



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**"DETERMINACION DE ANTICUERPOS SERICOS
ANTIRRUBEOLA EN HUMANOS POR
INMUNDENSAYOS EN FASE SOLIDA"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

UBALDO SAAVEDRA ROSAS



México, D. F.

1985



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

RESUMEN	1
INTRODUCCION	
Necesidad del diagnóstico de laboratorio de las infecciones virales y del conocimiento de la - protección inmune	2
Estrategias y técnicas utilizadas en el diagnóstico de laboratorio y determinación de la protección inmune	4
Virus de rubeola	8
Técnicas utilizadas en el diagnóstico de rubeola	11
Técnica seleccionada en este trabajo	14
Planteamiento del problema	16
Objetivo	16
MATERIAL Y METODOS	
Material biológico	17
Soporte sólido	19
Cuantificación de proteínas del antígeno de rubeola	20
Estimulación de síntesis de anticuerpos contra rubeola con la vacuna Cendevax en humanos	20
Obtención de eritrocitos de pollo y preparación de la solución utilizada en la titulación por - hemaglutinación de los antígenos de rubeola	21
Titulación del antígeno por hemaglutinación (HA)	21
Tratamiento del suero para remover inhibidores - inespecíficos y aglutinantes	23

Determinación de anticuerpos séricos en humanos contra rubeola por IHA	23
Determinación de anticuerpos séricos en humanos contra rubeola por DIG-ELISA	24
Determinación de anticuerpos séricos en humanos contra rubeola por NC-ELISA	26
Determinación de anticuerpos séricos en humanos contra rubeola por ELISA	28
RESULTADOS	
Selección del antígeno de rubeola	29
Determinación de las condiciones óptimas de tra- bajo para la anti IgG humana-peroxidasa	29
Selección del cromógeno en los inmunoensayos - DIG-ELISA, NC-ELISA y ELISA	30
Adhesión del antígeno a la fase sólida en la téc- nica DIG-ELISA	31
Determinación de anticuerpos antirrubeola por - DIG-ELISA	33
Determinación de anticuerpos antirrubeola por - NC-ELISA	35
Selección del soporte en la técnica ELISA	36
Determinación de las condiciones óptimas de tra- bajo en ELISA	38
Determinación de anticuerpos antirrubeola por - ELISA	42
Comparación de los resultados obtenidos con las técnicas de ELISA e IHA	42
Cálculo para la determinación de sueros positivos y negativos en la técnica de ELISA	46

DISCUSION	52
APENDICE	
Preparación de las soluciones de trabajo	57
Reactivos	60
BIBLIOGRAFIA	62

R E S U M E N

Se estudió el sistema ELISA (Inmunoensayo-Enzimático) y sus variantes DIG-ELISA (Difusión en Gel-Inmunoensayo-Enzimático) y NC-ELISA (Nitrocelulosa-Inmunoensayo-Enzimático) en la determinación de anticuerpos séricos antirubeola.

Se utilizaron como antígenos, la vacuna viva atenuada antirubeola cepa Cendehill; hemaglutinina de rubeola Behring y el virus de la rubeola cepa Therien propagado en células Vero, obtenido en el laboratorio y purificado parcialmente.

No fue posible adaptar a dicha determinación las técnicas DIG-ELISA y NC-ELISA; sin embargo, con la ELISA se obtuvieron resultados satisfactorios.

Se determinó la concentración de anticuerpos antirubeola en 90 sueros por la ELISA y la técnica utilizada como referencia la IHA; al comparar ambas técnicas se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.799.

Se encontró especificidad del 65.3% y sensibilidad del 95% para la técnica ELISA. El nivel de significancia se determinó con un 95% de confiabilidad.

INTRODUCCION

NECESIDAD DEL DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE LAS INFECCIONES
VIRALES Y DEL CONOCIMIENTO DE LA PROTECCION INMUNE

El interés por el diagnóstico de laboratorio en las infecciones virales se ha incrementado en los últimos años, debido, en parte, a que se dispone de drogas antivirales específicas que facilitan el control de la infección en la fase temprana - - (Buchanan, et. al., 1979).

Para algunas infecciones es indispensable contar con la información que se obtiene en el laboratorio. Frecuentemente, infecciones ocasionadas por diferentes virus presentan los mismos síntomas, imposibilitando así, el diagnóstico diferencial. - Quizá el caso más común lo presenten las infecciones respiratorias de origen viral, debido a que son causadas por seis familias de virus diferentes y todas ellas pueden ocasionar el mismo cuadro clínico (Gordon, 1979). Sin embargo, actualmente - se dispone de drogas antivirales que inhiben la multiplicación específica de algunos de estos virus, por lo que se requiere - de la identificación precisa del agente etiológico (Landry, - et. al., 1983).

Un diagnóstico oportuno es de gran utilidad, ya que posibilita la prescripción del tratamiento adecuado que debe dársele al - paciente, así como las medidas de protección que deben implantarse al personal hospitalario y a la comunidad (Osborn, 1979).

Por otra parte, el conocer la protección inmune (nivel de anticuerpos séricos) de una población para determinada infección - es un parámetro que se utiliza en la evaluación de las campañas de vacunación; sólo con este conocimiento es factible planearlas razonablemente, asimismo, el conocer la prevalencia de los niveles de anticuerpos de una infección, ayuda a conocer - la incidencia en aquellas infecciones, principalmente para las cuales no se dispone de estadísticas confiables (Osborn, 1979).

Las técnicas utilizadas tradicionalmente en el diagnóstico de laboratorio y en la determinación de la protección inmune, requieren de equipo y material costoso, de personal entrenado, - lo que dificulta su accesibilidad para la mayoría de los laboratorios de los países en desarrollo. Otro inconveniente fundamental es que el tiempo necesario para la obtención de los - resultados es de varios días, limitando así su utilización en diagnóstico y sirviendo, por lo general, sólo para estudios retropectivos.

Este tipo de inconvenientes ha favorecido el desarrollo de técnicas rápidas de laboratorio, para el diagnóstico de las infecciones virales. La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha definido como "técnicas de diagnóstico rápido en infecciones - virales" a aquellas que dan resultados satisfactorios en pocas horas (de 4 a 8 h) a diferencia de las técnicas convencionales que requieren hasta de varios días (World Health Organization, 1981). El diagnóstico viral rápido ofrece muchas ventajas sobre los métodos convencionales, entre ellas: a) La identificación oportuna del agente viral responsable de una infección, - ayuda a prevenir infecciones nosocomiales y su extensión por - contacto, principalmente aquellas infecciones que son asintomáticas, o aquellas que presentan síntomas atípicos como en el - caso de las infecciones por hepatitis B, herpes y rubeola. - - b) El manejo apropiado del paciente basado en el diagnóstico - rápido de dichas enfermedades, permite una reducción en la morbilidad y mortalidad. c) La facilidad en el manejo del material biológico, debido a que estas técnicas no se fundamentan en la multiplicación viral, por lo que no requieren de partículas infecciosas (Gardner, 1977; World Health Organization, 1981; Landry, et. al., 1983).

ESTRATEGIAS Y TECNICAS UTILIZADAS EN EL DIAGNOSTICO DE LABORATORIO Y DETERMINACION DE LA PROTECCION INMUNE

Las estrategias que se utilizan en el diagnóstico de laboratorio y determinación de la protección inmune, en las infecciones virales son de dos tipos: el método directo, en el cual se efectúa el aislamiento e identificación del virus o de sus componentes y el método indirecto, en el cual la identificación del agente infeccioso se hace determinando la respuesta inmune, que presenta el organismo a la infección viral (Schmidt, 1979; Stagno, 1979).

Para ambos métodos de diagnóstico, en los últimos años, se ha enfatizado en la utilización de técnicas inmunológicas y de biología molecular, en virtud de que se obtienen resultados confiables en pocas horas.

Métodos Directos

a) Aislamiento del virus

El aislamiento del virus de muestras clínicas se logra a través de su multiplicación en los sistemas biológicos de experimentación siguientes: cultivos celulares, embriones de pollo y animales de laboratorio.

Desde 1949, Enders, Weller y Robbins publicaron su importante descubrimiento de que los poliovirus podían ser estudiados en células cultivadas con la producción de cambios citológicos reconocibles; casi todo virus humano conocido se ha cultivado en esta forma, y se han aislado e identificado cientos de virus previamente desconocidos. El descubrimiento de los adenovirus, virus ECHO, rinovirus y coronavirus es atribuido al uso de células cultivadas, así como también la revolución en el diagnóstico de las enfermedades virales, el desarrollo de vacunas - -

antipolio, antisarampión y antirrubeola y los avances recientes en la biología molecular de los virus de vertebrados.

Antes de 1950, cuando el impacto del cultivo celular en la virología comenzó a hacerse sentir, el huésped estándar para el cultivo de virus humanos fue el embrión de pollo, técnica implementada por Goodpasture en 1931. Casi todos los virus conocidos en esa época se cultivaron en células de una u otra de las membranas embrionarias, es decir, el amnios, el alantoides, el corion o el saco vitelino. El embrión de pollo se usa raramente en la actualidad para aislar virus.

Al igual que los embriones de pollo, los animales de laboratorio prácticamente han desaparecido en la actualidad de los laboratorios de diagnósticos, ya que los cultivos celulares son más fáciles de manejar y mucho más versátiles; sin embargo, los ratones lactantes siguen utilizándose para el aislamiento de algunos virus, Coxsackie y arbovirus (Fenner, 1976; Schmidt, 1979).

b) Visualización del virus

Desde hace 20 años la microscopía electrónica (ME) ha proporcionado información acerca de la morfología viral, esto ha conducido al conocimiento de nuevos virus y la asociación del reconocimiento de grupos virales con diferentes síntomas clínicos (Almeida, 1982).

Las técnicas desarrolladas más recientemente de inmunofluorescencia (IF) e inmunoperoxidasa (IP), han tomado actualmente posesión de muchos de los aspectos de rutina, para el diagnóstico viral utilizando la microscopía como fuente de información y el diagnóstico de los especímenes más comunes, y de algunos para los cuales no existen aún métodos estándar (Payment, et. al., 1975; Schmidt, et. al., 1981).

c) Determinación de la multiplicación viral por cambios originados en la célula

Los virus pueden afectar a las células en diferentes formas. - Los tres tipos de respuestas son: infección citocida, en la cual las células son muertas por el virus; infección no citocida de estado estacionario, en la cual las células producen virus pero su metabolismo no es afectado y la transformación celular, en la que el virus no mata a la célula pero altera permanentemente sus características (Fenner, 1976).

Todos estos cambios en las células infectadas, se deben a los efectos bioquímicos de los productos virales especificados. - Los cambios bioquímicos generalmente conducen a trastornos funcionales y eventualmente en muchos casos a cambios citopatológicos. La apariencia citológica del daño producido en cultivos celulares, por determinados virus es con frecuencia lo suficientemente característico como para que se pueda emplear como criterio diagnóstico. El efecto citopático (ECP) del virus se debe a la acción destructora de productos del genoma viral en el metabolismo celular.

Mientras algunos virus producen cambios en las membranas celulares, otros dan como resultado la fusión de células infectadas con sus vecinas no infectadas, formando sincicios (células gigantes con muchos núcleos), otros virus producen cuerpos de inclusión. Dependiendo de los virus que los causa, tales inclusiones pueden ser simples o múltiples, grandes o pequeñas, redondas o de forma irregular, intranucleares o intracitoplásmicas, acidofílicas o basofílicas. Los cuerpos de inclusión virales más importantes son las inclusiones citoplásmicas encontradas en células infectadas por poxvirus, paramixovirus, reovirus y el virus de la rabia; y las inclusiones intranucleares producidas por virus herpes y adenovirus (Fenner, 1976).

d) Determinación de la presencia de componentes virales

La cuantificación de componentes virales en células, tejidos y fluidos corporales a diferentes tiempos después de la infección, pueden utilizarse en el diagnóstico de las infecciones virales (Anderson, 1983).

De los componentes virales, los que se han utilizado comúnmente en el diagnóstico de laboratorio son: proteínas virales, enzimas específicas codificadas por el virus y los ácidos nucleicos.

Las proteínas codificadas por el genoma viral pueden ser determinadas en células o fluidos corporales cuando se dispone de anticuerpos en contra de éstas (Anderson, 1983). Las enzimas específicas codificadas por el virus pueden identificarse midiendo la actividad enzimática (Gronowitz, 1983). La presencia de los ácidos nucleicos (DNA o RNA), se pueden determinar por hibridización o por geles de agarosa (Bornkamm, et. al., 1983).

Métodos Indirectos

Los métodos indirectos se basan en la respuesta inmune del huésped a la infección viral. En éstos se determina la concentración de las inmunoglobulinas antivirales.

Una primoinfección se diagnostica midiendo la concentración de IgM mientras que en una segunda infección se determina el incremento de la concentración de IgG.

La determinación de las inmunoglobulinas se hace por medio de la detección de la interacción antígeno-anticuerpo. Las técnicas comúnmente utilizadas son la fijación de complemento (FC), neutralización (N), inhibición de la hemaglutinación (IHA) e inmunodifusión (ID).

La sensibilidad de dicha interacción se puede incrementar si

a uno de los componentes de la reacción se le acopla un marcador que pueda determinarse a bajas concentraciones; los marcadores generalmente utilizados son: fluoresceína en la técnica de inmunofluorescencia (IFA); isótopos radiactivos en la técnica de radioinmunoensayo (RIA) y enzimas en la técnica de inmunoensayo-enzimático (ELISA) (Shannon, et. al., 1966; Schmidt, 1979; Baumgarten, 1980).

VIRUS DE RUBEOLA

En el presente trabajo, se eligió estudiar el virus de la rubeola por presentar características que lo hacen accesible para el trabajo de laboratorio y por tener relevancia en los efectos clínicos a saber:

- a) El virus de la rubeola causa una infección exantemática benigna y su importancia radica en el hecho de producir efecto teratogénico, el cual puede inducir un 80% de malformaciones en el feto cuando la madre adquiere la infección en el primer trimestre del embarazo.
- b) Por el hecho de que la vacunación protege de la infección, lo hace un agente de bajo riesgo para su manejo en el laboratorio.
- c) El virus puede propagarse en cultivos celulares, lo que facilita la obtención de antígeno viral en cantidades considerables.
- d) No existe hasta el momento una técnica sencilla para detectar el virus en secreciones, por lo que el diagnóstico de la infección debe hacerse en base a una elevación en el nivel sérico de IgM o IgG antirubeola.

El virus de la rubeola ha sido clasificado como un miembro del

grupo de los Togavirus (rubivirus), de acuerdo a las características físicas y químicas que se presentan en la Tabla 1.

En la actualidad se ha encontrado un solo tipo serológico en el virus de la rubeola, asimismo, las distintas cepas del virus de rubeola no presentan reacción cruzada con los miembros de otros grupos virales (Rhodes, et. al., 1977).

Morfología:	Esférico, superficie con proyecciones
Tamaño:	50-70 nm de diámetro
Acido nucléico:	RNA, hebra simple
Peso molecular del ácido nucléico:	3.5×10^6 daltons
Envoltura:	Presente
Coefficiente de sedimentación:	280 S
Densidad de flotación:	1.18-1.20 g/ml
Radiación ultravioleta:	Destruye infectividad
Tripsina:	Destruye infectividad
Solventes lipídicos:	Destruyen infectividad
Estabilidad de pH:	6.8-8.1
Temperatura:	Se inactiva a 56°C, es estable por - más de 7 días a 4°C y por años a -60°C

Tabla 1. ALGUNAS CARACTERISTICAS DE VIRIONES DE RUBEOLA (Rhodes, et. al., 1977; Parkman, et. al., 1978)

El virión de la rubeola está compuesto de tres proteínas E_1 , E_2 y C con aparentes pesos moleculares de 60,000, 47,000 y 33,000 respectivamente. Dos de estas proteínas, E_1 y E_2 son glucoproteínas de membrana mientras que C es la nucleoproteína. Una de las principales propiedades biológicas del virus de rubeola es su capacidad para aglutinar eritrocitos de diferentes especies animales; esta propiedad se ha utilizado para titular al virus; los anticuerpos en contra del virus interfieren con el

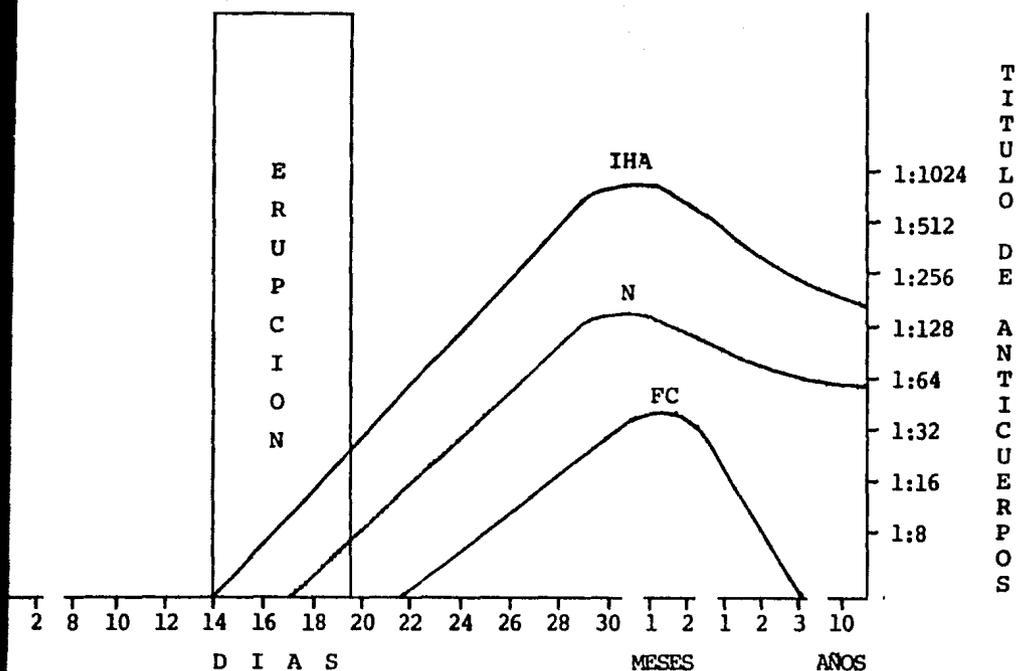
fenómeno de la hemaglutinación, por lo que por medio de esta - interferencia es posible también titular los anticuerpos anti-rubeola. A la protefna E₁ se le ha asociado la función hemaglutinante, aunque aún hay controversia al respecto (Van, 1981; Oker-Blom, et. al., 1983; Waxham, 1983).

La infección natural por rubeola estimula la producción de varios anticuerpos. Estos pueden ser demostrados en el laboratorio por N, FC e IHA. La demostración de la presencia de estos anticuerpos se ha utilizado fundamentalmente en el diagnóstico de laboratorio de esta infección.

El primer tipo de anticuerpos que aparecen son los que inhiben la hemaglutinación. Estos son detectados después de 15-16 - - días de la exposición del virus y alcanzan título máximo a - - los 30 días; declinan lentamente y probablemente permanecen ni veles detectables de por vida (Fig. 1).

Los anticuerpos FC aparecen después de 30 días de exposición, sus niveles se elevan lentamente y no alcanzan un título máximo hasta 1-2 meses, después de dicha exposición declinan constantemente llegando a desaparecer a los pocos años.

Los anticuerpos N aparecen después de 18 días de exposición. - Su incremento, aproximadamente paralelo al de los anticuerpos IHA, se eleva rápidamente, alcanzando un título máximo cerca - de 35 días después de la exposición y declinan lentamente permaneciendo detectables de por vida (Rhodes, et. al., 1977).



g. 1. Respuesta de anticuerpos en una infección primaria de rubeola.

TECNICAS UTILIZADAS EN EL DIAGNOSTICO DE RUBEOLA

El diagnóstico de rubeola es difícil de establecer con base en el cuadro clínico, excepto durante las epidemias. Muchos virus, entre ellos virus ECHO, virus Coxsackie, adenovirus, paramixovirus y reovirus pueden ocasionar un cuadro clínico similar al que se presenta en la rubeola.

La única manera de establecer un diagnóstico seguro de rubeola es en el laboratorio.

Las pruebas para determinar la presencia de anticuerpos - -

antirrubeola, han permanecido disponibles cerca de 20 años. - Entre las pruebas utilizadas se encuentran N, FC e IHA. La prueba de IHA es aún usada por la mayoría de los laboratorios, sin embargo, ésta tiene inconvenientes considerables, tales como, el requerir de diluciones y tratamiento del suero para retirar los inhibidores no específicos, antígeno requerido en altas concentraciones, algunos reactivos empleados son perecederos y los resultados obtenidos en diferentes laboratorios son difíciles de comparar (Liebhaber, 1970; Schmidt, 1970; Traavik, et. al., 1981).

En los últimos años, diferentes equipos comerciales se han empleado para determinar anticuerpos antirrubeola. Algunos de ellos utilizan la IHA, otros técnicas que se han desarrollado en forma reciente como: hemaglutinación indirecta (HI), aglutinación en latex (AL), ELISA, IFA y RIA (Castellano, et. al., 1981; Sever 1982).

Los principios de los seis métodos comúnmente utilizados en los equipos comerciales, son los siguientes:

IHA

El virus de rubeola tiene la capacidad de aglutinar eritrocitos de ciertas especies animales. Si el suero de un paciente contiene anticuerpos y es mezclado con el virus de la rubeola, los anticuerpos bloquearán la superficie del virus y al adicionar los eritrocitos posteriormente, la aglutinación se inhibirá. - Esto es llamado inhibición de la aglutinación. El suero es diluido seriadamente para determinar el título de anticuerpos, - esto es, aquella dilución máxima en la cual aún inhiba la aglutinación el virus (Sever, 1982).

IH

El virus de rubeola se une previamente a eritrocitos que - -

normalmente no aglutina. Cuando se adiciona un suero que contiene anticuerpos, éstos hacen puentes entre el virus y eritrocitos adyacentes causando la aglutinación. Sin anticuerpos, - la aglutinación no ocurre. El suero es diluido seriadamente, para determinar el título de anticuerpos (Gaidamovich, et. al., 1974; Sever, 1982).

AL

En este ensayo el virus de la rubeola se une previamente a partículas finas de latex. Cuando hay anticuerpos presentes en el suero, éstos se mezclan con las partículas y la aglutinación - se hace aparente en forma de grandes masas blancas (Sever, 1982).

ELISA

Esta prueba consiste en unir el virus de la rubeola a una superficie sólida (microplacas de plástico o pequeños cuerpos globulares de la misma naturaleza). El suero del paciente se adiciona y si hay anticuerpos, éstos se unen al virus. En seguida se adicionan anti-inmunoglobulinas humanas, obtenidas de un animal experimental y previamente conjugadas a una enzima, las cuales se unen a los anticuerpos. Finalmente, al agregar un sustrato apropiado, la enzima actuará sobre éste, transformándolo y desarrollando una reacción colorida, la cual puede ser percibida a simple vista y cuantificada mediante espectrofotometría, debido a que la concentración del producto presenta una relación directamente proporcional a la unión del complejo antígeno-anticuerpo (Engvall, et. al., 1971; Yolken, 1980; Sever 1982).

IFA

Se infectan, con virus de rubeola, células cultivadas sobre una base de cristal, para ello se usa comúnmente portaobjetos. El suero del paciente se añade y si hay anticuerpos presentes,

éstos se unen al virus. Una anti-inmunoglobulina humana obtenida en un animal experimental, se adiciona después y se une a los anticuerpos. Esta anti-inmunoglobulina se ha unido previamente a un químico, el cual fluoresce en presencia de luz ultravioleta. El título de anticuerpos corresponde al inverso - de la máxima dilución del suero que fluoresce y la lectura se hace con la ayuda de un microscopio con luz ultravioleta o - - bien, la intensidad de la fluorescencia determinada por medio de espectrofotometría especial (Johansson, et. al., 1979; - - Sever, 1982).

RIA

Esta prueba es muy similar a las pruebas de ELISA e IFA, la diferencia está en que la anti-inmunoglobulina humana preparada en un animal experimental, es unida a un radioisótopo. La desintegración del radioisótopo es cuantificada y el título de anticuerpos se infiere (Sever, 1982).

En la actualidad existen más de 20 equipos comerciales para determinar anticuerpos antirrubeola. Los valores son reportados en una variedad de términos dependiendo del método utilizado. Los valores del título de anticuerpos antirrubeola que indican inmunidad, utilizando la IHA, varían de 8 a 20; un resultado - se considera negativo cuando dicho título es menor a estos valores y por lo tanto el individuo es susceptible a la infección (Sever, 1982).

TECNICA SELECCIONADA EN ESTE TRABAJO

La elección del método para resolver un problema particular de serodiagnóstico es determinado por varios factores, tales como, la naturaleza del antígeno y de los anticuerpos; así como también la sensibilidad, especificidad, precisión, costo y - - -

simplicidad con la que es llevada a cabo la técnica (Elwing, 1980).

Nuestro estudio se restringió a los inmunoensayos en fase sólida. En este tipo de ensayos se cuantifican los antígenos o anticuerpos por medio de la reacción específica antígeno-anticuerpo cuando uno de los componentes de la reacción, el que no va a determinarse, se encuentra adherido a una fase sólida de diversa naturaleza (Voller, et. al., 1979). Se han utilizado varios soportes tales como: partículas de celulosa, poliacrílamida, vidrio microcristalino y plástico. Sin embargo, estos soportes presentan el inconveniente de requerir la inversión de mucho tiempo por la necesidad de realizar varios lavados utilizando centrifugación.

Por el contrario, el uso de materiales prefabricados, tales como: tubos, esferas, discos y microplacas suprime la necesidad de la centrifugación y facilitan el lavado. Varios autores han utilizado todos estos formatos, moldeados de poliestireno, polipropileno, polivinil y otros plásticos (Voller, et. al., 1976).

En el presente estudio se consideró la técnica de ELISA y sus variantes DIG-ELISA (inmunoensayo enzimático-difusión en gel) y NC-ELISA (inmunoensayo enzimático-nitrocelulosa).

La técnica DIG-ELISA para determinación de anticuerpos, consiste en adherir a una fase sólida (cajas de petri de poliestireno) el antígeno. Una vez adherido el antígeno se agrega el suero del paciente, permitiendo que éste difunda a través de un gel, posteriormente se retira el gel y se adiciona un antianticuerpo al cual se le ha unido una enzima. El sustrato se disuelve en otro gel y se vierte sobre la caja; la reacción enzima-sustrato da como resultado una reacción coloreada y el área formada es proporcional a la concentración del sustrato transformado, es decir, a la actividad enzimática y ésta a su vez a la reacción

antígeno-anticuerpo (Elwing, 1979; 1980).

La técnica NC-ELISA utiliza como fase sólida membranas de nitrocelulosa (NC) a diferencia del soporte comúnmente utilizado en ELISA, microplacas de poliestireno (Palfree, 1982; - Bode, et. al., 1984).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la importancia clínica del virus de la rubeola, vemos la necesidad de contar con técnicas de laboratorio accesibles en nuestro medio que permitan tanto la evaluación de la protección inmune, como la demostración de un proceso activo de infección por medio del incremento en los niveles séricos de anticuerpos antirubeola.

Para la evaluación de la inmunidad existen varias técnicas inmunológicas, siendo la más empleada en la actualidad la IHA. - Esta técnica tiene inconvenientes considerables, tales como, - el requerir de diluciones y tratamiento del suero, antígeno a altas concentraciones, algunos de sus reactivos son perecederos y además los resultados obtenidos en diferentes laboratorios son difíciles de comparar. Hoy en día no se produce en México el antígeno y el hecho de que se requiera a altas concentraciones encarece considerablemente las determinaciones.

OBJETIVO

Desarrollar una técnica que permita determinar los anticuerpos antirubeola.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Antígenos:

- 1) Vacuna viva atenuada antirubeola, cepa Cendehill, nombre comercial Cendevax. Smith Kline and French, S.A., México. Lot. IL024H43. El liofilizado del frasco ampula contiene - no menos de 1000 DICT₅₀ de virus atenuados contra la rubeola, para su uso se reconstituyó en 0.2 ml de solución salina 0.15 M.
- 2) Antígeno de rubeola (hemaglutinina). Behring A.G. Marburg. W. Germany. Lot. A400141C. El antígeno liofilizado se reconstituyó en 1 ml de agua destilada estéril. Generalmente se obtuvieron títulos de 64-128 unidades hemaglutinantes - (UH) por 0.025 ml.
- 3) Virus de rubeola, cepa Therien (VRT), donada por el M.D. Olli Meurman del Departamento de Virología de la Universidad de - Turku, Finlandia. Esta cepa fue recibida en dos botellas - Falcon de 60 ml con células Vero (Fibroblastos de mono verde africano), infectadas con la cepa Therien del virus de la - rubeola. El medio de mantenimiento consistía de medio basal (BME), 0.2% de albúmina sérica bovina (ASB) y 5% de fosfato de Triptona.

La adaptación, propagación y concentración de este virus fue hecho por el M. en C. Enrique Ortega Soto, quien amablemente donó el antígeno utilizado en este trabajo.

El VRT se cultivó en células Vero, en medio mínimo esencial con 0.4% de ASB, 0.2% de nistatina y 0.1% de penicilina y - estreptomycin. Las cajas de cultivo se incubaron a 35°C en atmósfera húmeda y CO₂; durante 7 días aproximadamente se cosechó el medio. El medio cosechado se clarificó por centrifugación a 2000 g durante 15 min a 4°C, el sobrenadante

se concentró de acuerdo a Trudel, 1980; se mezclaron volúmenes iguales del sobrenadante y sulfato de amonio saturado - pH 7.4. Después de 2 h a 4°C, la mezcla se centrifugó a -- 2000 g durante 30 min. El precipitado se resuspendió en solución amortiguadora NTE (NaCl 0.15 M, Tris-HCl 0.05 M y - EDTA 0.001 M, pH 7.4).

Se determinó el contenido protéico a diferentes muestras de antígeno y la concentración promedio obtenida para cada una de las muestras fue: 0.4 mg/ml de la vacuna Cendevax; 2.2 - mg/ml de la hemaglutinina de Behring y 2.5 mg/ml del VRT.

La titulación de los antígenos se determinó rutinariamente y los títulos obtenidos promedio para las muestras fueron: menor de 4 UHA/ml de la vacuna Cendevax, 2560 UHA/ml de la hemaglutinina de Behring y 1920 UHA/ml del VRT.

Suero Humano:

Se utilizaron sueros humanos provenientes de tres diferentes - fuentes:

- 1) Quince muestras provinieron de sujetos adultos inmunizados con la vacuna Cendevax.
- 2) Treinta muestras de niños entre 1 y 10 años, población abierta, provinieron del Instituto Nacional de Pediatría (INP) y donadas amablemente por el M. C. Rubén Alvarez Chacón.
- 3) Cuarenta y cinco muestras provenientes de adultos, población abierta, del Hospital General Manuel Gea González. Los sueros se conservaron a -20°C de 2 a 4 semanas antes de titularse.

A todos los sueros se les determinó el título de anticuerpos - antirubeola por IHA. Este método se utilizó como referencia

para comparar el título de anticuerpos antirruabeola con los -
inmunoensayos utilizados en el presente trabajo. Los títulos
obtenidos fueron: 17 sueros con título de IHA menor de 4; 13
sueros con título de IHA de 4; 9 sueros con título de IHA de
8; 9 sueros con título de IHA de 16; 6 sueros con título de -
IHA de 32; 6 sueros con título de IHA de 64; 8 sueros con tí-
tulo de IHA de 128; 6 sueros con título de IHA de 256; 2 sue-
ros con título de IHA de 512 y 4 sueros con título de IHA ma-
yor de 512 (Ver Tabla 8).

Suero de Caballo:

Donado por la granja de la Facultad de Medicina Veterinaria y
Zootecnia de la U.N.A.M.

SOPORTE SOLIDO

Cajas de petri de poliestireno de 100 X 15 mm, para uso bacte-
riológico, Technicare, México, S.A.

Tiras de pozos removibles Immulon II, Cat. 011-010-3650, Lot.
C.R. 350, Laboratorios Dynatech, INC. U.S.A.

Filtro Millipore, Tipo HA, tamaño de poro 0.45 μ m, Cat. HAWP-
04700, Lot. H3C705444F, Millipore Intertech, INC. U.S.A.

CUANTIFICACION DE PROTEINAS DEL ANTIGENO DE RUBEOLA

La concentración de proteínas de los antígenos utilizados en el presente trabajo se determinó por el método de Lowry, et. al., 1951.

Para cada determinación se preparó una solución de referencia de ASB 1mg/ml en solución amortiguadora de fosfato salina (PBS).

Se hizo una curva estándar de ASB utilizando un rango de concentración de 0.025 a 0.500 mg/ml, las lecturas se hicieron por duplicado y en un volumen final de 0.2 ml.

La muestra problema se diluye 1:10, 1:50 y 1:100 en PBS.

Se adiciona, a cada uno de los tubos, 1 ml del reactivo A - - (Ver apéndice).

Se mezclan y se dejan reposar 10 min a temperatura ambiente.

Se agrega 0.1 ml del reactivo B a cada uno de los tubos.

Se mezclan inmediatamente y se dejan reposar 30 min. En un lapso de 30 min a 4 h se determinó la densidad óptica (DO) a 680 nm.

ESTIMULACION DE SINTESIS DE ANTICUERPOS CONTRA RUBEOLA CON LA VACUNA CENDEVAX EN HUMANOS

Se vacunó a quince sujetos adultos una dosis de la vacuna anti rubeola Cendevax por vía intramuscular, después de cinco semanas se tomó una muestra de sangre periférica por punción venosa, se dejó reposar a temperatura ambiente durante dos horas y una vez formado el coágulo se guardó toda la noche a 4°C, - -

posteriormente se centrifugó a 1500 g por 15 min a temperatura ambiente, se separó el suero y se conservaron a -20°C hasta su utilización por un tiempo no mayor de seis meses.

OBTENCION DE ERITROCITOS DE POLLO Y PREPARACION DE LA SOLUCION UTILIZADA EN LA TITULACION POR HEMAGLUTINACION DE LOS ANTIGENOS DE RUBEOLA

Se obtuvo sangre de pollos de un día de nacidos y no alimentados de la raza Rhode Island Red de la casa Armour, Hatchery de México, S.A. por punción cardiaca directa y se colectó en alsever en proporción 1:1; la sangre obtenida se mezcló agitando - la jeringa cuidadosamente para no producir hemólisis, después se pasó por una malla de gasa con el objeto de retener los - - coágulos que se formaron por no hacer una agitación correcta.

La sangre se colectó en un tubo de centrifuga graduado y se - centrifugó a 1500 g durante 10 min a temperatura ambiente. - Los eritrocitos obtenidos se conservaron en esta solución no - más de 4 días a 4°C ; después de ese tiempo se descartaron.

Para las pruebas de hemaglutinación e inhibición de la hemaglu tinación los eritrocitos se lavaron en auletta hasta retirar - completamente la hemoglobina, generalmente se hicieron de 3 a 4 lavados, se resuspenden en la auletta a una concentración - del 0.5% antes de utilizarse.

TITULACION DEL ANTIGENO POR HEMAGLUTINACION (HA)

El título de los antígenos utilizados en este trabajo se deter minó por el método de microtitulación de Stewart, et. al., 1967, utilizando eritrocitos de pollo de un día de nacidos. La titu lación se hizo por duplicado en cajas de microtitulación Cooke

de 96 cavidades de fondo tipo "V" como a continuación se describe:

Se colocan 0.025 ml de solución de auleta a partir del segundo pozo.

Se añaden 0.025 ml de la solución de antígeno en el primer y -segundo pozo, y a partir de este se hacen diluciones seriadas.

Se agregan 0.025 ml de una suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5% a cada uno de los pozos.

Se agita cuidadosamente y se deja reposar durante 60 min, a -temperatura ambiente protegiendo de vibraciones.

Se leen e interpretan los resultados.

En los pozos donde haya eritrocitos únicamente, no debe haber ninguna aglutinación (control de eritrocitos).

El título se toma como la recíproca de la última dilución que presenta aglutinación de los eritrocitos.

Para la titulación de los anticuerpos contra rubeola por inhibición de la hemaglutinación, se trabajó con el antígeno a una concentración de 4 unidades hemaglutinantes por 0.025 ml. Para obtener esta concentración se diluyó el antígeno en auleta de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Título del antígeno}}{\text{Concentración de UH deseadas}} = \frac{X}{4} \quad \text{Dilución } 1:X = 4\text{UH}$$

TRATAMIENTO DEL SUERO PARA REMOVER INHIBIDORES INESPECIFICOS Y
AGLUTINANTES

El tratamiento de los sueros se realizó de acuerdo al método - descrito por Clarke, 1958.

Se mezclan 0.2 ml de suero con 0.6 ml de caolín al 25% en auletta.

Se incuban durante 20 min a temperatura ambiente agitando ocasionalmente.

Se centrifugan a 1000 g durante 20 min.

Se adicionan 0.05 ml de eritrocitos de pollo de un día de nacido al 50% en auletta con ASB al 0.4%.

Se incuban durante 60 min a 4°C agitando cada 15 min.

Se centrifugan a 1000 g durante 20 min.

Se remueve el sobrenadante y se inactiva el complemento con - una incubación de 30 min a 56°C en baño maría. Este sobrenadante se utilizó en la prueba de IHA, con este tratamiento se diluyó en un factor de 4 el suero original.

Los sueros controles positivos y negativos se tratan de la misma manera y simultáneamente.

DETERMINACION DE ANTICUERPOS SERICOS EN HUMANOS CONTRA RUBEOLA
POR IHA

La prueba de IHA se determinó de acuerdo a las instrucciones - del equipo comercial de Behring para titulación de anticuerpos antirubeola.

La titulación se realizó en placas de microtitulación Cooke de 96 cavidades do fondo tipo "V" y de la siguiente manera:

Se ponen 0.025 ml de auletta con ASB 0.4% a partir del segundo pozo.

Se adicionan 0.025 ml del suero tratado en el primer y segundo pozo y a partir de este último se hacen diluciones seriadas.

Se adicionan en cada uno de los pozos 0.025 ml del antígeno a una concentración de 4 UH.

Se incuban 60 min a temperatura ambiente.

Se adicionan 0.025 ml de la suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5% en cada uno de los pozos.

Se incuban durante 60 min a temperatura ambiente y protegiendo de vibraciones.

Se leen e interpretan los resultados.

DETERMINACION DE ANTICUERPOS SERICOS EN HUMANOS CONTRA RUBEOLA
POR INMUNOENSAYO ENZIMATICO-DIFUSION EN GEL (DIG-ELISA)

Se intentó cuantificar los anticuerpos contra rubeola por DIG-ELISA de acuerdo al método descrito por Elwing, 1979. Se utilizaron cajas de petri de poliestireno Technicare 100 X 15 mm.

Se lavan las cajas de petri con etanol al 95% y se secan con ventilador.

El recubrimiento antigénico se realizó con 18 ml de solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M pH 9.6, la concentración de

proteína fue de 0.5 al 1 mg/caja y 0.2 ml de glutaraldehído al 25% a cada caja de petri.

Se incuban durante 60 min a temperatura ambiente y toda la noche a 4°C.

Se lavan dos veces con Tween 20 al 0.5% en solución amortiguadora de fosfato salina (PBST20).

Las cajas se secan con ventilador y se agregan 15 ml de agar - noble al 1% y suero de caballo al 1% en cloruro de sodio 0.15 M, a cada caja de petri y se deja reposar sobre una superficie plana a temperatura ambiente.

Una vez solidificado el agar se perforan pozos de 4 mm de diámetro y se agregan 0.02 ml del suero problema en cada uno de los pozos dejando incubar a 35°C en cámara húmeda durante 48 h.

Se retira el gel y se lavan 3 veces con PBST20.

Se agregan 10 ml de la anti IgG-peroxidasa 1:1000 en PBST20 y se dejan incubar 2 h a temperatura ambiente.

Se lavan 3 veces con PBST20.

Se agregan a cada una de las cajas, 10 ml de agarosa al 1% en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.0 con el cromógeno*.

Se incuban 20 min a temperatura ambiente protegiendo de la luz.

Finalmente el diámetro de los halos coloreados se miden con un vernier.

* Ortho tolidina (OT). Este cromógeno se preparó de acuerdo

a Ambroise, 1978. Se disuelven 21 µg de OT en 1 ml de dimetilformamida y se afora a 100 ml con solución amortiguadora de acetatos 0.1 M pH 3.7. En el momento de emplearse se agregan 0.05 ml de H₂O₂ al 30%.

Ortho fenilendiamina (OPD). Este cromógeno se preparó de acuerdo a Voller, et. al., 1976, OPD al 0.04% y H₂O₂** al 0.012% en solución amortiguadora de fosfato-citrato pH 5 (27.7 ml de fosfato de sodio dibásico 0.2 M, 24.3 ml de ácido cítrico 0.1 M, y 50 ml de H₂O).

**Se adiciona inmediatamente antes de utilizarse.

DETERMINACION DE ANTICUERPOS SERICOS EN HUMANOS CONTRA RUBEOLA POR INMUNOENSAYO ENZIMATICO-NITROCELULOSA (NC-ELISA)

El método utilizado para determinar anticuerpos contra rubeola por NC-ELISA fue el descrito por Bode, et. al., 1984.

Se recortan discos de 5 mm de diámetro de filtros Millipore (tipo HA, tamaño de poro 0.45 µm) y se transfieren dentro de los pozos de una placa para microtitulación de poliestireno de fondo plano.

Se agregan muestras de 0.005 ml de antígeno concentrado o antígeno control. Los discos sensibilizados se dejan secar durante toda la noche a temperatura ambiente.

Una vez secos los discos se incuban con 0.2 ml de ASB (grado V) 3% en PBS pH 7.2 durante 1 h a 37°C para bloquear los sitios que aún queden libres en el disco.

Se retira el ASB y se lavan los pozos con Tween 20 al 0.1% en

solución salina 0.15 M (SST20) durante 10 min a temperatura am
biente.

Se agrega 0.1 ml del suero problema en cada uno de los pozos y
se incuban 1 h a 37°C.

Se retira el suero y se lavan los pozos con SST20 diez veces.

Se agrega 0.1 ml de la anti IgG-peroxidasa 1:1000 en PBST20 a
cada uno de los pozos y se incuban durante 1 h a 37°C.

Se retira la anti IgG-peroxidasa y se lavan los pozos con SST20
diez veces.

Se agrega 0.1 ml del cromógeno* y se incuba 1 h a 37°C, se pro
tege de la luz.

La reacción se detiene al remover el sustrato residual lavando
5 veces con agua destilada.

Los discos presentan un color café el cual varía en intensidad
dependiendo de la cantidad de anti IgG-peroxidasa fijada a los
discos.

La evaluación final de los resultados se realiza después de -
secar los discos durante toda la noche, a temperatura ambiente.

* Diaminobenzidina (DB). Este cromógeno se preparó de acuerdo
a Yamamoto, 1982. DB al 0.05% y H₂O₂ al 0.01% en Solución -
amortiguadora Tris-HCl 0.05 M pH 7.6.

DETERMINACION DE ANTICUERPOS SERICOS EN HUMANOS CONTRA RUBEOLA
POR INMUNOENSAYO ENZIMATICO (ELISA)

El método utilizado para determinar anticuerpos contra rubeola por ELISA fue el descrito por Voller, et. al., 1975, modificado. Se utilizaron tiras de pozos removibles Immulon II.

Se coloca 0.1 ml del antígeno diluido 1:20 en solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M pH 9.6 en cada uno de los pozos y se incuba toda la noche a 4°C.

Se lavan los pozos con PBS cinco veces y se agrega 0.15 ml de ASB (fracción V) al 0.5% en PBS; se dejan incubar 90 min a - - 37°C.

Se lavan los pozos con PBST20 cinco veces y se agrega 0.1 ml - en cada uno de los pozos de las muestras de suero, se dejan in cubar 60 min a 37°C.

Se lavan los pozos con PBST20 cinco veces y se agrega 0.1 ml - en cada uno de los pozos de la anti IgG-peroxidasa 1:1000 en - PBST20 y se incuban 30 min a 37°C.

Se agrega 0.1 ml a cada uno de los pozos del cromógeno OPD al 0.04% y H₂O₂ al 0.012% en solución amortiguadora de fosfato - citrato pH 5 y se incuba 30 min a temperatura ambiente.

La reacción se detiene al agregar 0.05 ml de H₂SO₄ 3N.

Se determina la absorbancia (A) a 492 nm*.

* Las lecturas de A fueron realizadas en un Procesador de - - ELISA's, Behring M.

RESULTADOS

SELECCION DEL ANTIGENO DE RUBEOLA

En el laboratorio se propaga el VRT; su adaptación a la línea celular Vero requirió de varios pases ciegos, lo que implicó - varios meses de trabajo, además, su obtención es laboriosa por lo que se intentó inicialmente, utilizar antígeno comercial en las determinaciones de anticuerpos antirubeola.

Se trabajó con dos antígenos comerciales, vacuna antirubeola cepa Cendehill en las técnicas DIG-ELISA y NC-ELISA; y hemaglutinina de Behring en las técnicas DIG-ELISA, NC-ELISA y ELISA, sin embargo, en las determinaciones que se realizaron no se obtuvieron resultados satisfactorios, por lo que en experimentos posteriores se utilizó el VRT.

DETERMINACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DE TRABAJO PARA EL - CONJUGADO ENZIMATICO: ANTI IqG HUMANA-PEROXIDASA

Selección de la dilución de trabajo del conjugado enzimático.

En los primeros ensayos se trabajó con la técnica DIG-ELISA para la determinación de anticuerpos antirubeola, por lo que la selección del conjugado enzimático se hizo en base a los requerimientos ya mencionados de esta técnica.

Se probaron diferentes diluciones del conjugado enzimático: - 1:500; 1:1000; 1:1500; 1:2000 y se utilizaron tres diferentes cromógenos: o. fenilendiamina, o. tolidina y diaminobenzidina. Todos los cromógenos se trabajaron a una molaridad de 0.01.

La dilución 1:1000 del conjugado enzimático dió un resultado - satisfactorio, la coloración obtenida fue fácilmente visible e intensa. La dilución 1:500 del conjugado enzimático dió una - coloración muy intensa, mientras que la dilución 1:1500 dió -

una coloración tenue, lo que no permitió distinguir claramente el contorno de la zona de reacción antígeno-anticuerpo. La coloración se evaluó cualitativamente como puede verse en la - - Tabla 2.

Con base en estos resultados se decidió utilizar la enzima con jugada diluída 1:1000 en las determinaciones sucesivas.

El conjugado enzimático se conservó en forma concentrada a - - -20°C y su actividad no se alteró por más de un año.

Tabla 2

DETERMINACION CUALITATIVA EN DIG-ELISA DE LA INTENSIDAD DE COLOR DE LAS ZONAS DE REACCION.

CROMOGENO	DILUCION DE LA ANTI IgG HUMANA-PEROXIDASA			
	1:500	1:1000	1:1500	1:2000
Diaminobenzidina	+++	++	-	-
o. Fenilendiamina	++	++	+	-
o. Tolidina	+++	++	+	-

+++ = muy intenso; ++ = intenso; + = tenue; - = muy tenue

SELECCION DEL CROMOGENO EN LOS INMUNOENSAYOS DIG-ELISA, NC-ELISA, y ELISA

Los inmunoensayos utilizados en este trabajo pueden emplear diferentes cromógenos para la peroxidasa.

La técnica DIG-ELISA requiere de una clara visualización de la zona de reacción enzima-cromógeno con respecto al sustrato no -

transformado, el mejor resultado se obtuvo al utilizar la o. -
tolidina, los contornos de las zonas de reacción se distinguie
ron con claridad del fondo de la caja, debido a la coloración
azul resultante, a diferencia de la o. fenilendiamina y la dia
minobenzidina, cuya coloración amarilla y café pálida dificul-
ta la visualización de la reacción.

En la técnica NC-ELISA se seleccionó el cromógeno diaminobenzi-
dina, debido a que al ser transformado precipita y se adhiere
al soporte de nitrocelulosa.

En la técnica ELISA se eligió la o. fenilendiamina por razones
técnicas, debido a que el lector de ELISA's con el cual se tra-
bajó, tenía filtros para leer a 405 y 492 nm únicamente, y es
a esta última longitud de onda a la cual se lee dicho cromóge-
no.

ADHESION DEL ANTIGENO A LA FASE SOLIDA EN LA TECNICA DIG-ELISA

Inicialmente se probaron las condiciones óptimas de adhesión -
del antígeno a la fase sólida. Para esto se trabajó con los -
antígenos modelo: ASB y gelatina, y como fase sólida: cajas de
petri de poliestireno y cloruro de polivinilo.

La adhesión del antígeno a la superficie de la caja, se cuanti-
ficó por medio de la diferencia en la concentración de proteí-
nas, antes y después de poner las muestras en las cajas de pe-
tri.

Las condiciones probadas fueron: adhesión del antígeno en pre-
sencia o ausencia de glutaraldehído, en cajas de petri previa-
mente activadas o no activadas con polilisina.

Los resultados obtenidos indicaron que la adherencia depende -

de la naturaleza del plástico y del tipo de antígeno que se trate, pues como observamos en las Tablas 3 y 4 la ASB se adhirió mejor a las cajas de poliestireno, sin previa activación con polilisina y en presencia de glutaraldehído (32.8% de adhesión); mientras que la gelatina se adhirió mejor a las cajas de cloruro de polivinilo, previa activación con polilisina y en ausencia de glutaraldehído (33.3% de adhesión), por tal motivo, se decidió ensayar con el VRT parcialmente purificado y se observó que la mejor adhesión se logró al utilizar cajas de poliestireno en presencia de glutaraldehído obteniendo 22.9% de adhesión. Con base en estos resultados se decidió utilizar estas condiciones en experimentos posteriores.

Tabla 3

DETERMINACION DE LA ADHESION DE PROTEINAS A CAJAS DE PETRI DE POLIESTIRENO UTILIZANDO DIFERENTES CONDICIONES EN DIG-ELISA.

CAJAS PETRI (POLIESTIRENO)	CONCENTRACION DE PROTEINA *	CONCENTRACION DE PROTEINA **	ADHESION
	mg/ml	mg/ml	%
P ₁	0.146	0.098	32.8
P ₂	0.019	0.019	0.0
P ₃	0.125	0.114	8.8
P ₄	0.135	0.135	0.0
P ₅	0.003	0.003	0.0
T ₁	0.148	0.148	0.0
T ₂	0.022	0.022	0.0
T ₃	0.129	0.129	0.0
T ₄	0.138	0.138	0.0
T ₅	0.009	0.007	22.0

Concentración de proteínas ANTES (*) y DESPUES (**) de adherir las proteínas. P= poliestireno sin activar; T= poliestireno activado con polilisina; 1= ASB (0.5 mg/caja) + glutaraldehído 0.225%; 2= ASB (0.5 mg/caja); 3= glutaraldehído 0.225%; 4= gelatina (0.5 mg/caja) + glutaraldehído 0.225%; 5= gelatina (0.5 mg/caja).

Tabla 4

DETERMINACION DE LA ADHESION DE PROTEINAS A CAJAS DE PETRI DE CLORURO DE POLIVINILO UTILIZANDO DIFERENTES CONDICIONES EN DIG-ELISA.

CAJAS PETRI (CLORURO DE POLIVINILO)	CONCENTRACION DE PROTEINA *	CONCENTRACION DE PROTEINA **	ADHESION
	mg/ml	mg/ml	%
C ₁	0.148	0.148	0.0
C ₂	0.022	0.022	0.0
C ₃	0.129	0.129	0.0
C ₄	0.138	0.136	1.4
C ₅	0.009	0.009	0.0
V ₁	0.157	0.148	5.7
V ₂	0.184	0.184	0.0
V ₃	0.129	0.125	3.1
V ₄	0.138	0.138	0.0
V ₅	0.009	0.006	33.3

C= cloruro de polivinilo sin activar; V= cloruro de polivinilo activado con polilisina; 1, 2, 3, 4, 5, (*), (**) igual que en la Tabla 3.

DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTIRRUBEOLA POR DIG-ELISA

El siguiente objetivo fue intentar establecer las condiciones óptimas de trabajo para la cuantificación de anticuerpos anti-rubeola por la técnica DIG-ELISA.

Se utilizó el VRT parcialmente purificado y como antígeno control, sobrenadante de células no infectadas (SCT) y medio mínimo esencial (MME); todos ellos a dos concentraciones distintas. Los sueros de referencia para rubeola utilizados fueron: uno -

con título de 4 por IHA (suero negativo) y otro con título de - 128 por IHA (suero positivo) diluidos 1:50, 1:200, 1:500 y - - 1:2000.

Los resultados se muestran en la Tabla 5, como podemos observar, no se encontró diferencia significativa entre los diámetros de la zona de reacción (antígeno-anticuerpo) de los sueros positivo y negativo.

Al comparar los resultados obtenidos con los antígenos VRT y - SCT, se observó que los diámetros de las zonas de reacción eran muy similares. Estos resultados se interpretaron como una alta inespecificidad en la unión antígeno-anticuerpo.

Con base en estos resultados se intentaron eliminar, o bien, - abatir las uniones inespecíficas lavando en forma diferente las cajas de petri. Los lavados se realizaron utilizando: agua des^utilada, cloruro de sodio, solución amortiguadora de carbonatos, solución amortiguadora de fosfatos salina y PBST20. Al mismo - tiempo se intentaron bloquear tanto los sitios libres del sopor^ute que permitieran la adhesión de componentes del suero o del - conjugado enzimático, así como, los sitios libres de unión del glutaraldehído utilizando las proteínas: ASB, gelatina y ovoal^ubúmina. Sin embargo, no se obtuvieron resultados satisfactorios.

Finalmente, la DIG-ELISA se descartó debido a que al trabajar - con un lote de 15 cajas de poliestireno, en las mismas condicio^unes de concentración de antígenos: VRT y controles; y dilución de las muestras de sueros, en cada una de las cajas de petri, - los resultados obtenidos no fueron reproducibles, debido a que se observó que los diámetros de las zonas de reacción antígeno-anticuerpo variaron entre una y otra caja de petri, utilizando la misma muestra de suero 2 y 6 mm.

Tabla 5

DIAMETROS DE LAS ZONAS DE REACCION (mm) EN LA TECNICA DIG-ELISA.

DILUCIONES DEL SUERO	DILUCIONES DE ANTIGENO					
	VRT		SCT		MMM	
	1:50 ^a	1:200 ^b	1:50	1:200	1:50	1:200
1:50	20	20	20	19	0	0
* 1:200	16	16	17	15	0	0
1:500	14	13	13	13	0	0
1:2000	9	7	9	8	0	0
1:50	21	19	20	19	0	0
** 1:200	15	14	17	16	0	0
1:500	14	13	14	14	0	0
1:2000	8	7	8	7	0	0

VRT= virus de rubeola cepa Therien con 40 UH/caja^(a) y 8 UH/caja^(b); -
 SCT= sobrenadante de células no infectadas; MMM= medio mínimo esencial;
 * suero negativo con título de 4 IHA; ** suero positivo con título de -
 128 IHA.

DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTIRRUBEOLA POR NC-ELISA

Se realizaron algunos ensayos utilizando la técnica NC-ELISA. En éstos se utilizó el RVT parcialmente purificado y dos sueros de referencia para rubeola, un negativo y un positivo con títulos de 4 y 256 IHA. Como soporte para el antígeno se probaron 3 diferentes tipos de nitrocelulosa: Immunoblot, - - - Millipore y Schiller-Schwell; de éstos se eligió la membrana de NC Millipore, debido a que la coloración entre los diferentes sueros se distinguió más fácilmente que en las otras membranas de nitrocelulosa. Sin embargo, los resultados obtenidos

al intentar establecer las condiciones óptimas, para determinar los anticuerpos antirubeola, no fueron satisfactorios al no encontrar relación alguna entre el título de anticuerpos por IHA y la intensidad del color del cromógeno transformado, por tal motivo, se descartó este inmunoensayo.

SELECCION DEL SOPORTE EN LA TECNICA ELISA

Inicialmente en la técnica ELISA se probaron cuatro diferentes soportes de poliestireno: Cooke, Nunc, Immulon I e Immulon II.

Se utilizó como antígeno el VRT y como controles la ASB, gelatina y una solución amortiguadora de carbonatos (SAC). Además, se utilizaron dos sueros de referencia para rubeola, un negativo y un positivo con títulos de 8 y 256 IHA respectivamente diluidos 1:10, 1:100 y 1:1000.

Se determinó la unión de los anticuerpos a los diferentes soportes recubiertos con los diferentes antígenos, con base en las diferencias de lecturas de absorbancia entre los sueros positivo y negativo a 492 nm.

Los resultados se muestran en la Tabla 6, como se puede observar, la mayoría de los sueros positivos contra rubeola dieron lecturas más altas que los sueros negativos en las diferentes condiciones probadas.

Cuando se utilizó SAC, la diferencia encontrada fue en un rango de lectura de -0.025 a 0.080, con la ASB esta diferencia varió de -0.035 a 0.097 y con la gelatina de 0.004 a 0.132.

En algunas determinaciones, dicha diferencia fue mayor de 0.05: con SAC en las microplacas Cooke e Immulon I a una dilución de suero de 1:100; utilizando ASB en las microplacas Immulon II y Cooke a una dilución de suero de 1:10 y 1:100 respectivamente

UNION DE ANTICUERPOS A CUATRO DIFERENTES SOPORTES DE POLIESTIRENO RECUBIERTO CON DOS PROTEINAS NO RELACIONADAS A RUBEOLA Y VRT.

SUERO	<u>C O O K E</u>									<u>N U N C</u>								
	1:10			1:100			1:1000			1:10			1:100			1:1000		
	-	+	≠	-	+	≠	-	+	≠	-	+	≠	-	+	≠	-	+	≠
SAC	.076	.051	-.025	.146	.226	.080	.067	.094	.027	.174	.185	.011	.656	.765	.009	.301	.347	.096
ASB	.265	.300	.035	.171	.225	.084	.466	.371	-.035	.640	.697	.057	.270	.316	.046	.118	.146	.028
GEL	.321	.345	.024	.376	.402	.026	.371	.433	.062	.169	.173	.004	.283	.299	.016	.227	.274	.047
VRT	.095	.105	.010	.192	.378	.186	.104	.228	.124	.165	.169	.004	.836	.988	.152	.406	.500	.094

SUERO	<u>I M M U L O N I</u>									<u>I M M U L O N I I</u>								
	1:10			1:100			1:1000			1:10			1:100			1:1000		
	-	+	≠	-	+	≠	-	+	≠	-	+	≠	-	+	≠	-	+	≠
SAC	.265	.286	.021	.120	.190	.070	.056	.062	.006	.343	.368	.025	.180	.218	.038	.075	.080	.005
ASB	.158	.145	-.013	.069	.106	.037	.045	.052	.007	.327	.424	.097	.181	.126	-.055	.083	.090	.007
GEL	.379	.452	.073	.142	.274	.132	.128	.179	.051	.392	.439	.047	.158	.255	.097	.142	.176	.034
VRT	.532	.850	.318	.283	.467	.184	.137	.172	.035	.808	1.26	.452	.397	.537	.140	.176	.215	.039

SAC= solución amortiguadora de carbonatos; ASB= albúmina sérica bovina; GEL= gelatina; VRT= virus de rubeola cepa Therien; (-)= suero negativo con título de 8 IHA; (+)= suero positivo con título de 256 IHA; (≠)= diferencia entre los sueros positivo y negativo. Las lecturas fueron medidas a 492 nm.

y con gelatina en las microplacas Immulon I a las diluciones - de suero de 1:10 y 1:100 e Immulon II a una dilución de suero de 1:100. En las demás determinaciones la diferencia fue menor de 0.05, por lo que se consideró insignificante.

Al utilizar VRT en las microplacas Cooke y Nunc, se observó - una diferencia en lectura entre los sueros positivos y negativos a la dilución 1:10 insignificante (0.010 y 0.004 respectivamente), mientras que a la dilución 1:100 se obtuvo una diferencia de 0.186 y 0.152; y a una dilución 1:1000 una diferencia de 0.124 y 0.094. En cambio al utilizar las microplacas - - Immulon I e Immulon II se observó una diferencia significativa en gradiente decreciente con respecto a la dilución del suero 1:10, 1:100 y 1:1000, obteniéndose una diferencia de lecturas de 0.318, 0.184, 0.035 para Immulon I y 0.452, 0.140, 0.039 para Immulon II.

Con base en estos resultados, se pensó que tanto la microplaca Immulon I como la Immulon II, se podrían utilizar como soporte en futuras determinaciones; se decidió utilizar la microplaca Immulon II debido a que presentó una diferencia ligeramente mayor que la Immulon I en ensayos posteriores.

DETERMINACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DE TRABAJO

EN ELISA

Para establecer las condiciones óptimas de trabajo en la técnica ELISA, se probó el VRT a las siguientes diluciones: 1:5, - 1:10, 1:25, 1:50, 1:100; para cada dilución de antígeno se utilizaron dos diferentes sueros negativos con título de 4 IHA y dos sueros positivos con títulos de 256 y 512 IHA. Todos los sueros se probaron a las diluciones 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, - 1:160, 1:320 y 1:640.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7 y se esquematizan en la Fig. 2.

En la Fig. 2A, se presentan las gráficas de las lecturas obtenidas al utilizar el VRT a una dilución 1:5; como puede observarse, los sueros con anticuerpos antirruveola dieron lecturas más altas que los sueros negativos; la diferencia entre ambos sueros es mayor a las diluciones de suero 1:10, 1:20, 1:40, - 1:80 que a diluciones mayores, sin embargo, no se observa una diferencia de lecturas entre los sueros positivos a pesar de tener títulos diferentes.

En las Figs. 2B y 2C, se muestran las lecturas obtenidas utilizando el VRT a las diluciones 1:10 y 1:25 respectivamente, al igual que en la Fig. 2A, se sigue observando una clara diferencia entre los sueros positivos y negativos a menores diluciones de suero.

En las Figs. 2D y 2E se grafican las lecturas obtenidas utilizando el VRT a las diluciones 1:50 y 1:100 respectivamente, como puede observarse, se encuentran diferencias mínimas entre los sueros positivos y negativos.

En la Fig. 2F se muestra la gráfica de las lecturas obtenidas al utilizar el antígeno control que consistió de sobrenadante de células no infectadas, como se observa; todas las lecturas dadas por los sueros positivos y negativos a las diferentes diluciones fueron menores que con VRT (0.2).

Con base en estos resultados, se decidió utilizar el VRT a una dilución 1:20 en experimentos posteriores.

Tabla 7

TITULACION DE ANTICUERPOS ANTIRRUBEOLA POR ELISA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL VRT Y DILUCIONES DE SUERO. LECTURAS HECHAS A 492 nm.

DILUCIONES DEL SUERO	V R T																							
	1 : 5				1 : 1 0				1 : 2 5				1 : 5 0				1 : 1 0 0				C N			
	Δ	▲	○	●	Δ	▲	○	●	Δ	▲	○	●	Δ	▲	○	●	Δ	▲	○	●	Δ	▲	○	●
1:10	.455	.471	.686	.743	.515	.486	.756	.839	.502	.426	.712	.820	.502	.411	.640	.685	.563	.413	.658	.667	.173	.148	.153	.112
1:20	.409	.400	.691	.713	.449	.410	.700	.785	.438	.345	.626	.714	.473	.376	.630	.608	.559	.401	.627	.561	.111	.116	.138	.088
1:40	.326	.318	.581	.698	.362	.312	.566	.648	.388	.298	.608	.630	.437	.298	.608	.555	.449	.324	.618	.465	.083	.118	.161	.075
1:80	.309	.297	.578	.618	.312	.273	.520	.562	.328	.270	.483	.476	.391	.232	.513	.448	.422	.267	.553	.404	.063	.097	.170	.068
1:160	.233	.256	.467	.489	.250	.215	.501	.458	.287	.224	.476	.469	.314	.188	.439	.343	.339	.190	.476	.345	.048	.079	.107	.071
1:320	.210	.213	.424	.350	.213	.213	.409	.344	.180	.198	.416	.371	.226	.173	.374	.298	.241	.176	.427	.276	.040	.074	.087	.052
1:640	.214	.203	.358	.280	.175	.188	.338	.267	.179	.178	.365	.274	.173	.150	.295	.257	.177	.146	.324	.221	.037	.061	.087	.045

CN= sobrenadante de células no infectadas; Δ, ▲ = sueros negativos con títulos de 4 IHA; ○= suero positivo con título de 256 IHA; ●= suero positivo con título de 512 IHA.

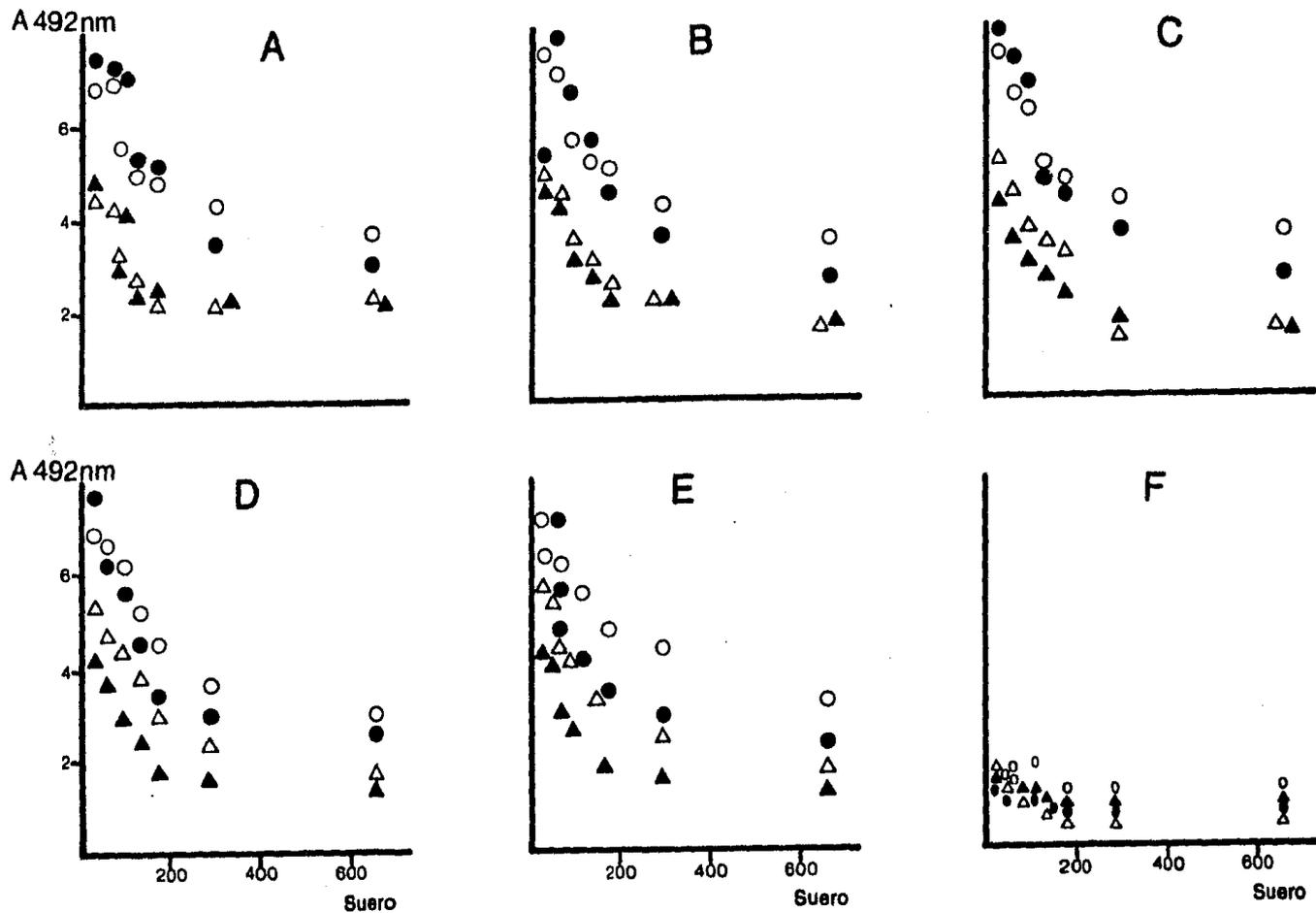


Fig. 2 Titulación de anticuerpos antirrubéola por ELISA a diferentes concentraciones del VRT y diluciones de sueros. VRT 1:5 A; VRT 1:10 B; VRT 1:25 C; VRT 1:50 D; VRT 1:100 E; Antígeno control F.

DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTIRRUBEOLA POR ELISA

Una vez establecidas las condiciones de trabajo, se determinaron los anticuerpos antirrubeola en 90 sueros por la técnica - ELISA. Estos sueros tenían un título desde menor de 4 hasta - mayor de 512 por la prueba de IHA (ver material biológico). - Todos los sueros se probaron a las diluciones: 1:50, 1:100, -- 1:200, 1:300 y 1:600.

Se utilizó el VRT parcialmente purificado y como antígeno control, sobrenadante de células no infectadas, ambos diluidos - 1:20.

Todas las determinaciones se hicieron por duplicado y se consideraron únicamente aquellas muestras cuya diferencia en la absorbancia entre los duplicados era menor de 0.05.

En las lecturas de absorbancia obtenidas, no se observó ninguna diferencia entre sueros positivos y negativos, por lo que - no pudo establecerse relación alguna entre éstas y los títulos de IHA. Por tal motivo, los cálculos para la determinación de anticuerpos antirrubeola por ELISA, se hicieron con base en la diferencia encontrada entre la lectura de absorbancia del suero probado en contra del VRT y la lectura del mismo suero en contra del antígeno control. Cuando dicha diferencia resultó negativa se consideró como una lectura de absorbancia de cero. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LAS TECNICAS DE - ELISA E IHA

Se compararon los resultados obtenidos en las técnicas ELISA e IHA.

En las Figs. 3 y 4 se muestran los resultados obtenidos al -

Tabla 8

DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTIRRUBEOLA POR ELISA.

MUESTRA	S U E R O				
	1:50	1:100	1:200	1:300	1:600
1 (<4)	.05	.01	.00	.03	.16
2 "	.00	.01	.04	.06	.04
3 "	.13	.13	.11	.13	.12
4 "	.00	.00	.00	.01	.00
5 "	.00	.00	.00	.00	.01
6 "	.00	.00	.00	.04	.06
7 "	.06	.00	.00	.00	.00
8 "	.10	.14	.16	.13	.15
9 "	.16	.15	.17	.18	.18
10 "	.01	.11	.12	.12	.15
11 "	.11	.17	.13	.18	.22
12 "	.02	.10	.06	.02	.02
13 "	.00	NP	NP	NP	NP
14 "	.00	NP	NP	NP	NP
15 "	.00	NP	NP	NP	NP
16 "	.00	NP	NP	NP	NP
17 "	.00	NP	NP	NP	NP
18 (4)	.00	.00	.00	.00	.01
19 "	.00	.00	.00	.00	.01
20 "	.00	.12	.07	.12	.00
21 "	.04	.03	.04	.04	.04
22 "	.00	.09	.12	.08	.10
23 "	.00	.11	.08	.00	.01
24 "	.06	.00	.00	.00	.00
25 "	.00	.06	.02	.03	.06
26 "	.00	.06	.05	.12	.14
27 "	.03	.00	.00	.03	.00
28 "	.02	.10	.00	.00	.00
29 "	.00	NP	NP	NP	NP
30 "	.00	NP	NP	NP	NP
31 (8)	.16	.14	.05	.19	.05
32 "	.10	.13	.05	.16	.14
33 "	.23	.19	.17	.16	.20
34 "	.03	.08	.11	.10	.09
35 "	.26	.23	.16	.10	.03
36 "	.36	.34	.28	.18	.12
37 "	.00	.04	.03	.05	.09
38 "	.00	.00	.16	.00	.00
39 "	.05	.07	.09	.09	.12
40 "	.00	.00	.00	.00	.03

41	"	.18	.16	.21	.20	.22
42	"	.13	.16	.17	.15	.14
43	"	.14	.16	.17	.17	.15
44	"	.10	NP	NP	NP	NP
45	"	.16	NP	NP	NP	NP
46	"	.29	NP	NP	NP	NP
47	"	.21	NP	NP	NP	NP
48	"	.25	NP	NP	NP	NP
49	"	.01	NP	NP	NP	NP
50	(16)	.18	.25	.22	.12	.14
51	"	.10	.07	.12	.02	.09
52	"	.31	.33	.25	.19	.12
53	"	.18	.25	.32	.21	.26
54	"	.15	.04	.09	.18	.17
55	"	.26	.20	.26	.30	.29
56	"	.24	.22	.23	.18	.18
57	"	.00	.00	.00	.01	.07
58	"	.14	NP	NP	NP	NP
59	(32)	.08	.13	.14	.14	.04
60	"	.10	.21	.12	.11	.04
61	"	.33	.32	.30	.25	.23
62	"	.26	.16	.20	.19	.20
63	"	.07	.07	.12	.15	.18
64	"	.11	.17	.16	.21	.16
65	(64)	.36	.30	.20	.21	.18
66	"	.30	.23	.23	.11	.19
67	"	.36	.35	.34	.18	.21
68	"	.29	.26	.23	.23	.23
69	"	.28	.30	.27	.22	.14
70	"	.13	NP	NP	NP	NP
71	(128)	.40	.20	.05	.20	.22
72	"	.45	.30	.34	.30	.12
73	"	.28	.24	.25	.20	.14
74	"	.39	.23	.27	.18	.18
75	"	.35	.34	.33	.38	.33
76	"	.21	.25	.20	.19	.16
77	"	.21	NP	NP	NP	NP
78	"	.13	NP	NP	NP	NP
79	(256)	.41	.50	.36	.19	.05
80	"	.29	.29	.18	.19	.06
81	"	.25	.22	.20	.15	.11
82	"	.34	.32	.26	.24	.18
83	"	.41	.35	.45	.46	.26
84	"	.25	NP	NP	NP	NP
85	(512)	.20	.42	.33	.36	.26
86	"	.45	NP	NP	NP	NP
87	(>512)	.43	.40	.41	.37	.34
88	"	.37	.37	.38	.23	.23
89	"	.46	.45	.50	.36	.39
90	"	.38	.36	.32	.18	.21

utilizar los sueros diluidos 1:50 y 1:100 respectivamente en la técnica ELISA, como podemos observar, la mayor concordancia entre ambas técnicas, ocurre cuando los títulos de IHA son mayores de 8. Sin embargo, a medida que la dilución del suero aumenta, dicha concordancia no se observa (Figs. 5, 6 y 7).

Lo anterior se comprobó al calcular el coeficiente de correlación (r) entre ambas técnicas a las diferentes diluciones de suero utilizadas en la técnica ELISA.

Para calcular r , se aplicó logaritmo base 10 a los títulos obtenidos por IHA y posteriormente se efectuó el análisis de regresión lineal simple. Los resultados se muestran en la Tabla 9, como se puede observar, la mejor correlación se obtuvo al utilizar los sueros diluidos 1:50 ($r=0.799$).

Tabla 9

COEFICIENTE DE CORRELACION (r) OBTENIDO AL COMPARAR LAS TECNICAS ELISA E IHA A DIFERENTES DILUCIONES DEL SUERO PARA LA PRUEBA DE ELISA.

DILUCIONES DEL SUERO	r
1:50	0.799
1:100	0.796
1:200	0.775
1:300	0.713
1:600	0.585

CALCULO PARA LA DETERMINACION DE SUEROS POSITIVOS Y NEGATIVOS
EN LA TECNICA DE ELISA

Finalmente se calculó el valor umbral para considerar un suero positivo o negativo para rubeola, en la técnica ELISA. Para ello se obtuvo el promedio de las lecturas de absorbancia de los sueros negativos por IHA (menores de 4, 4 y 8) y con base a éste se decidió que un suero diluido 1:50 que diera valores de absorbancia < 0.07 se consideraría un suero negativo.

ELISA
A 492nm

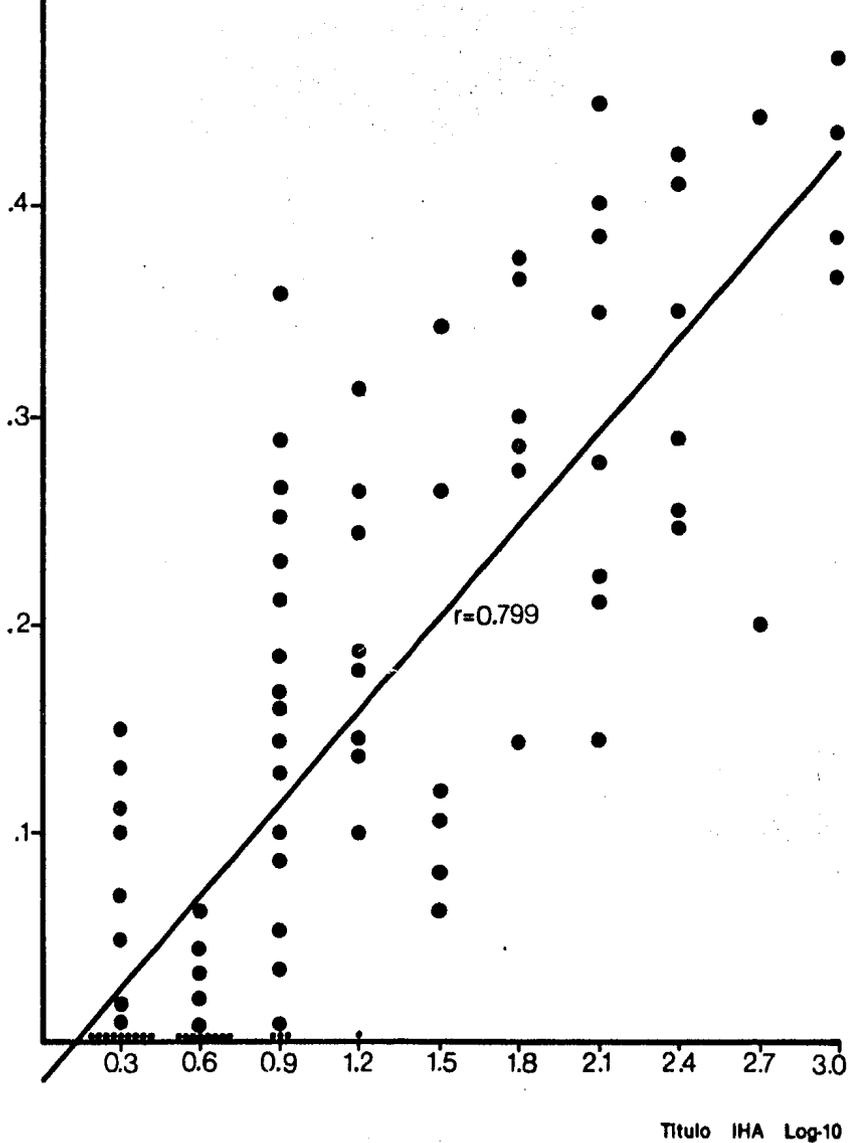


Fig. 3 Comparación entre las técnicas ELISA e IHA en la determinación de anticuerpos antirrueteola en 90 sueros diluidos 1:50.

ELISA
A 492nm

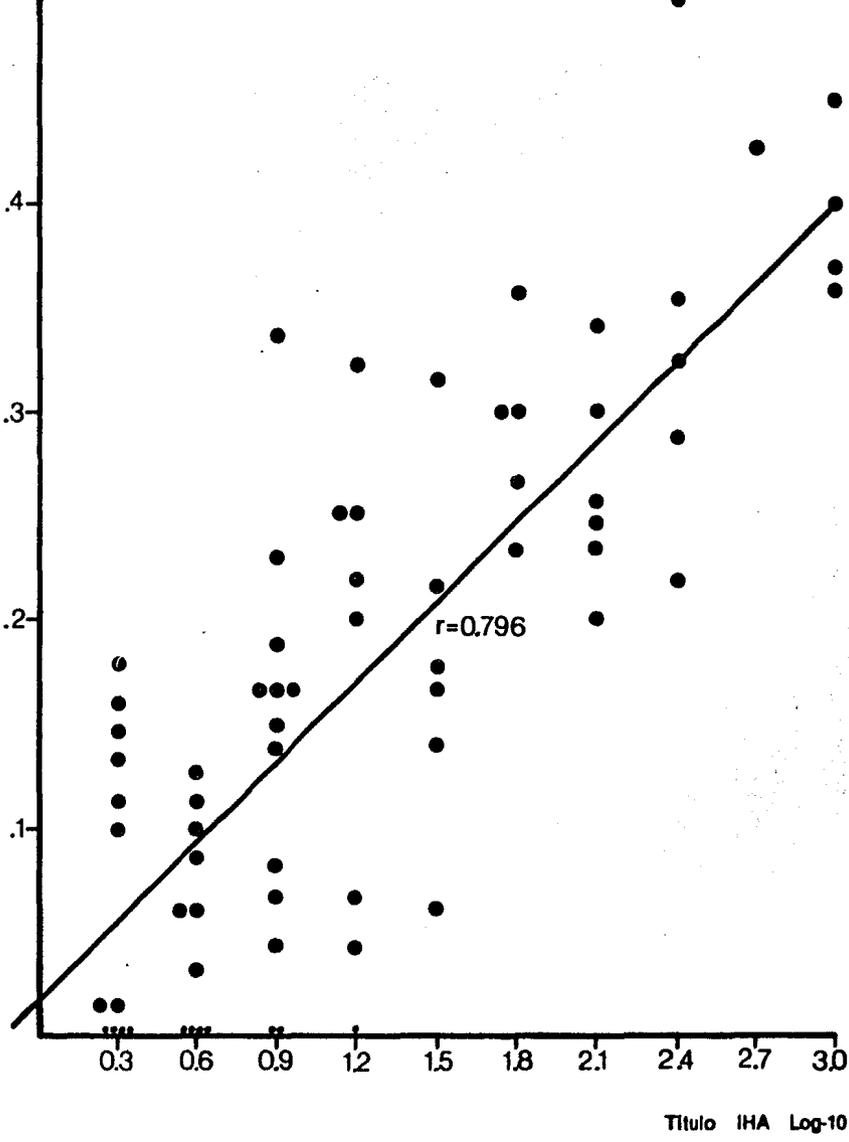


Fig. 4 Comparación entre las técnicas ELISA e IHA en la determinación de anticuerpos antirubeola en 71 sueros diluidos 1:100.

ELISA
A 492nm

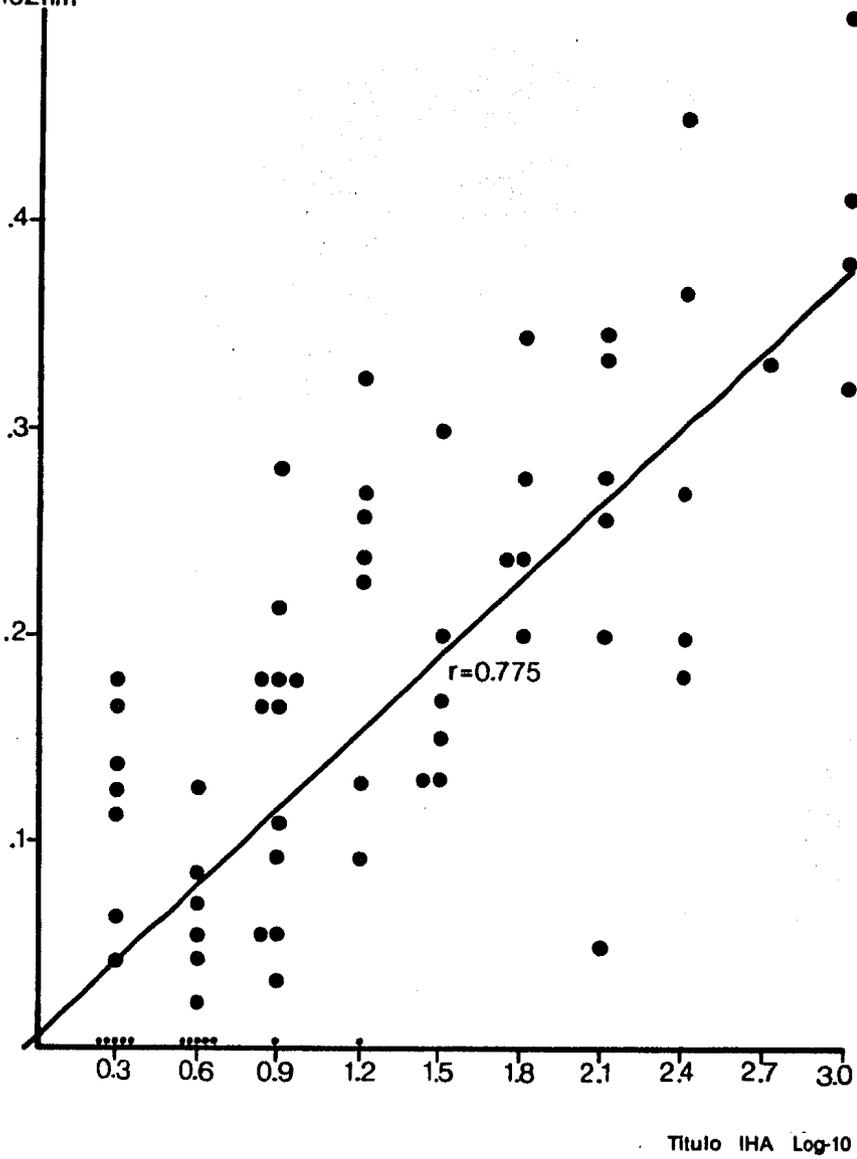
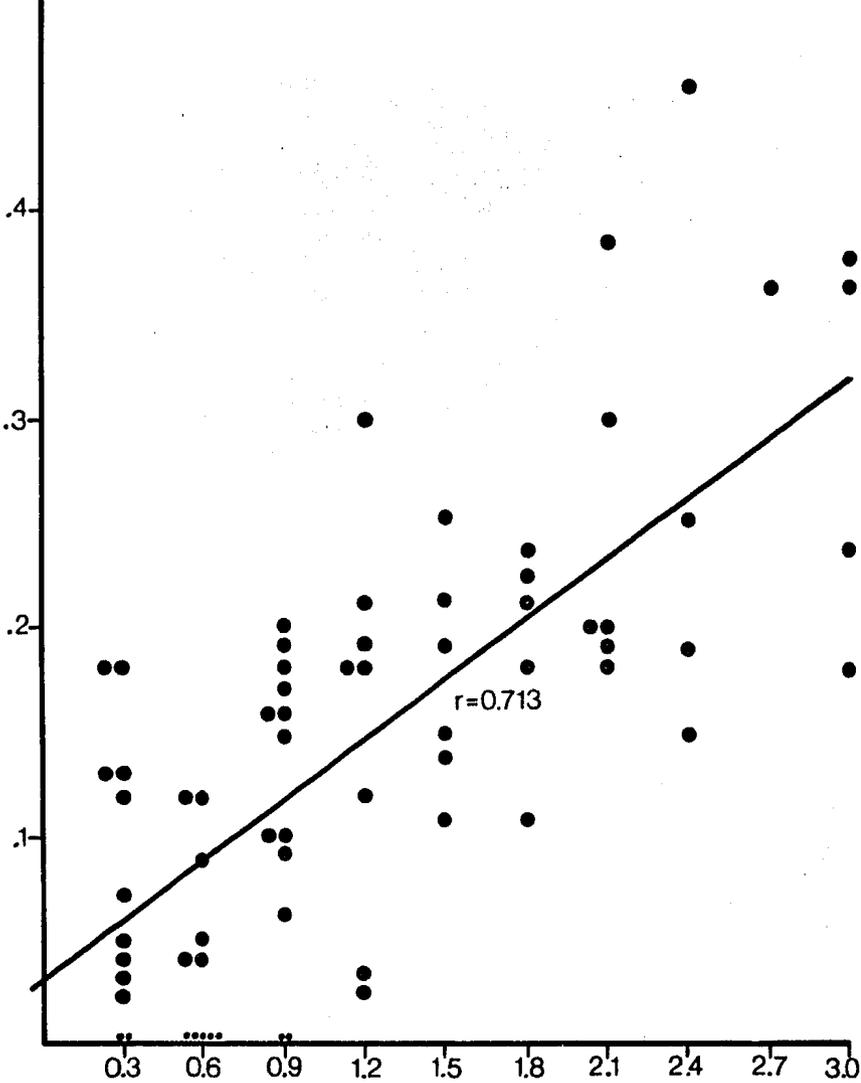


Fig. 5 Comparación entre las técnicas ELISA e IHA en la determinación de anticuerpos antirubeola en 71 sueros diluidos 1:200.

ELISA
A492nm



Titulo IHA Log-10

Fig. 6 Comparación entre las técnicas ELISA e IHA en la determinación de anticuerpos antirubeola en 71 sueros diluidos 1:300.

ELISA
A 492nm

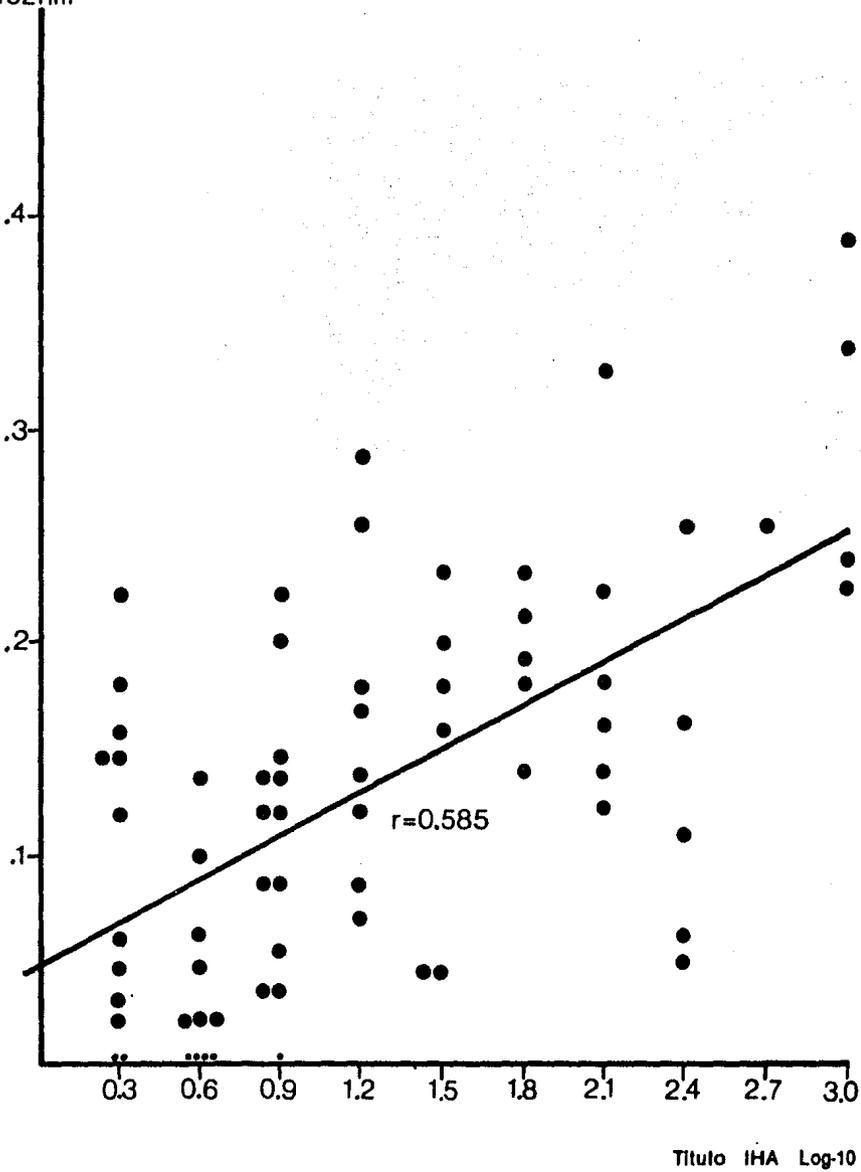


Fig. 7 Comparación entre las técnicas ELISA e IHA en la determinación de anticuerpos antirubeola en 71 sueros diluidos 1:800.

DISCUSSION

El diagnóstico de rubeola basado únicamente en observaciones clínicas no es confiable, requiere comprobación por el laboratorio.

La identificación del antígeno viral en secreciones facilitaría el diagnóstico de la infección en la fase temprana, sin embargo, aún no se dispone de técnicas que permitan hacerlo; por lo que se recurre a la utilización de métodos indirectos, es decir, - por la presencia de IgM o bien por el incremento en el título - de la IgG durante la infección; un aumento en un factor de 4 se considera como prueba concluyente de la infección activa (Cremer, et. al., 1983).

Las técnicas empleadas para la cuantificación de inmunoglobulinas séricas contra rubeola, presentan inconvenientes en su utilización a gran escala en los países en desarrollo, la que sirve como referencia y se utiliza más frecuentemente es la IHA; sin embargo, tiene las desventajas de requerir antígeno en gran cantidad, reactivos perecederos, discrepancia en los resultados obtenidos en diferentes laboratorios, además el tratamiento de los sueros para retirar inhibidores inespecíficos trae como consecuencia la pérdida de algunas inmunoglobulinas antirubeola, alterando así los títulos reales de estos (Kleeman, et. al. 1983; Meegan, et. al., 1982; Vejtorp, 1978; Zartarian, et. al., 1981). Por tal motivo, se consideró conveniente desarrollar una técnica que tuviese la especificidad suficiente para detectar anticuerpos antirubeola, la sensibilidad apropiada para detectar la infección activa y que al mismo tiempo cumpliera con los requisitos de bajo costo y sencillez en su realización.

Se decidió trabajar con los inmunoensayos en fase sólida, debido a que presentan la ventaja de fácil adaptación para determinaciones en gran escala, simplicidad y economía (Elwing, et. al., 1976).

Primeramente se intentó adaptar la técnica DIG-ELISA, la cual

se ha reportado que permite identificar anticuerpos antiherpes, utilizando antígenos parcialmente purificados (Jeansson, et. al., 1982).

La posibilidad de utilizar antígenos impuros, facilitaría la de terminación de anticuerpos antirrubeola, debido a que la obten ción y purificación del virus es un proceso muy laborioso y - con bajo rendimiento.

Al determinar los anticuerpos antirrubeola por la técnica - - DIG-ELISA, los resultados no fueron satisfactorios, principalmente porque el diámetro de los halos de reacción obtenidos no fueron proporcionales a la concentración de anticuerpos anti-rrubeola, además se comprobó que la unión antígeno-anticuerpo que se estaba detectando era inespecífica, pues el recubrimiento de la superficie de la caja con cualquier proteína era sufi ciente para atrapar a las inmunoglobulinas séricas (Tabla 5).

Las uniones inespecíficas se intentaron eliminar o bien reducir utilizando diferentes técnicas de lavado, pero los resultados fueron negativos. Por otro lado, la reproducibilidad de esta técnica resultó baja, ya que al realizar simultáneamente 15 - pruebas bajo las mismas condiciones, se observó que los resultados variaban considerablemente.

En algunas cajas se obtuvieron resultados parcialmente positivos y en otras fueron negativos; por todos estos motivos se de cidió descartar a la técnica DIG-ELISA.

También se intentó adaptar la técnica NC-ELISA para determinar anticuerpos antirrubeola, siendo ésta más sensible que la ELISA por una mayor capacidad de la nitrocelulosa para unir proteínas comparativamente al poliestireno (Bode, et. al., 1984; Palfree, 1982); sin embargo, nuestros resultados no fueron satisfactorios, pues no se encontró relación alguna entre el título de -

anticuerpos por IHA y la intensidad de color del cromógeno transformado, por tal motivo esta técnica fue descartada. Uno de los problemas quizá es el no contar con el equipo adecuado, por lo que el manejo de los discos de nitrocelulosa fue difícil y su ruptura fácil, sobre todo en los lavados haciendo la técnica tediosa y tardada.

Finalmente se decidió utilizar la técnica ELISA para la determinación de anticuerpos antirubeola.

A pesar de que los reportes en la literatura se hace énfasis en la utilización de antígeno puro en la técnica ELISA (Forghani, 1979), en el presente trabajo se realizó con un antígeno parcialmente puro, para ello se establecieron las condiciones en un experimento piloto, utilizando el antígeno a diferentes diluciones después de cosechado al igual que con el antígeno control (Fig. 2). El antígeno diluido 1:20 se prefirió por ser la dilución más económica que daba aún buena diferencia entre los sueros controles positivos y negativos.

Un factor muy importante en la técnica ELISA es la adhesión uniforme del antígeno al soporte, en nuestros ensayos éste se adhirió en forma pasiva a la superficie de plástico. Se ha encontrado que existe una variabilidad en la adhesión entre placas hechas de diferentes plásticos; placas hechas del mismo plástico por diferentes fabricantes y además entre lotes de placas del mismo plástico hechas por el mismo fabricante (Shekarchi, et. al., 1984; Voller, 1983). Por tal motivo se decidió probar 4 cajas de importación y la reproducibilidad con la que se unían diferentes proteínas incluyendo el VRT a éstas (Tabla 6). Los resultados indicaron que con las placas Immulon II se obtenía una mayor adhesión; en experimentos posteriores se observó que esta adhesión era reproducible, por lo que se decidió utilizar estas cajas.

El manejo de datos y el reporte de resultados al trabajar con

la técnica ELISA es problemático; varios autores utilizan criterios diferentes para diferenciar entre títulos positivos y negativos (Voller, 1983).

En este trabajo la concentración de anticuerpos contra rubeola, se determinó con base en la diferencia de lectura de absorbancia obtenida con el mismo suero, utilizando el antígeno viral (VRT) y el antígeno control; este cálculo se hizo en esta forma debido a que no fue posible relacionar las lecturas de absorbancia absoluta dada por los diferentes sueros y el título por IHA.

El umbral considerado para diferenciar entre sueros positivos y negativos para rubeola, se calculó tomando en cuenta el promedio de las lecturas de absorbancia de todos los sueros con título de IHA igual o menor de 8, dicho promedio fue de 0.07, valores iguales o mayores a esta lectura se consideran positivos.

Al comparar los resultados obtenidos por la técnica ELISA a diferentes diluciones de suero, con los resultados de la IHA observamos que la mejor correlación se obtuvo utilizando los sueros diluidos 1:50 ($r = 0.799$) (Tabla 9).

Los requerimientos más importantes de una prueba diagnóstica para la rubeola es que sea altamente específica y sensible - - (Castellano, et. al., 1981).

Nuestros resultados indican que de 49 sueros, 17 son falsos positivos obteniendo un 65.3% de especificidad, mientras que de 41 sueros únicamente 2 resultaron falsos negativos obteniendo un 95.1% de sensibilidad (Fig. 3). El nivel de significancia se determinó con un 95% de confiabilidad.

Los resultados obtenidos permiten diagnosticar con una buena sensibilidad los casos de rubeola. Aunque los falsos positivos

fueron únicamente 2, esto es importante ya que se puede decidir el no abortar en casos con problema; de tal manera que es deseable incrementar esta sensibilidad para eliminar por completo - falsos positivos, así como también sería útil incrementar la especificidad para eliminar los falsos positivos que representan interés también por el hecho de constituir individuos que son - susceptibles todavía a la infección, la cual se puede presentar en embarazo posterior.

Aunque existen equipos comerciales de diagnóstico de rubeola - con sensibilidad y especificidad comparables con el método estudiado aquí (Castellano, et. al., 1981), existen otros con mejor sensibilidad y especificidad. Hasta el momento, los datos obtenidos permiten predecir la factibilidad de desarrollar un método con la calidad deseada.

APENDICE

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO

Alsever, Alsever, 1941

pH 6.2

<u>REACTIVO</u>	<u>gr</u>
Dextrosa ($C_6H_{12}O_6$)	20.5
Cloruro de sodio (NaCl)	4.1
Citrato de sodio ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)	8.0
Acido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	0.55
Aforar con agua destilada a 1000 ml y ajustar el pH.	

Auletta, Auletta, 1968

pH 6.4

<u>REACTIVO</u>	<u>gr</u>
Cloruro de sodio (NaCl)	9.0
Cloruro de calcio anhídrido ($CaCl_2$)	1.0
Sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	1.0
Aforar con agua destilada a 1000 ml y ajustar el pH.	

Cloruro de Sodio, Garvey, et. al., 1977

0.15 M

<u>REACTIVO</u>	<u>gr</u>
Cloruro de sodio (NaCl)	8.5
Aforar con agua destilada a 1000 ml	

PBS-Tween 20 (PBST20)

<u>REACTIVO</u>	<u>ml</u>
Tween 20	0.5
Aforar con PBS a 1000 ml	

Reactivos Lowry, Lowry, et. al., 1951

<u>REACTIVO A</u>	<u>gr</u>
Solución A ₁) Carbonato de sodio (Na ₂ CO ₃)	20
Hidróxido de sodio (NaOH)	4
Aforar con agua destilada a 1000 ml	
Solución A ₂) Tartrato de sodio-potasio (C ₄ H ₄ KNaO ₆ ·4H ₂ O)	2
Aforar con agua destilada a 100 ml	
Solución A ₃) Sulfato de cobre (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	1
Aforar con agua destilada a 100 ml	

El reactivo A es una mezcla de las tres soluciones antes mencionadas a la siguiente proporción: 50 ml de la solución A₁, 0.5 ml de la solución A₂ y 0.5 ml de la solución A₃.

<u>REACTIVO B</u>	<u>ml</u>
Folín-ciocalteu	1
Agua destilada	1

Solución amortiguadora de acetatos, Gomory, 1955

0.1 M pH 3.7

Soluciones Stock

- A) Acido acético glacial 0.2 M (11.5 ml de CH₃COOH en 1000 ml de agua destilada).
- B) Acetato de sodio 0.2 M (16.4 gr de C₂H₃O₂N₂ en 1000 ml de agua destilada).

Mezclar 45.3 ml de la solución A y 4.7 ml de la solución B, - diluidos en un total de 100 ml de agua destilada.

Solución amortiguadora de carbonatos, Gomory, 1955

0.1 M pH 9.6

Soluciones Stock

- A) Carbonato de sodio 0.2 M (21.2 gr de Na_2CO_3 en 1000 ml de agua destilada).
- B) Bicarbonato de sodio 0.2 M (16.8 gr de NaHCO_3 en 1000 ml - de agua destilada).

Mezclar 16 ml de la solución A y 34 ml de la solución B diluídos en un total de 200 ml de agua destilada.

Solución amortiguadora de fosfatos, Gomory, 1955

0.1 M pH 7.0

Soluciones Stock

- A) Fosfato de sodio dibásico 0.2 M (53.65 gr de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 1000 ml de agua destilada).
- B) Fosfato de sodio monobásico 0.2 M (27.8 gr de NaH_2PO_4 en - 1000 ml de agua destilada)

Mezclar 61 ml de solución A y 39 ml de solución B diluídos en un total de 200 ml de agua destilada y ajustar el pH.

Solución amortiguadora de fosfato salina (PBS), Gomory, 1955

0.15 M pH 7.2

<u>REACTIVO</u>	<u>gr</u>
Cloruro de sodio (NaCl)	8.0
Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)	1.15
Fosfato de potasio (KH_2PO_4)	0.2
Cloruro de potasio (KCl)	0.2
Aforar con agua destilada a 1000 ml	

Solución amortiguadora Tris-HCl, Gomory, 1955

0.1 M pH 7.6

Soluciones Stock

A) Tris (hidroximetil) aminometano 0.2 M (24.2 gr de $C_4H_{11}NO_3$ en 1000 ml de agua destilada)

B) Acido clorhídrico 0.2 M.

Mezclar 50 ml de la solución A y 38.4 ml de la solución B diluidos en un total de 200 ml de agua destilada y ajustar el - pH.

REACTIVOS

Procedente de Bioxon, S.A. Oaxaca, México

Agarosa, Cat. 165-5, Lot. 129 y AIAaCR

Procedente de Difco, Detroit, E.U.A.

Agar noble, Cat. 0142-01

Procedente de J.T. Baker, S.A. de C.V., Xalostoc, México

Acido cítrico, Cat. 0110, Lot. M-36641

Citrato de sodio, Cat. 3646, Lot. M-29760

Cloruro de magnesio, Cat. 2444, Lot. M-30321

Dextrosa anhidra, Cat. 1916, Lot. M-32342

Dimetilformamida, Cat. 9221, Lot. M-30636

Fosfato de sodio, Cat. 3818, Lot. 301913

Procedente de Merck, S.A., Edo. de México, México

Acetato de sodio, Cat. 6267, Lot. 803127

Acido acético glacial, Cat. 15850, Lot. 201354N

Acido clorhídrico, Cat. 317, Lot. 209296R

Carbonato de sodio, Cat. 106391, Lot. 206154R

Bicarbonato de sodio, Cat. 6329, Lot. 9719990

Citrato de trisodio dihidratado, Cat. 106448, Lot. 21131
Cloruro de calcio, Cat. 2382, Lot. 903385
Cloruro de potasio, Cat. 204936, Lot. 106570N
Cloruro de sodio, Cat. 6404, Lot. 206160R
Etanol absoluto, Cat. 15853, Lot. 211430N
Fosfato de potasio monobásico, cat. 104873, Lot. 901018
Fosfato de sodio dibásico anhidro, Cat. 206586, Lot. 804353
Hidróxido de sodio, Cat. 6598, Lot. 214102R
Perhidrol 30%, Cat. 7210, Lot. 1187417
Sulfato de cobre, Cat. 2790, Lot. 6235N
Tartrato de sodio y potasio, Cat. 108087, Lot. 103480R
Tris (hidroximetil) aminometano, Cat. 8382, Lot. 9660225

Procedente de Sigma Chemical Co., St. Louis Mo., E.U.A.

Albúmina sérica bovina, fracción V, Cat. A-9647, Lot. 71F-0356
Albúmina sérica bovina, grado RIA, Cat. A-7888, Lot. 72F-03611
Anti IgG-humana peroxidasa conjugada, Cat. A-8775, Lot. 32F-8855
Diaminobenzidina, Cat. D-8001, Lot. 48C-0020
Gelatina, Cat. G0510
Glutaraldehído, grado II, Cat. G-6257, Lot. 81F-0106
Kaolín, Cat. M-7375, Lote 101F-0412
O. Fenilendiamina, Cat. P-1526

Procedente de Sigma de México, S.A., México, D.F.

Folín-ciocalteu, Cat. 2790, Lot. 030881-v
O. Tolidina, Cat. 60551, Lot. 0583-a
Tween-20, Cat. 64590, Lot. 0381-z

BIBLIOGRAFIA

- Almeida, J.D., 1982. Rapid Viral Diagnosis by Electron Microscopy. Scand. J. Infect. Dis. Suppl., 36: 117-120.
- Ambroise-Thomas, P. y P.T. Desgeorges, 1978. Diagnostic Immunoenzymologique (ELISA) des Maladies Parasitaires par une Microméthode Modifiée. Bull. Wld. Hlth. Org., 56: 609-613.
- Anderson, N.G., 1983. High-Resolution Protein Separation and Identification Methods Applicable to Virology. En: Bachmann, P.A. New Developments in Diagnostic Virology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, pp. 197-217.
- Alsever, J.B., y R.B. Ainslie, 1941. A New Method for the Preparation of Dilute Blood Plasma and the Operation of a Complete Transfusion Service. N.Y. State J. Med., 41:126.
- Auletta, A.E., G.L. Gitnick, C.E. Whitmire y J.L. Sever, 1968. An Improved Diluent for Rubella Hemagglutination and Hemagglutination-Inhibition Tests. Appl. Microbiol., 16:691-694.
- Baumgarten, A., 1980. Viral Immunodiagnosis. Yale J. Biol. Med., 53: 71-83.
- Bode, L., L. Beutin y H. Köhler, 1984. Nitrocellulose-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (NC-ELISA)- A Sensitive Technique for the Rapid Visual Detection of Both Viral Antigens and Antibodies. J. Virol. Methods, 8: 111-121.
- Bornkamm, G.W., G. Desgranges, y L. Gissmann, 1983. Nucleic Acid Hybridization for the Detection of Viral

Genomes. En: Bachmann, P.A. New Development in -
Diagnostic Virology. Springer-Verlag Berlin - -
Heidelberg, New York, pp. 287-298.

- Buchanan, R.A., G.J. Galasso, y T.C. Merigan, 1979. Antiviral Therapy Today. En: Galasso, G.J., Merigan, T.C. y Buchanan, R.A. Antiviral Agents and Viral Diseases of Man. Raven Press, New York, pp 681-703.
- Castellano, G.A., D.L. Madden, G.T. Hazzard, C.S. Cleghorn, -
D.V. Vails, A.C. Ley, N.R. Tzan y J.L. Sever, 1981. Evaluation of Commercially Available Diagnostic -
Test Kits for Rubella. J. Infect. Dis., 143: 578-583.
- Clarke, D.H. y J. Casals, 1958. Techniques for Hemagglutination and Hemagglutination-Inhibition with Arthropod-Borne Viruses. Am. J. Trop. Med. Hyg., 7: 561-573.
- Cremer, N.E., S.J. Hagens, y R. Fukuchi, 1983. Improved -
Serological Diagnosis of Rubella. J. Clin. Microbiol., 18: 743-744.
- Engvall, E., K. Jonsson y P. Perlmann, 1971. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). II. Quantitative -
Assay of Protein Antigen Immunoglobulin G by Means of Enzyme-Labelled Antigen and Antibody-Coated -
Tubes. Biochem. Biophys. Acta, 251: 427-434.
- Elwing, H., A. Nilson y Ö. Ouchterlony, 1976. Visualization Principles in Thin-Layer Immunoassays (TIA) on Plastic Surfaces. Int. Archs. Allergy Appl. -
Immun., 51: 757-762.
- Elwing, H., y H. Nygren, 1979. Diffusion In Gel-Enzyme -

Linked Immunosorbent Assay (DIG-ELISA): A Simple -
Method for Quantitation of Class-Specific Anti-
bodies. J. Immunol. Methods, 31: 101-107.

- Elwing, H., S. Lange y H. Nygren, 1980. Diffusion In Gel-
Enzyme Linked Immunosorbent Assay (DIG-ELISA): -
Optical Conditions for Quantitation of Antibodies.
J. Immunol. Methods, 39: 247-256.
- Fenner, F. y D.O. White, 1976. Medical Virology, Academic
Press, INC., p. 487.
- Forghani, B. y N.J. Schmidt, 1979. Antigen Requirements, -
Sensitivity, and Specificity of Enzyme Immuno-
assays for Measles and Rubella Viral Antibodies.
J. Clin. Microbiol., 9: 657-664.
- Gaidamovich, S.Y., G.A. Klisenko, N.K. Shangan, 1974. New - -
Aspects of Laboratory Techniques for Studies of -
Colorado Tick Fever. Am. J. Trop. Med. Hyg., 23:
526-529.
- Gardner, P.S., 1977. Rapid Virus Diagnosis. J. Gen. Virol.,
36: 1-29.
- Garvey, J.S., N.E. Cremer, D.H. Sussdorf, 1977. Methods -
in Immunology. W.A. Benjamin, INC., p. 533.
- Gomory, G., 1955. Preparation of Buffers for Use in Enzyme
Studies. En: Colowick, S.D. y N.O. Kaplan. Methods
in Enzymology. Academic Press INC. New York, pp.
138-146.
- Gordon, D.R., 1979. Respiratory Diseases. En: Galasso, -
G.J., Merigan, T.C. y Buchanan, R.A. Antiviral -

Agents and Viral Diseases of Man. Raven Press, New York, pp. 385-459.

- Gronowitz, J.S. y C.F.R. Källander, 1983. A Sensitive Assay - for Detection of Deoxythymidine Kinase and its - Application to Herpesvirus Diagnosis. En: Bachmann, P.A. New Developments in Diagnostic Virology. - - Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, pp. - 235-245.
- Jeansson, S., H. Elwing, H. Nygren y S. Olofsson, 1982. - - Evaluation of Solubilized Herpes Simplex Virus - - Membrane Antigens in Diffusion in Gel-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (DIG-ELISA). J. Virol. Methods, 4: 167-176.
- Johansson, M.E., M. Grandien y L. Arro, 1979. Preparation of Sera for Subtyping of Influenza A Viruses by Immuno florescence. J. Immunol. Methods, 27: 263-272.
- Kleeman, K.T., D.J. Kiefer y S.P. Halbert, 1983. Rubella - Antibodies Detected by Several Commercial Immuno- assays in Hemagglutination Inhibition-Negative - Sera. J. Clin. Microbiol., 18: 1131-1137.
- Landry, M.L., D.R. Mayo y G.D. Hsiung, 1983. The Need for a Rapid and Accurate Viral Diagnosis. Pharmac. - Ther., 18: 107-132.
- Liebhaber, H., 1970. Measurement of Rubella Antibody by - - Hemagglutination Inhibition. J. Immunol., 104: - 818-825.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall, 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol

Reagent. J. Biol. Chem., 193: 265.

- Meegan, J.M., B. K. Evans, y D.M. Horstmann, 1982. - -
Comparison of the Latex Agglutination Test with -
the Hemagglutination Inhibition Test, Enzyme- --
Linked Immunosorbent Assay, and Neutralization -
Test for Detection of Antibodies to Rubella Virus.
J. Clin. Microbiol., 16: 644-649.
- Oker-Blom, C., N. Kalkkinen, L. Kääriäinen y R.F. Pettersson,
1983. Rubella Virus Contains One Capsid Protein -
and Three Envelope Glycoproteins, E1, E2a, and -
E2b. J. Virol., 46: 964-973.
- Osborn, J.E., 1979. Precise Viral Diagnosis: Why Bother?
En Lennette, D.A., S. Specter y K.D. Thompson. -
Diagnosis of Viral Infections: The Role of Clinical
Laboratory. University Park Press. Baltimore, pp.
1-11.
- Palfree, R.G.E. y B.E. Elliott, 1982. An Enzyme-Linked - -
Immunosorbent Assay (ELISA) for Detergent Solubilized -
Ia Glycoproteins Using Nitrocellulose Membrane -
Discs. J. Immunol. Methods, 52: 395-408.
- Parkman, P.D., H.E. Hopps, y H.M. Meyer, 1978. Rubiviridae:
Rubella Virus. En Seligson, D. Handbook Series in
Clinical Laboratory Science. C.R.C. Press, pp. 201-
233.
- Payment, P., L. Roy, J.C. Gilker y A. Chagnon, 1975. - -
Diagnosis of Rubella Virus Infections. I. A - -
Comparison between Vero and BHK-21 Cells for the
Detection of Specific IgG and IgM Antibodies by
Immunofluorescence. Can. J. Microbiol., 21: 289-
292.

- Rhodes, A.J., N.R. Paul, y S. Iwakata, 1977. Rubella Virus Infection Diagnosis: Present Status. En Kurstak, E. y C. Kurstak. Comparative Diagnosis of Viral - Diseases. Vol. I Human and Related Viruses, Part A. Academic Press, New York, pp. 688-758.
- Schmidt, N.J. y E.H. Lennette, 1970. Variables of the - - Rubella Hemagglutination-Inhibition Test System - and Their Effect on Antigen and Antibody Titers. Appl. Microbiol., 19: 491-504.
- Schmidt, N.J., 1979. Laboratory Diagnosis of Viral Infections. En: Galasso, G.J., Merigan, T.C. y Buchanan, R.A. Antiviral Agents and Viral Diseases of Man. Raven Press, New York, pp. 209-252.
- Schmidt, N.J., H. H. Ho, y J. Chin, 1981. Application of - Immunoperoxidase Staining to More Rapid Detection and Identification of Rubella Virus Isolates. J. Clin. Microbiol., 13: 627-630.
- Sever, J.L. y C. Cleghorn, 1982. Rubella Diagnostic Test: What is a Significant Result? Postgraduate Medicine, 71: 71-77.
- Shannon, K.E., y J.Y. Lew, 1966. Peroxidase Isozymes from Horseradish Roots. I. Isolation an Physical - - Properties. J. Biol. Chem., 241: 2166-2172.
- Shekarchi, I.C., J.L. Sever, y J. Lee, G. Castellano, y D.L. Maden, 1984. Evaluation of Varios Plastic Micro-titer Plates with Measles, Toxoplasma, and Gamma Globulin Antigens in Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. J. Clin. Microbiol., 19: 89-96.

- Stagno, S., 1979. General Aspects of Immunoserology. En -
Lennete, D.A., S. Specter y K.D. Thompson. - -
Diagnosis of Viral Infections: The Role of Clinical
Laboratory. University Park Press. Baltimore, pp.
49-61.
- Stewart, G.L., P.D. Parkam, H.E. Hoops, R.E. Douglas, J.
P. Hamilton, y H.M. Meyer, 1967. Rubella-Virus -
Hemagglutination-Inhibition Test. N. Engl. J. Med.,
276: 554-557.
- Traavik, T., O. Spanne y S. Meenen, 1981. Rubella Serology:
A Comparison of Four Methods for Exclusion of Non-
Specific Serum Inhibitors. J. Hyg. Camb., 86: 315-
327.
- Trudel, M. y P. Payment, 1980. Concentration y Purifica-
tion of Rubella Virus Hemagglutinin by Hollow -
Fiber Ultrafiltration and Sucrose Density - -
Centrifugation. Can. J. Microbiol., 26: 1334-1339.
- Van, A.D., G. Krystal, G.D. Kettys, y E.M. Bohn, 1981.
The Purification of Rubella Virus (RV) and Determina
tion of Its Polypeptide Composition. Virology, -
108: 491-498.
- Vejtorp, M., 1978. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for -
Determination of Rubella IgG Antibodies. Acta Path.
Microbiol. Scand. Sect. B., 86: 387-392.
- Voller, A. y D.E. Bidwell, 1975. A Simple Method for - -
Detecting Antibodies to Rubella. Br. J. Exp. Path.,
56: 338-339.
- Voller, A. y D.E. Bidwell, 1976. Enzyme-Immunoassays for

Antibodies in Measles, Cytomegalovirus Infections and After Rubella Vaccination. Br. J. Exp. Path., 57: 243-247.

- oller, A., Bidwell, D.E., y Bartlett, A., 1979. The - - Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Dynatech Lab. INC. pp. 1-43.
- oller, A. y D.E. Bidwell, 1983. Heterogeneous Enzyme - - Immunoassays (ELISA). Difficulties Encountered - - and Their Resolution. Biologie Prospective. 5e - Colloque International de Pont-á-Mousson-Masson - éd. pp. 217-222.
- Naxham, M.N., y J.S. Wolinsky, 1983. Immunochemical - - Identification of Rubella Virus Hemagglutinin. - Virology, 126: 194-203.
- World Health Organization, 1981. Rapid Laboratory Techniques for the Diagnosis of Viral Infections. Report of a WHO Scientific - Group. Geneva p. 60.
- Yamamoto, S. y Y. Minamishima, 1982. Serodiagnosis of - - Tsutsugamushi Fever (Scrub Typhus) by the Indirect Immunoperoxidase Technique. J. Clin. Microbiol., 15: 1128-1132.
- Volken, R.H., 1980. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): A Practical Tool for Rapid Diagnosis of Viruses - and Other Infections Agents. Yale J. Biol. Med., - 53: 85-92.
- Zartarian, M., G. Friedly, E.M. Peterson, y L.M. Maza, 1981. Detection of Rubella Antibodies by Hemagglutination Inhibition, Indirect Fluorescent-Antibody Test, and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. J. Clin. - - Microbiol., 14: 640-645.