection with human cytomegalovirus: - virus isolation from healthy infants and preg- - nant women. Amer. J. Epidem. 91:410, 1970.
- 50.- Perham, T.G.M., Caul, E.O., Conway, P.J. Mott, M.G. Cytomegalovirus infection in blood donors. A prospective study Journal of Haema- tology 20:307, 1971.
- 51.- Prince, A.M., Szmuness, W., Millian S.J., David, D.S. A serologic study of cytomegalo- virus infections associated with blood transfu- sions. N. Eng. J. Med. 284:1125, 1971.
- 52.- Rasmussen, Rapp y Melnick, B. The immuno- fluorescent focus technique in studying the re- plication of cytomegalovirus. J. Immunol. - 91:709, 1963.
- 53.- Rhodes, A.J. y Van Rooyen. Textbook of viro- logy for students and practioners of Medicine- and other health sciences. 5th Edition, 1970, pag. 405.

- 54.- Rowe, W.P., Hatley, J.W., Waterman, S., -
Turner, H.C. Huebner, R.J. Cytopathogenic -
agent resembling human salivary gland virus -
recovered from tissue cultures of human ade-
noids Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92:418, --
1956.
- 55.- Sever, J.L., Huebner, R.J., Castellano, G.
A. Serologic diagnosis "en masse" with mul-
tiple antigens. Amer. Rev. Resp. Dis. 88:342,
1963.
- 56.- Sinha, S.K., Pauls, F.P. Cytomegalovirus -
complement-fixation antibody responses in Es-
kimo families. Pediatrics 48:157, 1971.
- 57.- Sprecher - Goldberg, S., Thiry, L., Lefebvre,
N., Dekegel, D., Halleux, F. Complement fi-
xation antibodies to adenovirus-associated vi-
ruses, adenoviruses, cytomegaloviruses and -
herpes simplex viruses in patients with tumors
and in control individuals. Am. J. Epidemiol.
94:351, 1971.
- 58.- Schmidt, N.J. - Tomado de: Habel y Salz-
man, M.P. Fundamental techniques in Virolo-
gy. Academic Press. New York and London,
1969, pag. 263.
- 59.- Starr, J.G., Bart, R.D., Gold, E. Inappa-
rent congenital cytomegalovirus infection. N.
Engl. J. Med. 282:1075, 1970.
- 60.- Stern, H., Elek, S.D. The incidence of in-
fection with cytomegalovirus in a normal po--

- pulation. A serologic study in Greater London. J. Hyg. (Camb) 63:79, 1965.
- 61.- Stern, H., Tucker, S.M. Cytomegalovirus -- infection in the newborn and in early childhood, three atypical cases. Lancet 2:1268, 1965.
- 62.- Stiehm, E.R., Fundenberg, H.H. Serum levels of immune globulins in health and disease: a survey. Pediatrics 37:715, 1966.
- 63.- Talmadge, D.W., Freter, G.G., Taliaferro, W.H. The effect of repeated injections of -- sheep red cells on the hemolytic and combining capacities of rabbit antiserums. J. Infect. Dis. 98:293, 1956.
- 64.- Vestergaard, B.F., Hornsleth, A., Pedersen, S.N. Occurrence of herpes and adenovirus antibodies in patients with carcinoma of the cervix uteri. Cancer 30:69, 1972.
- 65.- Vonka, V. y Benyesh-Melnick. Thermoinactivation of human cytomegalovirus. J. Bacteriol. 91:221, 1966.
- 66.- Wager, O., Rasanen, J.A., Hagman, A., -- Klemola, E. Mixed cryoglobulinaemia in infectious mononucleosis and cytomegalovirus mononucleosis. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol 34:345, 1968.
- 67.- Weller, T.H. McAulley, J.C., Craig, J.M. Wirth, P. Isolation of intranuclear inclusion -- producing agents from infants with illnesses --

- resembling diseases inclusion cytomegalic. --
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 94:4, 1957.
- 68.- Weller, T.H. Hanshaw, J.B. Virologic and --
clinical observations in cytomegalic inclusion-
disease. N. Engl. J. Med. 266: 1233, 1962.
- 69.- Wentworth, B.B., Alexander, E.R. Seroespi-
demiology of infections due to members of the
herpes virus group. Am. J. Epidemiol. 94: -
496, 1971.
- 70.- Wenzel, R.P., Mc Cormick, D.P., Davies, -
J.A., Berling, C., Beam, W.E. Cytomegalo-
virus infection: A Seroepidemiologic study of-
a recruit population. Am. J. Epidemiol, 97:
410, 1973.
- 71.- Wright, H.T., Goodheart, C.R. Human CMV:
Morphology by negative staining. Virology 23:
419, 1964.