



# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

**"ESTABILIDAD DE LOS ESPECIMENES DE SANGRE OBTENIDOS  
EN PAPEL FILTRO, PARA DETERMINAR ANTICUERPOS ANTI-  
SARAMPION"**

**T E S I S**

Que para obtener el Título de  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P r e s e n t a

**ROBERTO CISNEROS NIEBLA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## INTRODUCCION:

Entre las posibilidades metodológicas de diagnóstico virológico, la serología tiene un lugar de particular importancia especialmente cuando los pacientes (o las muestras) se encuentran lejos de los laboratorios donde se realizan las pruebas, lo cual dificulta y hace menos conveniente recurrir al aislamiento viral, que por otra parte es el procedimiento más concluyente. La serología es también la herramienta fundamental para definir la incidencia de infecciones virales en la comunidad, la necesidad de implantar programas de inmunización y también para determinar la eficacia de esos programas. La utilidad de procedimientos sencillos para obtener especímenes adecuados para la realización de pruebas inmunoserológicas, ha sido reconocida desde hace bastante tiempo; el primer antecedente bibliográfico que encontraremos en relación a este objetivo es el de Adams y Hanson (1), quienes en 1956 describieron un procedimiento para obtener muestras de sangre en discos de papel filtro, con el propósito de cuantificar anticuerpos neutralizantes contra el virus de la estomatitis vesicular. En su comunicación estos autores hacen mención a una referencia previa (Stapp and Berks, *Phytopathol Z.*, 25: 47, 1948), de un trabajo relacionado con anticuerpos contra un virus vegetal.

Posteriormente, otros investigadores (2-6) han utilizado con éxito este procedimiento de recolección de muestras sanguíneas aplicado a pruebas de neutralización, fijación de complemento, inhibición de la hemaglutinación e inmunofluorescencia. Brody y colaboradores (6) realizaron pruebas de inhibición de la hemaglutinación para anticuerpos contra el virus del sarampión, habiendo conservado los discos de papel filtro saturados con sangre capilar y desecados a temperatura ambiente y congelados a  $-20^{\circ}$  C has-

ta por un año; Karstad y col. (2), sin embargo, hicieron notar la necesidad de realizar pruebas críticas para determinar la estabilidad de anticuerpos adsorbidos en papel filtro bajo condiciones diversas de almacenamiento. Green y Opton (3) recolectaron muestras de sangre en papel filtro para determinar anticuerpos neutralizantes - contra poliovirus tipos I, II y III, con buenos resultados y buena correlación entre los títulos obtenidos en suero y en eluido del papel filtro, encontrando también que "En las circunstancias descritas, los anticuerpos son razonablemente estables, y se produce poco cambio en los títulos después de varias semanas de almacenamiento a 4° C".

Llama la atención la escasa cantidad de comunicaciones publicadas sobre estos procedimientos, y en particular sobre estudios sistemáticos relacionados con la estabilidad de los especímenes sanguíneos obtenidos en papel filtro.

Por otra parte, no hay dudas sobre la utilidad de estos procedimientos de muestreo, ya sea para pruebas de diagnóstico serológico, para obtener información seroepidemiológica y para evaluar la efectividad de agentes inmunizantes. Debido a que el sarampión es una de las enfermedades virales en vías de control, gracias a la utilización generalizada de excelentes vacunas de virus atenuados, se hace cada vez más importante la vigilancia epidemiológica en base a la confirmación por el laboratorio, de los casos de sarampión que aún se presentan, así como la evaluación periódica de la efectividad de las vacunas utilizadas para la inmunización, y todo ello representa la necesidad de obtener continuamente numerosos especímenes de sangre para las pruebas serológicas respectivas.

La posibilidad de utilizar especímenes de sangre total obtenida por punción capilar y adsorbidos en papel filtro constituye una simplificación importante respecto de la punción venosa; este procedimiento ha sido generalmente bien aceptado tanto por los individuos de quienes se deben obtener los especímenes como por el personal de salud encargado de hacerlo, sobre todo cuando se trata de niños. Sin embargo, es fundamental establecer las condiciones óptimas de conservación de los especímenes obtenidos de esta manera, y el lapso de tiempo durante el cual los anticuerpos específicos no sufrirán alteración alguna que se refleje en una disminución del título original, esto es, sin que se modifique su estabilidad. Estos son los objetivos de este trabajo, específicamente en relación a anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra el virus del sarampión.

## I) LA ENFERMEDAD.

El sarampión es una enfermedad exantemática muy contagiosa, que se trasmite por las secreciones conjuntivales y respiratorias. El virus penetra al organismo por el tracto respiratorio, se multiplica en el epitelio de dichas vías y en el tejido linfoide regional diseminándose posteriormente por vía sanguínea (viremia) hasta el tejido linfoide distante y algunos órganos.

La multiplicación del virus en las vías respiratorias origina, después del período de incubación de 10 a 12 días, los síntomas prodrómicos de malestar general, conjuntivitis, tos seca, irritación faríngea, fiebre (39-40°C) - y manchas de Koplick, que son minúsculas manchas rojas con un centro blanco, localizadas en la mucosa bucal. Con la multiplicación generalizada del virus se intensifican estos síntomas y aparece la erupción roja maculopapular típica, primero en la cabeza y cara y a continuación en el tronco - y extremidades.

Los virus del sarampión pueden multiplicarse también en los linfocitos humanos, lo cual sugiere que estas células desempeñan un papel en su diseminación en el cuerpo y en la patogénesis de la enfermedad, y quizá esto sea la causa de la leucopenia que se observa en la fase prodrómica.

Las lesiones, junto con la fiebre y el malestar, desaparecen al cabo de varios días en el mismo orden en que se manifestaron. El virus se excreta por las secreciones del aparato respiratorio y oculares, así como por la orina, durante la fase prodrómica y hasta dos a tres días después de la aparición del exantema.

El sarampión suele ser una enfermedad benigna, de terminación espontánea; sin embargo, la multiplicación del virus en las vías respiratorias puede dar lugar a Croup, bronquitis o bronquiolitis, debiéndose la mayor parte de los casos graves a infecciones bacterianas que acompañan al cuadro viral y pueden producir otitis media y neumonía. La encefalitis es la complicación más grave, pero afortunadamente su frecuencia es baja en la mayoría de las epidemias (aproximadamente 1 en 10,000 casos); se presenta de 5 a 7 días después del exantema y es mortal en el 10% de los casos. Los pacientes que sobreviven sufren daño permanente en el sistema nervioso central, presentando por ejemplo epilepsia, parálisis, etc.

Además, el virus del sarampión parece ser la causa de la Panencefalitis esclerosante subaguda, que es un trastorno degenerativo crónico muy raro, que puede evolucionar durante varios años después de un caso típico de sarampión no complicado. Existen evidencias que relacionan al virus del sarampión con esta enfermedad, por ejemplo: la presencia de anticuerpos anti-sarampión en líquido céfalo-raquídeo, la presencia de inclusiones nucleares y citoplásmicas características en las células cerebrales de los pacientes, en las que también se ha podido detectar el virus por inmunofluorescencia. El virus del sarampión también se ha asociado con esclerosis múltiple y lupus eritematoso. En la esclerosis, el suero del paciente presenta un título alto de anticuerpos contra el sarampión, y en el lupus eritematoso se ha detectado el virus en biopsias y riñones extirpados de pacientes, situación que hasta el momento no ha podido ser explicada.

El rasgo predominante en la patología del sarampión

es la formación de células gigantes multinucleadas que reciben el nombre de células de Warthin-Finkeldey, algunas de las cuales llegan a tener 70 a 100 núcleos, con inclusiones nucleares y citoplásmicas eosinófilas.

Estas células características se encuentran en las secreciones nasales durante la fase prodrómica de la enfermedad, así como en el tejido linfoide del tubo digestivo, principalmente en el apéndice, y se han observado también en el esputo de pacientes con bronconeumonía de origen sarrampionoso.

Las lesiones de piel y mucosas que aparecen durante la infección pueden ser de etiología viral, o bien deberse al efecto de complejos inmunes formados por el virus y los anticuerpos.

Las manchas de Koplick se producen por una infiltración inflamatoria de células mononucleares en las glándulas de la submucosa. La erupción se debe a la proliferación del endotelio capilar con exudación de suero hacia la epidermis, de modo que las células epiteliales presentan vacuolas, se necrosan y forman las vesículas.

## II) EL AGENTE PATOGENO.

Los virus del sarampión son generalmente esféricos, con un diámetro de 120 a 250 nm; poseen una nucleocápside helicoidal de 17 nm de diámetro contenida dentro de una envoltura cubierta de peplómeros. Su genoma está constituido por una cadena simple de RNA, rica en uracilo, con un PM de  $6.2-6.4 \times 10^6$  daltons y con un coeficiente de sedimentación de 50 s.



Su composición proteica es similar a la de los paramixovirus, y contiene 6 polipéptidos estructurales con un PM de  $4.57-7.56 \times 10^4$  d; su envoltura es de naturaleza poliproteica. Poseen una hemaglutinina y carecen de -neuraminidasa.

Los virus de sarampión tienen una densidad de aproximadamente 1.23 g/ml., y un coeficiente de sedimentación de 200 a 300 s; son estables a pH entre 5.0-10.5 (siendo el óptimo de 7) durante 3 horas y a 0°C. Se inactivan en 4 -días a 37°C con formaldehído diluído, con luz UV, desoxicolato de sodio, éter etílico al 20%, acetona al 50%. También se inactivan rápidamente con luz visible en ausencia de proteínas estabilizadoras.

La estabilidad de este virus aumenta a medida que se reduce la temperatura de conservación; las cepas vacunales atenuadas requieren pequeñas cantidades de proteínas y liofilización para conservarse activas por un mínimo de un año a temperaturas ordinarias de refrigeración (4-8°C), condiciones indispensables en la práctica para su manejo -adecuado.

### III) PROPIEDADES ANTIGENICAS.

Todas las cepas que se han estudiado pertenecen a un solo tipo antigénico y a pesar de su similitud morfológica no existe relación antigénica del virus del sarampión con -otros paramixovirus humanos, aunque sí la tiene con el virus canino del moquillo (distemper) y el de peste bubónica (rinderpest).

Se pueden separar de la partícula viral un antígeno soluble fijador del complemento que se encuentra en la nucleocápside, una hemolisina y una hemoaglutinina.

Los virus del sarampión son capaces de aglutinar eritrocitos de mono a 37°C y no se eluyen espontáneamente de las células aglutinadas puesto que los virus no contienen neurominidasa; esta propiedad tiene gran importancia práctica en la prueba inmunoserológica de inhibición de la hemaglutinación.

La hemolisina no solo hemoliza los hematíes de mono sino que además induce la fusión de las células en cultivo *in vitro*, es decir, da lugar a la formación de células gigantes multinucleadas (Hall y Martin, 1974).

### CONSIDERACIONES GENERALES:

El sarampión es una enfermedad generalizada en todo el mundo que ataca principalmente a los niños en edad pre-escolar y escolar, y por su facilidad de contagio hace necesario tomar medidas epidemiológicas.

Si bien es cierto que en nuestro país se ha logrado ya un control parcial de este importante problema de salud pública, todavía se presentan numerosos casos de la enfermedad en niños no vacunados; el sarampión es una enfermedad peligrosa por las complicaciones a que está expuesto el individuo infectado, por lo cual consideramos conveniente ocuparnos de las características del padecimiento y del agente causal, de algunos aspectos patogénicos y epidemiológicos, de la respuesta inmune, de los recursos preventivos existentes y de las pruebas de laboratorio útiles para su diagnóstico, para establecer de esa manera la utilidad e importancia del procedimiento de muestreo objeto de este trabajo.

#### IV.- ASPECTOS INMUNOLOGICOS.

La infección por virus de sarampión confiere una inmunidad duradera, aunque algunas investigaciones seroepidemiológicas han demostrado que existen personas con un título de Ac anti-sarampión negativo, a pesar de haber sufrido la infección. Los anticuerpos circulantes aparecen de 10 a 14 días después del contagio, es decir, cuando se presenta el exantema, y alcanzan el título máximo cuando este desaparece. El título de Ac neutralizantes, fijadores del complemento e inhibidores de la hemaglutinación se mantiene alto a partir de la segunda semana. La mortalidad por sarampión originada por neumonía de células gigantes, es elevada en niños con deficiencias inmunológicas de los linfocitos T; en tales casos es común que no se presente el exantema característico.

La mayor gravedad que con frecuencia se observa en pacientes con sarampión en países o regiones subdesarrollados, es atribuible en muchos casos a la desnutrición.

#### V.- DIAGNOSTICO DE LABORATORIO.

El diagnóstico del sarampión generalmente se hace con base en el cuadro clínico característico, y la confirmación por el laboratorio se realiza con fines de investigación, en aquellos casos de adultos en los que la enfermedad es más grave y el diagnóstico difícil, y con fines epidemiológicos. Esta última aplicación resulta más importante a medida que se reduce la frecuencia de la enfermedad como consecuencia del uso masivo de vacuna.

Durante la fase prodrómica se puede establecer un diagnóstico rápido y sencillo demostrando la presencia de las células de Warthin-Finkeldey en muestras de raspado de la mucosa nasal; también se han utilizado técnicas de inmunofluorescencia para identificar antígenos virales específicos procedentes de la mucosa nasal y de conjuntiva.

El diagnóstico serológico puede hacerse titulando los anticuer-

pos tanto en la fase aguda como en la convalescente mediante pruebas de neutralización, fijación del complemento o IHA. Si el título de Ac específicos en la muestra de fase convalescente es 4 veces mayor - (o más) que el título en la fase aguda, puede hacerse con certeza el diagnóstico de sarampión.

El diagnóstico definitivo puede hacerse por aislamiento del virus en cultivos de células a partir de secreciones de nasofaringe del enfermo, aunque aislar el virus a partir de estas muestras es muy difícil. Después de 2 días de la aparición del exantema es inútil intentar el aislamiento del virus, excepto quizá de la orina, por lo que no es un procedimiento diagnóstico de rutina.

El aislamiento se puede realizar en cultivo primario de riñón de mono o de riñón humano y en líneas celulares Hep-2 y Vero. El efecto citopatogénico (ECP) consiste en la aparición de células gigantes multinucleadas con inclusiones eosinófilas nucleares y citoplasmáticas, rodeadas de una zona clara o halo, y pueden presentarse también células estrelladas o fusiformes con inclusiones eosinófilas.

## VI.- EPIDEMIOLOGIA.

El sarampión es endémico en el mundo entero, pudiendo presentarse en cualquier época del año aunque es más común al final del invierno. El huésped natural es el hombre y puede transmitirse a monos. Es esencialmente una enfermedad infantil, aunque puede afectar también adultos no inmunes.

Las epidemias en países desarrollados se presentan cada 2 a 3 años y en países subdesarrollados ocurren anualmente debido al incremento continuo de población infantil susceptible de contraer la enfermedad, por lo que resulta más fácil que se establezca la cadena de transmisión del virus en la comunidad. Las características epidemiológicas del sarampión han cambiado notablemente en países o regiones donde ha sido utilizada la vacuna en forma extensa, al grado

que se ha logrado reducir más del 90% el número de casos de la enfermedad y ya no se producen situaciones epidémicas. Las pruebas de laboratorio, como parte de las actividades de vigilancia epidemiológica, son absolutamente esenciales para lograr el control del sarampión, y se utilizan con 2 propósitos principales:

A) Obtener información sobre la efectividad de las vacunas aplicadas a la población susceptible.

B) Precisar el diagnóstico de los casos sospechosos de sarampión, cada vez menos frecuentes y por lo tanto más importantes desde el punto de vista epidemiológico.

La diseminación del virus ocurre vía las micro-gotas expulsadas del aparato respiratorio, durante unos cuantos días antes y después del comienzo del exantema.

En regiones aisladas donde el sarampión no es endémico, la introducción del virus origina la infección en adultos tanto como en niños, y por lo tanto la morbilidad y mortalidad son muy altas debido a complicaciones que suelen presentarse en los adultos.

## VII.-PREVENCION Y CONTROL

Cuando el número de individuos susceptibles de enfermar aumenta, se presentan en la comunidad epidemias a intervalos de algunos años. En caso de epidemia se puede administrar globulina gamma hiperimmune, que produce inmunidad pasiva y transforma la enfermedad en otra variedad, hasta del tipo abortivo, según la dosis y el momento de la administración. Sin embargo, la inmunización pasiva es costosa y el producto biológico no es fácil de conseguir, por lo que tal recurso debería dejarse sólo para casos en que hay un alto riesgo de que el enfermo pueda sufrir un cuadro clínico muy grave, como suele ser el caso de pacientes con algún tipo de inmunodepresión.

No se conoce ningún tratamiento específico contra el sarampión. -

En cuanto a medidas profilácticas existen las vacunas de virus atenuados, que resultan muy eficaces como la que se emplea en la República Mexicana. Esta vacuna se administra en una sola dosis y puede ir sola o combinada con las vacunas de rubeola o parotiditis.

La vacunación se recomienda en los niños mayores de 9 a 12 meses, ya que si se realiza antes los Ac maternos interfieren y disminuyen la eficacia de la vacuna, haciéndose necesario en estos casos una revacunación.

La vacuna confiere una protección por lo menos de 4 a 5 años, pero si durante este período se tiene contacto con cepas silvestres del virus o se padecen infecciones subclínicas, estos factores evitan que el título de Ac disminuya originándose así una inmunidad duradera.

Los lactantes con defectos congénitos del timo son especialmente susceptibles a infecciones generalizadas y a neumonía por virus del sarampión.

#### VIII GENERALIDADES SOBRE LA PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION.

La prueba de inhibición de la hemaglutinación se basa en la neutralización relativamente específica, de la hemaglutinina viral por Ac presentes en el suero. El efecto de inhibidores no específicos debe ser lógicamente reducido al mínimo a fin de elevar la reproducibilidad de los títulos de anticuerpos, y ello puede lograrse mediante diversos procedimientos:

1.- Inactivación a 56°C durante 30 minutos. (De esta manera se eliminan inhibidores termolábiles).

2.- Tratamiento con productos enzimáticos como la tripsina o la llamada enzima destructora del receptor, que con frecuencia permite eliminar a los inhibidores termestables.

3.- Tratamiento con sustancias absorbentes del tipo del caolín, capaces de remover físicoquímicamente los inhibidores inespecíficos sin alterar la composición del suero.

4.- Absorción de factores hemaglutinantes inespecíficos por medio del mismo sistema celular que se va a utilizar en la prueba de la inhibición de la hemaglutinación, antes de poner en contacto el suero y el antígeno viral.

Esta prueba (IHA) constituye un método sencillo y preciso para evaluar la presencia de Ac inhibidores de la hemaglutinación en sueros humanos o animales y la cuantificación de Ac inhibidores de la hemaglutinación permite establecer la condición inmunitaria del individuo.

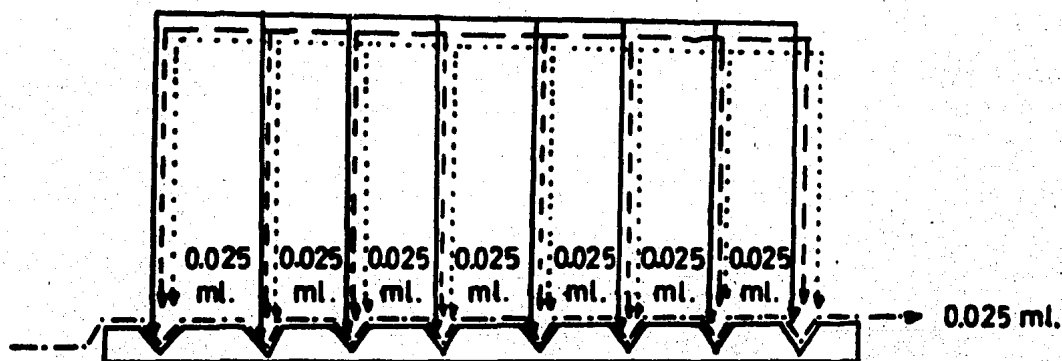
La porción activa de la partícula viral ha recibido el nombre de hemaglutinina que es una proteína antigénica. El principio activo de la hemaglutinina parece ser la enzima neuraminidasa, la cual reacciona con el ácido neuramínico (mucopolisacárido), también llamado sustancia receptora, de los eritrocitos. Si éstos son sensibles a la aglutinina específica del virus, se produce el fenómeno de la hemaglutinación que es apreciable a simple vista. La prueba propiamente dicha se realiza, de manera resumida, como sigue: con el suero tratado se hacen diluciones seriadas en una placa de microtitulación usando microdilutores debidamente calibrados. A cada dilución contenida en su respectivo pozo, se añaden 4 "unidades hemaglutinantes" (UHA) del virus a probar, utilizando una micropipeta, y se agregan en la misma forma los eritrocitos de la especie animal apropiada. Esta placa se incuba a temperatura adecuada, lo suficiente para que se sedimenten los eritrocitos y pueda interpretarse el título de anticuerpos, que es la recíproca de la máxima dilución capaz de inhibir completamente la cantidad agregada de hemaglutinina específica (Fig. No. 1).

La prueba de IHA es muy sensible y, con excepción de los togavirus, específica. Mide solamente anticuerpos que se unen directamente a la hemaglutinina viral (es decir, a las puntas de las proyecciones -



# ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LA TECNICA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION

Figura No. 1



- Sol. PBS  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
- - - Problema tratado
- - - Antígeno sarampión
- ..... Suspensión de eritrocitos al 0.5%

de los peplómeros de la mayoría de los virus con envoltura), y posiblemente también aquellos que se unen a otros antígenos tan estrechamente contiguos a la hemaglutinina que el Ac puede inhibir la hemaglutinación por obstáculo estérico. En resumen: La prueba de la IHA es sencilla, - económica y rápida, además de ser el procedimiento serológico de elección para cualquier virus que causa hemaglutinación específica.

#### IX.- CONSIDERACIONES SOBRE LA PUNCIÓN CAPILAR.

Este procedimiento para la obtención de muestras sanguíneas está tomando cada día más importancia, pues en comparación con la punción - venosa presenta ventajas, como las que a continuación se enumeran:

1) Material: La punción capilar requiere lancetas desechables, tornundas de algodón humedecidas en alcohol, y el material para absorber, en tanto que la punción venosa requiere jeringas hipodérmicas y agujas estériles, ligaduras o torniquetes, torundas de algodón humedecidas en alcohol, tubos de ensaye para coleccionar las muestras.

2) Sencillez: La punción capilar es más sencilla y rápida en relación a la punción venosa, no sólo por lo que toca a la toma de la muestra sino también por su manipulación, pues en el primer caso basta dejar que seque la sangre impregnada en el papel filtro y después guardar la en un recipiente apropiado, y en el segundo es necesario separar el suero y eliminar las células sanguíneas por centrifugación, y luego - congelar por lo menos a  $-20^{\circ}\text{C}$  o refrigerar si la prueba se va a realizar en las siguientes 24 horas.

3) Traumatismo: La punción capilar produce menos traumatismo al paciente, por lo que resulta más aceptable tanto a éste como al personal encargado de tomar las muestras. Esta ventaja es particularmente importante en el caso de niños muy pequeños o de personas en quienes - la punción venosa presenta problemas por el calibre de las venas accesibles o por otras razones.

4) Costo: La punción capilar es bastante más barata que la punción venosa.

Cabe mencionar que los especímenes recolectados por punción capilar y absorbidos en tiras de papel filtro presentan también las ventajas de traslado y almacenaje, factores importantes en encuestas seroepidemiológicas.

#### MATERIAL Y METODO:

##### A.- Material biológico.

Se obtuvieron 10 ml. de sangre con anticoagulante (2 mg. de citrato de sodio/1 ml. de sangre) y 2 ml. más sin anticoagulante, de la misma punción venosa, de 10 voluntarios escogidos al azar sin importar antecedentes de vacunación.

De los 10 ml. de sangre con anticoagulante se procedió a impregnar por capilaridad tiras de papel filtro EDEROL 3105 de 1 cm. de ancho por 10 cm. de largo, observando que 0.45 ml. de sangre total es la cantidad requerida para cubrir totalmente dicha tira. Esto nos indica que tenemos absorbidos  $0.045 \text{ ml. de sangre total} \times 1 \text{ cm}^2$ . Se dejaron a temperatura ambiente hasta desecación completa (aprox. 3 - 4 horas), se guardaron en recipientes herméticos apropiados y se llevaron a diferentes temperaturas (temperatura ambiente, refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$  y congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ ).

Los otros 2 ml. de sangre sin anticoagulante fueron centrifugados y se les separó el suero para su titulación inmediata (título base).

Se obtuvieron además eritrocitos de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) procedentes del Instituto Nacional de Virología de la S.S.A., por ser los más sensibles a la aglutinina del virus de sarampión.

B.- Solución amortiguadora de fosfatos (PBS con Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>).

NaCl .....	8.000 g.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....	2.160 g.
KCl .....	0.200 g.
CaCl <sub>2</sub> anhidro .....	0.100 g.
MgCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O .....	0.100 g.
Agua destilada .....	c.b.p. 1000 ml.

Esterilizar por filtración y conservar a temperatura de refrigeración (4°C).

C.- Equipo y material de laboratorio:

Microdilutores de .....	0.025 ml.
Micropipetas de .....	0.025 ml.
Placas de microtitulación con cavidades de fondo en "V"	
Estufa para incubación a .....	37°C
Refrigerador a .....	4°C
Congelador a .....	-20°C
Centrífuga (se uso una CHRIST modelo clínico).	
Tubos de ensaye de 12 x 75, 13 x 100 y 16 x 150.	

D.- Metodología.

D.1.- Preparación de la suspensión de eritrocitos de mono.

Tomar una alícuota de eritrocitos de mono, lavar 3 veces con - PBS Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup> (1500 rpm - 10 minutos). Después del último lavado hacer una suspensión al 50% (ejemplo: 2.5 ml. de paquete celular/ 2.5 ml. de solución amortiguadora). Guardar en refrigeración hasta el momento de su uso.

En el momento de llevar a cabo la prueba de IHA se prepara una -

suspensión de eritrocitos al 0.5% (9.9 ml. de solución amortiguadora + 0.1 ml. de eritrocitos al 50%).

D.2.- Titulación del Antígeno. El antígeno del sarampión, obtenido de fuente comercial con un título original de 1:128, se titula por duplicado para corroborar dicho título de la siguiente manera:

- 1.- Colocar en una microplaca de fondo en "V" una gota de 0.025 ml. de PBS Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup> a 10 cavidades de 2 hileras.
- 2.- Tomar con el microdilutor una gota (0.025ml.) del antígeno y colocarla en la primera cavidad, mezclar con movimientos rotatorios, pasar a la siguiente cavidad y así sucesivamente hasta la última, descartando 0.025 ml. de la última dilución.
- 3.- Agregar 0.05 ml. de eritrocitos al 0.5%.
- 4.- Agitar cuidadosamente e incubar a 37°C durante 90 minutos.
- 5.- Leer e interpretar. El título es la máxima dilución del antígeno que produce hemaglutinación parcial ( + ), y se considera que esa dilución contiene una unidad hemaglutinante (1 UHA).

En la figura No. 2 se presenta en forma esquemática el resultado obtenido experimentalmente, corroborándose el título indicado por la casa productora (Instituto Behring).

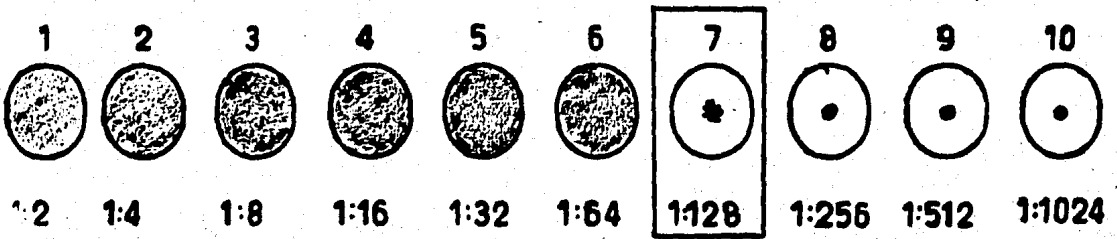
Para la prueba de la inhibición de la hemaglutinación se requiere que el antígeno tenga una concentración de 4 UHA, que al mezclarse con un volumen igual de cada dilución del suero problema tratado, dará la concentración final de 2 UHA.

Para determinar la dilución de trabajo del antígeno (que debe contener 4 UHA), se hace el cálculo siguiente:

$$\frac{\text{Título del antígeno (1:128)}}{4 \text{ UHA}} = \frac{1:32}{1}$$

## TITULACION DEL ANTIGENO

Figura No. 2



TITULO DEL ANTIGENO 1:128

### D.3.- Elución de las muestras.

Se cortaron fragmentos de  $2.2 \text{ cm}^2$  de largo x  $1 \text{ cm}^2$  de ancho (0.1 ml. de sangre total en  $2.2 \text{ cm}^2$  de papel filtro). Después se cortaron en pedazos más pequeños, de manera que la superficie de contacto con el eluyente fuera mayor.

Se agregaron 0.4 ml. de eritrocitos de mono al 50%, dejándose eluir durante toda una noche a temperatura de refrigeración. El volumen final de suero es de 0.2 ml. - aproximadamente y el otro 0.2 ml. corresponde a células rojas (tomando en consideración que partimos de un volumen "0" o seco). El título de la dilución final es de 1:4.

Por otra parte, para obtener los "títulos base" a partir de los sueros, estos se trataron de la siguiente manera:

En un tubo de 12 x 75 mm medir 0.2 ml. de suero problema y 0.05 ml. (2 gotas con la micropipeta) de eritrocitos al 50%. Mezclar y llevar a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora, agitando cada 15 minutos. Centrifugar a 1500 rpm 15 minutos y utilizar el sobrenadante para la prueba de IHA. En este caso se considera que la dilución inicial es 1:2.

### D.4.- Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación.

Se basa en que los anticuerpos específicos contenidos en el suero reaccionan con el antígeno (virus del sarampión) y después, al ponerlos en contacto con los eritrocitos, pueden observarse dos reacciones diferentes:

a) Si el suero contenía los Ac específicos necesarios para inhibir la acción hemaglutinante del virus sobre los eritrocitos, no se observa aglutinación de éstos.

b) Si el suero no contenía anticuerpos específicos - inhibidores de la hemaglutinación, la aglutinina viral - quedará libre y producirá la aglutinación de los eritrocitos.

La prueba se realiza de la siguiente manera:

- 1.- Colocar la placa de microtitulación en sentido horizontal y agregar una gota de PBS<sup>Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup></sup> en 6 cavidades de cada hilera, con una micropipeta de 0.025 ml.
- 2.- Tomar con un microdilutor 0.025 ml. de uno de los sueros a probar, y colocarlo en la primera cavidad de una hilera, mezclar con movimientos rotatorios de izquierda a derecha y pasarlo a las siguientes cavidades en sentido vertical, repetir esta maniobra para cada uno de los especímenes, descartando los 0.025 ml. de la última dilución que se encuentra en el microdilutor.
- 3.- Agregar una gota de antígeno (micropipeta de 0.025 ml.) previamente titulado y diluido a contener 4 UHA por unidad de volumen; mezclar cuidadosamente y dejar reposar 1 hora a temperatura ambiente.
- 4.- Adicionar 1 gota (micropipeta de 0.025 ml.) de suspensión de eritrocitos al 0.5%, mezclar e incubar a 37°C por espacio de una hora y media.
- 5.- Leer e interpretar.

En cada determinación de este tipo debe incluirse un control (+), un control (-), un control de eritrocitos y un control de antígeno. Los controles (+) y (-)



se tratan de la misma manera que los sueros problema.

Control de eritrocitos: colocar 1 gota de PBS<sup>Ca++/Mg++</sup> más 1 gota de eritrocitos al 0.5% en 6 cavidades de la microplaca (se puede hacer también nada más en 3 cavidades); mezclar muy bien (una vez que hayan sido montadas todas las pruebas y demás controles) y observar al término del período de incubación a 37°C. No deberá haber autoaglutinación, es decir, las 6 cavidades deberán mostrar un botón bien definido; si se observa cualquier grado de autoaglutinación la prueba no es satisfactoria.

Control de antígeno: Agregar una gota (0.025 ml.) de PBS<sup>Ca++/Mg++</sup> a cada una de 6 cavidades de la placa; con un microdilutor de 0.025 ml. pasar esta cantidad de antígeno diluido, que contiene 4 UHA, a la primera cavidad. Mezclar por rotación del microdilutor y pasar éste a la segunda cavidad, y así sucesivamente, descartando 0.025 ml. de la última dilución; agregar a cada cavidad 0.025 ml. de la suspensión de eritrocitos de mono al 0.5%, mezclar bien y observar e interpretar después del período de incubación. De hecho es una titulación del antígeno, pero a partir de la dilución de trabajo. Si la dilución es correcta deberá observarse aglutinación total en la primera cavidad, parcial en la segunda y casi nada en la tercera; las tres últimas cavidades deberán mostrar botón completo. En la figura No. 3 queda esquematizada la manera en que se corre e interpreta una prueba de inhibición de la hemaglutinación. En el caso de los problemas (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>) el título de anticuerpos anti-sarampión es el siguiente:

P<sub>1</sub> - 1:8

P<sub>2</sub> - 1:16

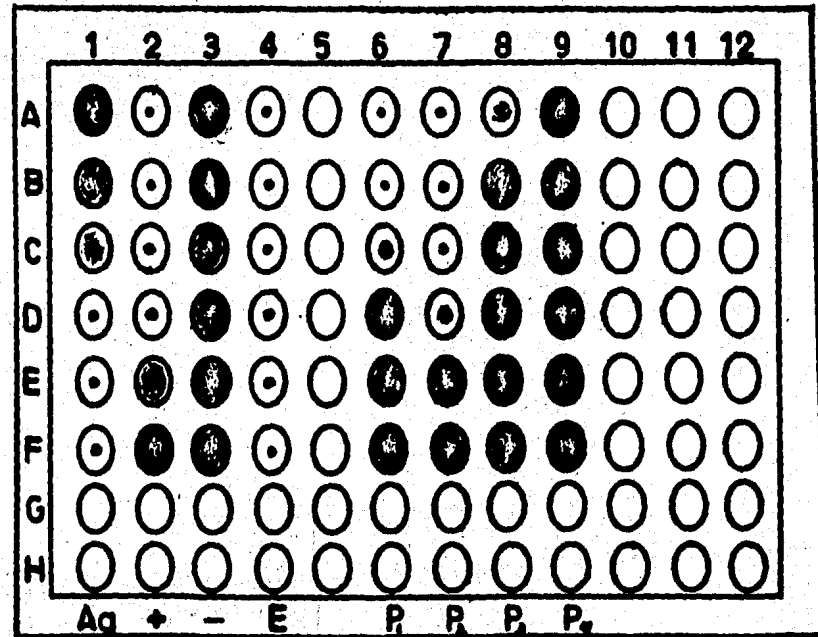
P<sub>3</sub> - <1:4

P<sub>4</sub> - Neg.

"LA DILUCION DEL SUERO MAS ALTA QUE HAYA INHIBIDO  
COMPLETAMENTE LA AGLUTINACION DE LOS ERITROCITOS,  
CORRESPONDE AL TITULO DE ANTICUERPOS EN EL SUERO".

# PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION

Figura No. 3



## RESULTADOS

Los títulos obtenidos tanto en los sueros (título base) como en los eluidos de las muestras absorbidas en papel filtro se encuentran en los cuadros (1,2, 3), que corresponden a las distintas condiciones de conservación de las tiras de papel filtro impregnadas con las muestras de punción capilar.

Como puede verse en el cuadro No. 1, las muestras (1,2,3, 6 y 9) - conservadas a temperatura ambiente no modificaron su título original de Ac específicos aún después de 68 días de obtenidas las muestras; las - otras 5 muestras sí redujeron un título original, pero cabe hacer notar que 4 de ellas (4,5,7 y 10) tuvieron un título muy bajo (1:4) desde el principio, por lo que no resulta ilógico que se hayan negativizado.

En el caso de las muestras conservadas a 4°C (cuadro No. 2) solamente las muestras (5,7 y 10) se negativizaron, con la circunstancia ya - mencionada de que sus títulos originales fueron muy bajos. Aún cuando la diferencia es muy pequeña, nos queda la impresión de que la conservación de las muestras a temperatura de refrigeración influye favorablemente en la estabilización de los anticuerpos presentes en ellas. Sin embargo, sería necesario realizar pruebas a plazo más largo para tener la certeza de que se logra efectivamente una estabilización más prolongada.

En el cuadro No. 3 pueden verse los resultados obtenidos en las titulaciones de anticuerpos cuando las muestras fueron conservadas bajo condiciones a -20°C; en este caso se llevaron a cabo solamente 2 determinaciones de anticuerpos los días 33 y 68 a partir del día "0", partiendo de la suposición de que en esas condiciones debería obtenerse una mayor estabilidad de los anticuerpos absorbidos en el papel filtro. A partir de nuestros resultados, parece no existir diferencia en la estabilidad cuando las muestras son conservadas a 4°C o a -20°C; de hecho, los títulos respectivos son absolutamente iguales al cabo de 68 días, pero - es necesario insistir en que solamente corriendo pruebas a plazos más

CUADRO 1

TITULOS OBTENIDOS EN LAS MUESTRAS CAPILARES CONSERVADAS A TEMPERATURA AMBIENTE

Muestra	Días transcurridos a partir del día "0"										
	5'	7'	12'	19'	26'	33'	40'	47'	54'	61'	68'
1	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:16	1:16	1:16	1:8	1:4
2	1:8	1:8	1:16	1:16	1:8	1:16	1:16	1:16	1:16	1:8	1:8
3	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:32	1:16	1:16	1:8	1:8
4	1:4	1:4	1:8	1:4	1:4	1:4	1:4	1:8	1:4	Neg	Neg
5	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	Neg	Neg
6	1:4	1:4	1:8	1:8	1:4	1:8	1:8	1:8	1:4	1:4	1:4
7	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	Neg	Neg	Neg
8	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:32	1:32	1:16	1:16	1:4
9	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:32	1:32	1:16	1:16	1:16
10	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	Neg	Neg

Para fines prácticos, un título < 4 se considera NEGATIVO

CUADRO 2

TITULOS OBTENIDOS EN LAS MUESTRAS CAPILARES CONSERVADAS A REFRIGERACION A 4°C

Muestra	Días transcurridos a partir del día "0"										
	5'	7'	12'	19'	26'	33'	40'	47'	54'	61'	68'
1	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:16	1:16	1:8	1:8	1:8
2	1:8	1:8	1:16	1:8	1:8	1:16	1:16	1:16	1:8	1:16	1:16
3	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:32	1:16	1:16	1:8	1:16
4	1:4	1:4	1:8	1:8	1:4	1:8	1:4	1:8	1:4	1:4	1:4
5	1:4	1:4	1:8	1:4	1:4	1:8	1:4	1:8	Neg	Neg	Neg
6	1:4	1:4	1:16	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:4	1:4	1:4
7	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	Neg	Neg	Neg
8	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:32	1:32	1:16	1:16	1:16
9	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:32	1:32	1:16	1:16	1:16
10	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	Neg	Neg	Neg

CUADRO 3

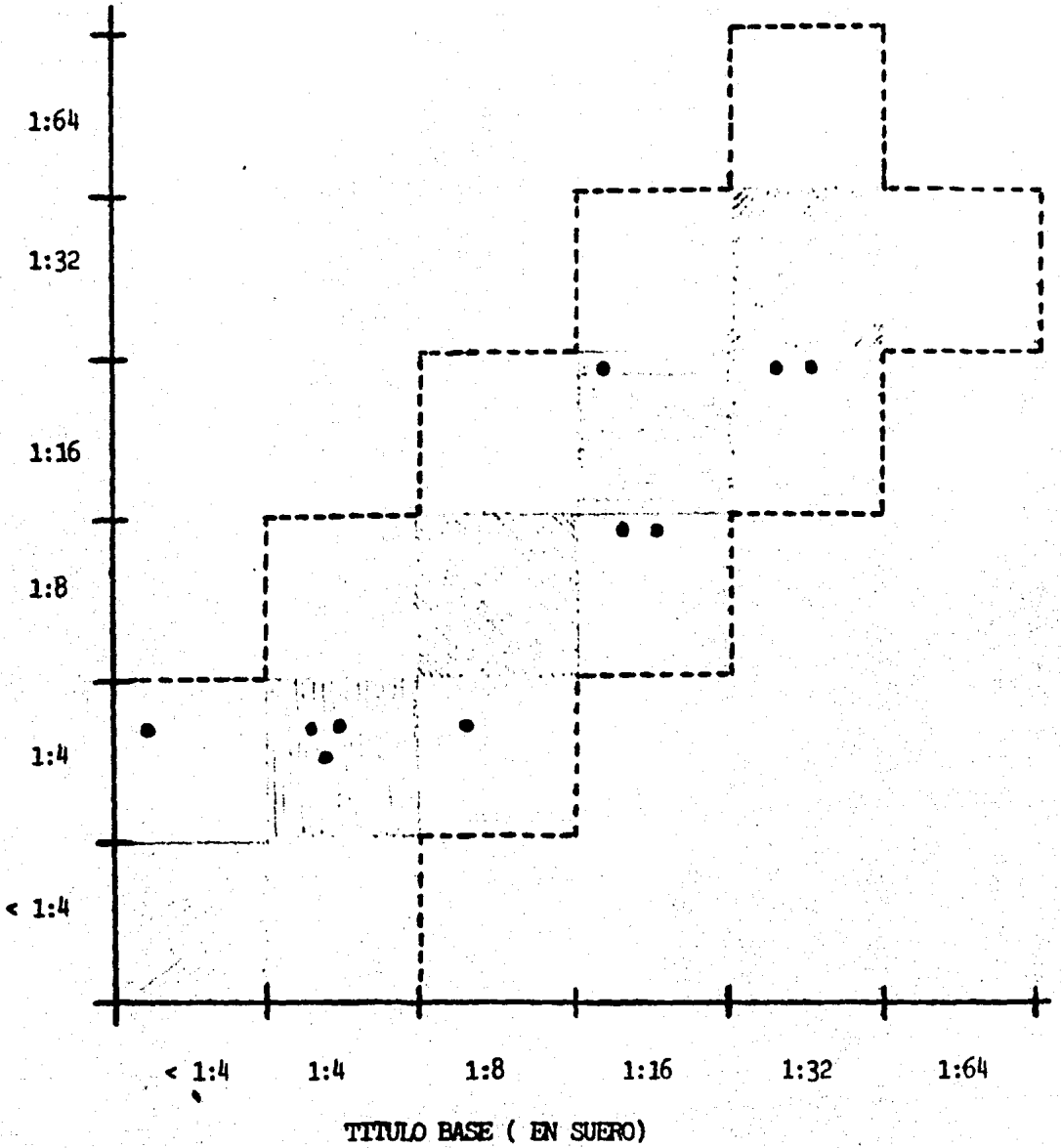
TITULOS OBTENIDOS EN LAS MUESTRAS CAPILARES CONSERVADAS EN  
CONGELACION A -20°C

Muestra	Título base	Días transcurridos a partir del día "0"	
		33	68
1	1:16	1:16	1:8
2	1:16	1:16	1:16
3	1:16	1:32	1:16
4	1:4	1:4	1:4
5	1:4	1:4	Neg
6	1:8	1:8	1:4
7	1:2	1:4	Neg
8	1:32	1:32	1:16
9	1:32	1:32	1:16
10	1:4	1:4	Neg

Para fines prácticos, un título < 4 se considera negativo.

FIGURA 4

## CORRELACION DE RESULTADOS





largos podría definirse con certeza si en alguna de estas 2 condiciones de conservación se logra, en efecto, una estabilidad más prolongada.

Desde el punto de vista práctico, la seguridad de que las muestras de sangre obtenidas por punción capilar pueden conservar sus anticuerpos, sin pérdida del título, por 2 meses cuando menos, representa un elemento importante de confianza en los resultados cuando las pruebas de laboratorio no pueden realizarse en seguida, o cuando por otras razones es preferible o conveniente acumular muestras durante algún tiempo antes de proceder a las titulaciones de anticuerpos.

La correlación de los resultados obtenidos en las muestras por punción venosa y por punción capilar fué muy satisfactoria, según puede verse en la figura No. 4, ya que en ningún caso la diferencia fue mayor de una dilución.

## CONCLUSIONES

1) El procedimiento para obtener muestras de sangre por punción capilar presenta algunas ventajas sobre el procedimiento de punción venosa, en particular mayor sencillez y aceptabilidad tanto para el paciente como para la persona encargada de obtener la muestra, menos traumatismo y menor costo tanto por concepto de materiales como de tiempo.

2) La manipulación de las muestras obtenidas por punción capilar, en las condiciones mencionadas, permite disponer de un material biológico satisfactorio para la determinación cuantitativa de anticuerpos - inhibidores de la hemaglutinación contra el virus del sarampión, y muy probablemente lo anterior sea aplicable a muy diversos antígenos virales y de otra naturaleza.

3) Las muestras absorbidas en papel filtro y conservadas a temperatura ambiente en recipientes herméticos, se mantienen estables, desde el punto de vista de un contenido de anticuerpos específicos por un período aproximado de 6 semanas en el caso de muestras con título original

muy bajo.

4) La estabilidad de los anticuerpos específicos presentes en las muestras conservadas tanto a  $4^{\circ}\text{C}$  como a  $-20^{\circ}\text{C}$  no mostró diferencia - apreciable al término de 68 días a partir de que fueron obtenidos, pero no se descarta la posibilidad de que a plazos más largos si pueda demostrarse una diferencia apreciable.

5) Una vez demostrada la estabilidad de las muestras obtenidas en esta forma, resulta muy recomendable el procedimiento sobre todo en el caso de niños pequeños y cuando se van a realizar estudios de tipo epidemiológico o pruebas de efectividad de vacunas.

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

1. Adams, E. and Hanson, R.P.: A PROCEDURE FOR ADSORBING VIRUS NEUTRALIZING ANTIBODIES ON PAPER DISKS. *J Bact* 72: 572, 1956.
2. Karstad, L., Spalatin, J. and Hanson, R.P.: APPLICATION OF THE PAPER DISC TECHNIQUE TO THE COLLECTION OF WHOLE BLOOD AND SERUM SAMPLES IN STUDIES ON EASTERN EQUINE ENCEPHALOMYELITIS. *J Infect Dis* 101: 295-299, 1957.
3. Gree, R.H. and Opton, E.M.: A MICROMETHOD FOR DETERMINATION OF POLIOVIRUS ANTIBODY SUITABLE FOR MASS SURVEYS. *Amer J Hyg* 72: 195-203, 1960.
4. Kalter, S.S.: DISC METHOD FOR IDENTIFICATION AND TITRATION OF CITOPATHIC VIRUSES AND DETECTION OF ANTIBODIES RESULTING FROM THEIR INFECTION. *J Lab Clin Med* 62: 525-534, 1963.
5. Brody, J.A.: HEMAGGLUTINATION-INHIBITION AND NEUTRALIZATION TEST USING WHOLE BLOOD DRIED ON FILTERPAPER DISCS. *Lancet* 2:616, 1963.
6. Brody, J.A., McAlister, R., Haseley, R. and Lee, P.: USE OF DRIED WHOLE BLOOD COLLECTED ON FILTER PAPER DISKS IN ADENOVIRUS COMPLEMENT FIXATION AND MESLES HEMAGGLUTINATION INHIBITION TEST. *J Immunol* 92: 854-857, 1964.
7. Todd-Sanford, I., David Sohn and Henry, J.B.: METODOS EMPLEADOS EN EL ANALISIS DE SANGRE. *Diagnóstico clínico por el laboratorio*. 5a. Edición 5: 117-120, 1979.
8. Fenner, F. and White David O: VIROLOGIA MEDICA. 2a. Edición, 14, 21: 256-258, 365-371, 1981.

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

1. Adams, E. and Hanson, R.P.: A PROCEDURE FOR ADSORBING VIRUS NEUTRALIZING ANTIBODIES ON PAPER DISKS. J Bact 72: 572, 1956.
2. Karstad, L., Spalatin, J. and Hanson, R.P.: APPLICATION OF THE PAPER DISC TECHNIQUE TO THE COLLECTION OF WHOLE BLOOD AND SERUM SAMPLES IN STUDIES ON EASTERN EQUINE ENCEPHALOMYELITIS. J Infect Dis 101: 295-299, 1957.
3. Gree, R.H. and Opton, E.M.: A MICROMETHOD FOR DETERMINATION OF POLIOVIRUS ANTIBODY SUITABLE FOR MASS SURVEYS. Amer J Hyg 72: 195-203, 1960.
4. Kalter, S.S.: DISC METHOD FOR IDENTIFICATION AND TITRATION OF CITOPATHIC VIRUSES AND DETECTION OF ANTIBODIES RESULTING FROM THEIR INFECTION. J Lab Clin Med 62: 525-534, 1963.
5. Brody, J.A.: HEMAGGLUTINATION-INHIBITION AND NEUTRALIZATION TEST USING WHOLE BLOOD DRIED ON FILTERPAPER DISCS. Lancet 2:616, 1963.
6. Brody, J.A., McAlister, R., Haseley, R. and Lee, P.: USE OF DRIED WHOLE BLOOD COLLECTED ON FILTER PAPER DISKS IN ADENOVIRUS COMPLEMENT FIXATION AND MESLES HEMAGGLUTINATION INHIBITION TEST. J Immunol 92: 854-857, 1964.
7. Todd-Sanford, I., David Sohn and Henry, J.B.: METODOS EMPLEADOS EN EL ANALISIS DE SANGRE. Diagnóstico clínico por el laboratorio. 5a. Edición 5: 117-120, 1979.
8. Fenner, F. and White David O: VIROLOGIA MEDICA. 2a. Edición, 14, 21: 256-258, 365-371, 1981.

9. Hall, W.W. and Martin, S.J.: THE BIOCHEMICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS ON THE SURFACE COMPONENTS OF MEASLES VIRUS. *J Gen Virol* 22: 363-374, 1974.
10. Edwin, H. Lennette, Nathalie, J. Schmidt: MEASLES VIRUS. DIAGNOSTIC PROCEDURES FOR VIRAL, RICKETTSIAL AND CHLAMYDIAL INFECTION. 5a. edition 22: 665-693, 1981.