

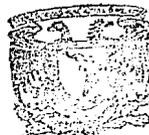
29:55



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**DIAGNOSTICO DIFERENCIAL POR PRUEBAS
DE LABORATORIO DE INFECCIONES DE
DENGUE Y RUBEOLA**



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

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

MEXICO. D. F.

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

RESUMEN.	1
INTRODUCCION.	3
Estrategias y Técnicas Utilizadas en el Diagnóstico de Laboratorio.	4
Métodos Directos.	4
Métodos Indirectos.	8
Sintomatología Clínica Originada por Diferentes Virus.	9
Clasificación y Características Estructurales y Morfológicas de los Virus de Dengue y Rubeóla.	13
Epidemiología de Dengue y Rubeóla.	14
Respuesta Inmunológica a las Infecciones de Dengue y Rubeóla.	18
Métodos para la Determinación de Inmunoglobulina M.	21
Técnicas Seleccionadas en este Trabajo.	22
Planteamiento del Problema.	22
Objetivo.	22
DISEÑO EXPERIMENTAL.	23
MATERIAL Y METODOS.	24
Material Biológico.	24
Reactivos.	25
Obtención del antígeno de rubeóla.	26
Obtención de los eritrocitos de pollo, para el tratamiento del suero y para la prueba de inhibición de la hemaglutinación.	27
Determinación del volumen del paquete celular requerido para el tratamiento del suero y para la prueba de inhibición de la hemaglutinación.	28

Estandarización de la suspensión de eritrocitos para las pruebas de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación.	29
Eritrocitos de pollo para el tratamiento de los sueros.	31
Tratamiento del suero para remover inhibidores no específicos y aglutininas por tratamiento con Heparina-MnCl ₂ .	31
Titulación del antígeno.	32
Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación.	34
Preparación del Gradiente de Sacarosa.	37
Preparación del Suero para el Gradiente de Sacarosa.	38
Formación del Gradiente de Densidad de Sacarosa por centrifugación.	38
Tratamiento de los sueros con 2-mercaptoetanol.	39
Determinación de Porcentaje de Sacarosa por Refractometría.	39
RESULTADOS.	
Origen de los sueros estudiados.	40
Suero de referencia con título expresado en unidades internacionales por mililitro.	40
Titulación de Anticuerpos Antirubeóla por Inhibición de la Hemaglutinación.	41
Determinación de IgM antirubeóla.	44
DISCUSION.	60
CONCLUSIONES.	64
APENDICE.	65
BIBLIOGRAFIA.	69

RESUMEN

1.

El diagnóstico de infecciones virales basado únicamente en observaciones clínicas no es confiable y requiere su comprobación por diagnóstico de laboratorio.

Las infecciones de dengue y rubeola se confunden por sintomatología clínica.

El dengue es endémico en zonas tropicales y subtropicales de nuestro país, es transmitido al humano por medio de la picadura de la hembra hematófaga del mosquito Aedes aegypti. Anualmente se reportan epidemias que han incapacitado a miles de individuos pero existe la amenaza de que aparezcan síndromes graves y fatales de presentarse una reinfección por diferente serotipo.

La rubeola es una enfermedad exantemática leve, que generalmente se presenta en la infancia, pero que puede presentarse a cualquier edad. La infección de rubeola en mujeres embarazadas susceptibles a la infección ocasiona efectos teratogénicos al feto, presentandose abortos, mortinatos o el nacimiento de niños con el síndrome de rubeola congénita.

Es importante el control de estas dos infecciones, para evitar consecuencias graves que pueden ser fatales por confusión en el diagnóstico clínico.

Se estudiaron 71 pacientes con diagnóstico clínico de dengue y negativo por serología de los cuales 10 pacientes presentaban altos títulos de anticuerpos anti-rubeola indicativos de infección activa.

Se comprobó por reducción con 2-mercaptoetanol y fraccionamiento en gradiente de sacarosa que 7 de los 10 pacientes padecían la infección por primera vez

y que 3 pacientes presentaban una reinfección.

INTRODUCCION

La mayoría de las de las infecciones virales presentan síntomas clínicos similares, dificultando así la identificación del agente etiológico.(7)(13)

Por lo que el diagnóstico confiable sólo se obtiene a través de la información proporcionada por estudios de laboratorio.

La necesidad de disponer de un diagnóstico confiable de las infecciones virales se ha hecho más evidente en los últimos años, debido en parte, a que actualmente se disponen de drogas antivirales específicas que facilitan el control de la infección en fase temprana y facilitan la prescripción del tratamiento adecuado que debe darse al paciente. Además el identificar el agente etiológico permite establecer las medidas de protección que deben implementarse para evitar su transmisión en el ambiente hospitalario y en la comunidad.(28)(35)

Las técnicas utilizadas tradicionalmente en el diagnóstico de laboratorio, requieren de equipo y material costoso, de personal entrenado y presentan el inconveniente del tiempo requerido para la obtención de resultados, por lo general se requieren de varios días (2 a 5); la utilidad de identificar al agente etiológico es más bien retrospectivo.

Estos inconvenientes han favorecido el desarrollo de técnicas rápidas de laboratorio para el diagnóstico de infecciones virales. La Organización Mundial de la Salud ha definido como "técnicas de diagnóstico rápido en infecciones virales" a aquellas que dan resultados satisfactorios en pocas horas (de 4 a 8 horas), a diferencia de las técnicas convencionales que requieren de varios días para tener resultados.(19)(28)(46)

El diagnóstico viral rápido ofrece ventajas sobre los métodos convencionales entre ellas: 1) La identificación oportuna del agente etiológico responsable de la infección, ayuda a prevenir infecciones nosocomiales y su transmisión, principalmente en infecciones que suelen ser asintomáticas o en aquellas que presentan síntomas atípicos, 2) El manejo apropiado del paciente basado en el diagnóstico rápido de la infección, permite una reducción en la morbilidad y mortalidad, 3) 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. (19)(46)

ESTRATEGIAS Y TECNICAS UTILIZADAS EN EL DIAGNOSTICO DE LABORATORIO.

Las estrategias que se utilizan en el diagnóstico de laboratorio de las infecciones virales son de dos tipos: el método directo, el cual se basa en la identificación y aislamiento del virus o de sus componentes y el método indirecto, que permite la identificación del agente infeccioso a través de la respuesta inmune que presenta el organismo a la infección viral.(39)(41)

Para ambos métodos, se ha enfatizado en la utilización de técnicas inmunológicas en virtud de que se obtienen resultados confiables en pocas horas, son sensibles, específicas y no requieren personal altamente capacitado.

Métodos Directos.

El agente etiológico puede identificarse como tal o bien a través de los cambios que origina la infección viral en la célula.

a) Visualización del Virus.

La visualización del virus puede realizarse con el microscopio electrónico. La morfología característica de algunos virus puede identificarse al observar el espécimen en el microscopio, además es posible incrementar el contraste utilizando agentes que difracten el haz de electrones y no alteren el virus. De esta manera se han identificado algunos virus y se han relacionado con la sintomatología clínica que presentan.(1)(7)

La identificación viral puede hacerse directamente en las muestras clínicas, sin embargo requiere de altas concentraciones virales y componentes frecuentes en el material biológico suelen interferir en la identificación del agente infeccioso. Además se disponen de recursos que facilitan la identificación del virus, como unir anticuerpos específicos al virus y observar directamente el complejo antígeno-anticuerpo o bien uniendo el anticuerpo a un marcador y así incrementar la sensibilidad de identificar el complejo antígeno-anticuerpo.(2)

b) Aislamiento del Virus.

El aislamiento del agente infeccioso de muestras clínicas se logra a través de su multiplicación en sistemas biológicos, frecuentemente se utilizan: cultivos celulares, huevos embrionados de pollo y animales de laboratorio. (17)

Antes de 1950, el huésped frecuentemente utilizado para el cultivo de virus humanos era el huevo embrionado de pollo, técnica implementada por Good-pasture en 1931. La mayoría de los virus conocidos durante esa época eran capaces de proliferar en células de las membranas embrionarias, el amnios, el alantoides, el corión o el saco vitelino.(17)

En la actualidad el huevo embrionado de pollo es usado raramente en el diagnóstico viral, ya que se ha remplazado por los cultivos celulares.

En 1949, Enders, Weller y Robbins, descubren que la multiplicación del virus de la polio en cultivos celulares originaba alteraciones citológicas reconocibles y específicas, que permiten la identificación de diferentes virus por los cambios que producen en las células en las cuales se multiplican. La utilización de cultivos en líneas celulares ha revolucionado el diagnóstico de enfermedades virales, el desarrollo de vacunas y avances en el conocimiento de la multiplicación viral y de la interacción virus-celula. (17)(39)

Al igual que los huevos embrionados de pollo, los animales de laboratorio practicamente han desaparecido, en la actualidad en los laboratorios de diagnóstico se utilizan cultivos celulares que son más fáciles de manejar y muchos más versátiles; sin embargo, para el aislamiento de virus como coxsackie y arbovirus se utilizan ratones lactantes.(17)

c) Determinación de la Multiplicación Viral por Cambios Originados en la Celula.

La infección viral ocasiona cambios en cultivos celulares, los cuales son de tres tipos: 1) Infección citocida, en la cual la infección origina muerte celular; 2) Infección no citocida de estado estacionario, en esta las células producen virus sin afectar considerablemente el metabolismo celular y 3) Transformación Celular, en la cual el virus no mata a la celula pero altera permanentemente sus características y permanece el genoma viral en la celula infectada.(17)(39)

Las alteraciones citológicas producidas en cultivos de líneas celulares por algunos virus es lo suficientemente característicos y puede utilizarse como crite-

rio confiable para el diagnóstico.

El efecto citopático (ECP) del virus se debe a la acción destructora de productos del virus e la célula que infecta.

Mientras algunos virus producen cambios en las membranas celulares, otros dan como resultado la fusión de células infectadas con células vecinas no infectadas, formando sincicios (células gigantes con muchos núcleos), otros virus producen cuerpos de inclusión.(17)

Dependiendo de los virus que los origine tales inclusiones pueden ser simples o múltiples; grandes o pequeñas; redondas o de forma irregular; internucleares o intracitoplásmicas; acidófilas o basófilas. Los cuerpos de inclusiones virales más característicos son las inclusiones citoplásmicas encontradas en células infectadas por poxvirus, paramixovirus, reovirus y el virus de la rabia y las inclusiones intranucleares producidas por el virus del herpes y adenovirus.(17)

d) Determinación de la Presencia de Componentes Virales.

La cuantificación de componentes virales en células, tejidos y fluidos corporales, puede utilizarse en el diagnóstico de infecciones virales.(2)

De los componentes virales, los que se han utilizado comunmente en el diagnóstico de laboratorio son proteínas virales, enzimas específicas codificadas por el virus y los ácidos nucleicos. (2)

Métodos Indirectos.

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

Una primoinfección se diagnóstica midiendo la concentración de inmunoglobulinas M. La determinación de una infección se determina al observar un incremento en un factor de 4 veces del título de fase aguda a fase convalescente. (12)

La determinación de inmunoglobulinas se hace por medio de la detección de la reacción antígeno-anticuerpo. La sensibilidad de la reacción puede incrementarse si a uno de los componentes de la reacción se acopla un marcador que puede determinarse a bajas concentraciones. Los marcadores generalmente utilizados son: fluoresceína en la técnica de Inmunofluorescencia (IFA); isotopos radiactivos en la técnica de Radioinmunoensayo (RIA) y enzimas en la técnica de Ensayo inmunoenzimático (ELISA). (41)

La interacción antígeno-anticuerpo puede cuantificarse a través de la reacción secundaria, es decir determinar el efecto de dicha unión, las técnicas comúnmente utilizadas son: Fijación de Complemento (Fc); Inhibición de la Hemaglutinación (IHA) y Neutralización de la Infectividad viral (Nt).

Fijación de Complemento.- Esta técnica involucra dos reacciones, la primera es la interacción del antígeno con su anticuerpo específico al llevarse a cabo esta reacción fija complemento, la segunda reacción involucra la presencia de complemento no fijado que puede adicionarse a eritrocitos sensibilizados con hemolisina produciendo hemólisis.

Inhibición de la Hemaglutinación. Algunos virus tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos de ciertas especies animales. Si hacemos reaccionar el virus con su anticuerpo específico, esta capacidad se inhibe debido a que estos bloquean los sitios de interacción con los eritrocitos.

Neutralización.- Los anticuerpos neutralizan: la infectividad del virus previniendo la adsorción del virus a líneas celulares y observándose la presencia o ausencia de daño celular.

Algunas de estas técnicas ya han sido remplazadas por su inespecificidad y baja sensibilidad o por las dificultades que implican el realizarlas en algunos laboratorios como Neutralización, Fijación de Complemento e Inmunofluorescencia.

Otras presentan riesgos y requieren equipo especial como Radioinmunoensayo. Sin embargo la Inhibición de la Hemaglutinación y Ensayo inmunoenzimático ofrecen ventajas por ser rápidas, fáciles de realizar y específicas. (17) (39)

Sintomatología Clínica Originada por Diferentes Virus.

El cuadro clínico de diferentes infecciones virales resulta muchas veces confuso, tal es el caso de infecciones como rubeóla, dengue, sarampión, varicela, exantema subitio, infecciones por echovirus, cosackivirus, adenovirus, paramixovirus, reovirus, eritema infeccioso, escarlatina, etc. Cuadro No. 1 (14)(17)(27)

CUADRO NO. 1
DIAGNOSTICO DIFERENCIAL EN DENGUE Y RUBEOLA

ENFERMEDAD	PERIODO PREXANTEMATICO	EXANTEMA		DURACION Y LESIONES RE- SIDUALES.	PRUEBAS DIAGNOSTICAS
		CARACTERISTICAS	DISTRIBUCION		
DENGUE	Habitualmente no existe.	Maculopápulas rosadas de 1 a 3 mm.	Aparece en el tronco y se extiende a cara extremidades.	Persiste de 3 a 5 días, sin dejar lesiones.	Elevación de acs. Aislamiento del virus.
RUBEOLA	Habitualmente no existe o pasa desapercibida la linfadenopatía.	Maculopápulas rosadas de 1 a 3 mm, poco intensas y con poca tendencia a la confluencia.	Se inicia en la cara y cuello y se generaliza a todo el cuerpo.	Persiste 3 días dejando mínima o ninguna descamación.	Elevación de acs. Aislamiento del virus.
SARAMPION	Fiebre, rinorrea tos, conjuntivitis, durante 3 a 5 días.	Maculopápulas rojas de 2 a 5 mm intensas.	Se inicia en el cuello y se generaliza de arriba a abajo.	Persiste durante 5 a 6 días dejando manchas café y descamación furfurácea.	Elevación de acs. Aislamiento del virus.
VARICELA	No existe.	Maculopápulas, que desaparecen en pocas horas y apare-	Tiende a ser centrípeta, tronco, brazos	Persiste de 3 a 5 días, con complicaciones cutáneas.	Elevación de acs. Aislamiento del virus.
EXANTEMA POR ENTEROVIRUS.	Habitualmente no existe. En algunos cuadros producidos por virus Echo, puede haber fiebre poco elevada.	La mayoría con exantema parecido al de rubeola. Algunos sero tipos de Echo, causan vesículas de 2 a 3mm.	Generalizado de rápida progresión.	Desaparece en 2 ó 3 días sin dejar lesiones.	Elevación de acs. Aislamiento del virus.
EXANTEMA SUBITO.	Fiebre elevada durante 3 ó 4 días.		Se inicia en el tronco y se generaliza en pocas horas.	Desaparece en 24 ó 48 horas sin dejar lesiones.	Ninguna.
ERITEMA INFECCIOSO.	Habitualmente no existe.	Maculopápulas rosadas de 1 a 3 mm, rodeadas por halo palido.	Se inicia en las mejillas y un día después en extremidades.	Persiste por 5 ó 7 días. Recaidas ocasionadas por irritantes cutáneos.	Ninguna.

Sintomatología Clínica del Dengue.

- Fiebre : comienza bruscamente y se mantiene sostenida a un nivel de 39 a 40° C, y dura sostenida de 2 a 7 días.
- Manifestaciones hemorrágicas: petequias, púrpura trombocitopenica, esquimosis, epistaxis, hemorragias en las encías, hematemesis o melena, prueba positiva del torniquete.
- Hepatomegalia es más de 90% de los casos de adultos y 60% en los niños.
- Estados de Choque, con inquietud, estremidades frías, pulso rápido y débil.
- Artralgia, mialgia, cefalea, dolor de ojos, conjuntivitis, fotofobia, dolor de garganta, etc.
- Exantema.
- En la biometría hemática, hematócrito elevado por lo menos 20% y menos de 100, 000 plaquetas/ mm³.
- Puede presentarse casos graves y fatales como Fiebre Hemorrágica de Dengue (FHD), en caso de presentarse una reinfección por diferente serotipo, principalmente por el serotipo 2. (17)(27)(36)(44)

Sintomatología Clínica de Rubeola.

La infección de rubeola existe en dos formas: la infección postnatal y la infección congénita. (27)

La infección postnatal generalmente es benigna. Además de las lesiones inflamatorias moderadas en la mucosa nasal y de la faringe, se presenta exantema cutáneo, linfadenopatía generalizada como edema e hiperplasia reticular. Muy raros casos pueden presentar artralgia, artritis, antropia (inflamación aguda transitoria), encefalitis esta última es del tipo de encefalitis postinfecciosa y tam-

bién puede presentarse púrpura trombocitopénica (17)(27)

Aproximadamente de un 25% a un 50% de las infecciones postnatales son asintomáticas o subclínicas. (13)

La infección de rubeóla en mujeres embarazadas puede ocasionar la infección congénita, en la cual el feto es infectado por el paso del virus a través de la placenta ocasionando abortos, mortinatos o el nacimiento de niños con el síndrome de rubeóla congénita (SRC).(34)

La posibilidad de contraer rubeóla congénita depende principalmente del mes del embarazo en que se adquiere la infección. El riesgo de daño fetal es mayor cuando la infección ocurre durante las primeras ocho semanas del embarazo, ya que en este tiempo se lleva a cabo la organogénesis, el porcentaje disminuye al 50%, cuando la infección ocurre durante la semana 9 a la 13 y es aproximadamente del 15% cuando la infección ocurre entre la semana 14 a la 20.(23)(34)

El síndrome de rubeóla congénita está caracterizado por uno o varios de los siguientes defectos teratogénicos: (17)(27)

- Malformaciones oculares: cataratas, glaucoma, retinopatía, microftalmía.
- Malformaciones cardíacas: persistencia del conducto arterioso, comunicaciones intraventriculares, etc.
- Sordera: lesiones cocleares y del órgano de Cortí.
- Alteraciones cerebrales: microcefalía, encefalitis, retraso psicomotor, parálisis.
- Lesiones viscerales diversas: hepatitis, esplanitis, neumotritis.
- Peso subnormal al nacimiento.

- Otras: púrpura trombocitopénica, osteoporosis, hernia inguinal, etc.

Clasificación y características Estructurales y Morfológicas de los Virus de Dengue y Rubeóla.

Virus de Dengue.- Los virus de dengue pertenecen a la familia *Togaviridae* y al género *Flavivirus*; por reacciones serológicas se distinguen 4 serotipos y comparten antígenos con los virus de la fiebre amarilla, encefalitis japonesa y de San Luis.(16)(17)(27).

El virus del dengue contiene una molécula de ácido ribonucleico (RNA), de una sola cadena de peso molecular de 4×10^6 daltons.(16)

El virión tiene una configuración esférica de 36 a 44 nm de diámetro. Contiene tres clases de proteínas denominadas VP_1 , VP_2 y VP_3 ; con pesos moleculares de 8×10^3 , 14×10^3 y $51 - 59 \times 10^3$ daltons respectivamente. Las partículas VP_1 y VP_2 se encuentran en la cápside; mientras que la proteína VP_3 es una glicoproteína localizada en la envoltura; a esta se le asocia el poder hemaglutinante del virus. Figura No. 1 (16)(25)(38)

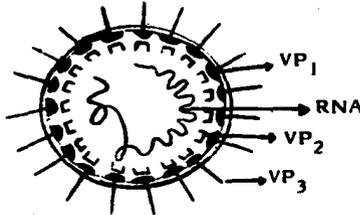


Figura No. 1

Virus de Rubeóla.- Se encuentra clasificado en la familia *Togaviridae* y es el único miembro del género *Rubivirus*. Se encuentra un sólo serotipo de este virus por anticuerpos policlonales.(24).

El virión está compuesto de tres proteínas estructurales E_1 , E_2 y C; con pesos moleculares de 60×10^3 , 47×10^3 y 33×10^3 daltons respectivamente. Mide aproximadamente 150 a 200 nm de diámetro, es pleomorfo y contiene una molécula de ácido ribonucleico (RNA) de una sola cadena, cuyo peso aproximado es de 3×10^6 daltons. Las proteínas E_1 y E_2 son glicoproteínas que se encuentran en la envoltura lipídica del virión, mientras que la proteína C es una nucleoproteína. La proteína E_1 , es la molécula más grande de las dos glicoproteínas a la cual se le asocia la función hemaglutinante del virus y es independiente de la respuesta a la infectividad del virus. Figura No. 2(16)(23)(24).

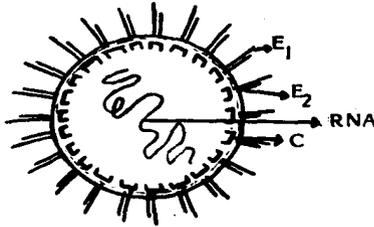


Figura No. 2

Epidemiología de Dengue y Rubéola en México.

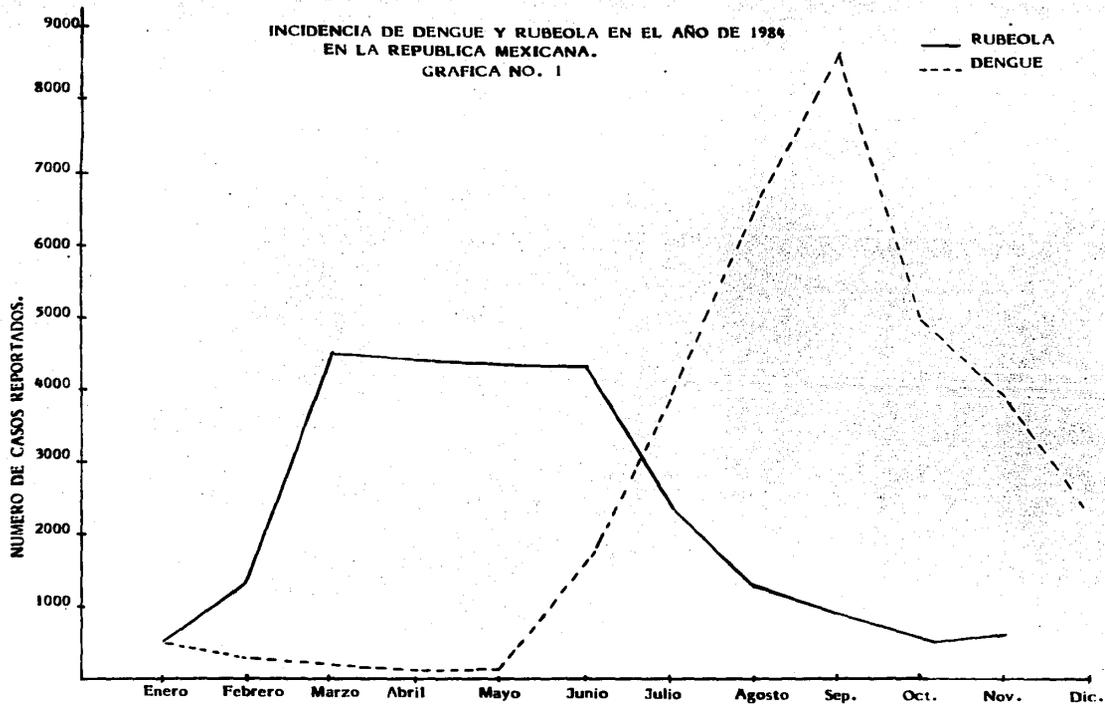
Aunque la mayor parte del año se reportan infecciones de dengue y rubéola existen meses de mayor incidencia.

Para dengue de junio a noviembre y para rubéola de febrero a julio. (6)(7).

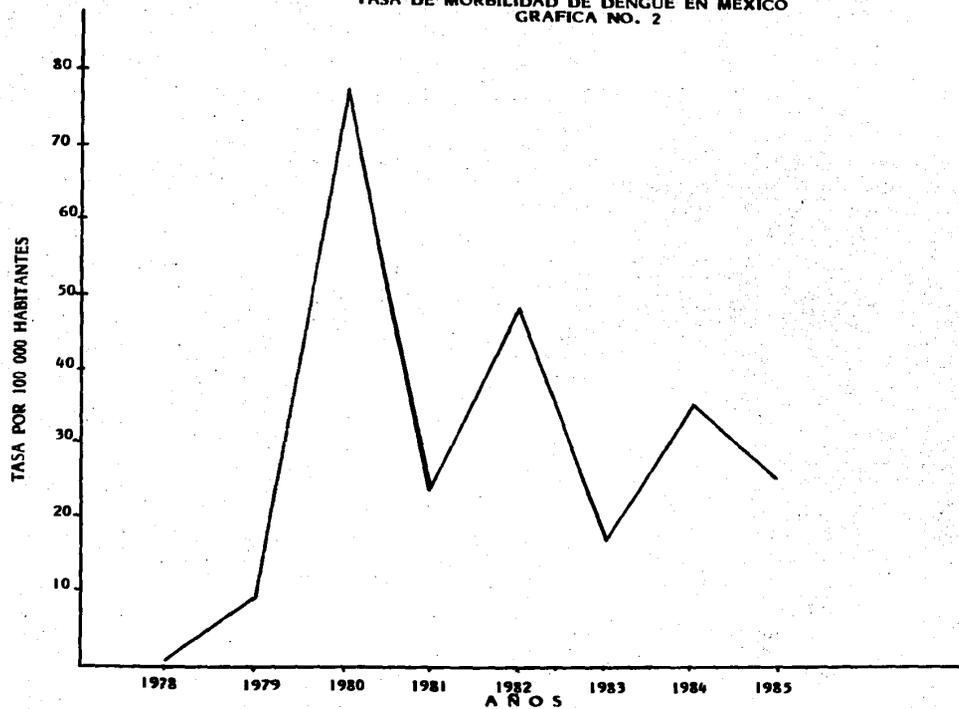
En la Gráfica No. 1. se observó la incidencias reportadas de estas infecciones, en los meses de mayo a agosto hay una sobreposición mayor, lo cual ocasiona una confusión al tipo de agente etiológico que es responsable de la infección.

La incidencia de la infección de dengue se esquematiza en la Gráfica No. 2.

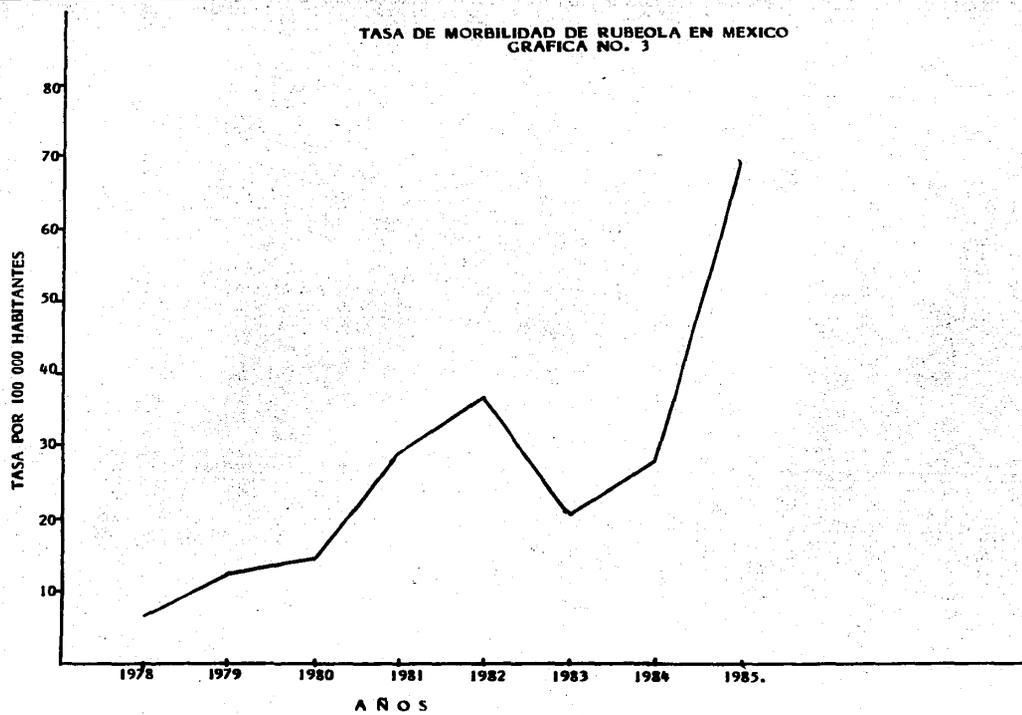
INCIDENCIA DE DENGUE Y RUBEOLA EN EL AÑO DE 1984
EN LA REPUBLICA MEXICANA.
GRAFICA NO. 1



TASA DE MORBILIDAD DE DENGUE EN MEXICO
GRAFICA NO. 2



TASA DE MORBILIDAD DE RUBEOLA EN MEXICO
GRAFICA NO. 3



Antes de 1978, no se habían reportado casos de dengue en México, pero a partir de ese año se empezaron a reportar casos de la infección en el Estado de Chiapas, sin embargo en los siguientes cinco años, la transmisión se diseminó a la mayoría de los estados del país. En 1980 el dengue se extendió por la costa Este de México, hasta alcanzar Texas. En la República Mexicana en 1981 y 1982, 16 y 17 estados respectivamente reportaron casos dengue. Se encuentra libre de esta infección únicamente los estados de la parte norte central del país, una área la cual es predominante desértica y montañosa.(10)(36)

En 1982 se reportaron 30 000 casos, mientras que 1983 se notificaron 12 967 casos de dengue en México. En 1980, 1982 y 1984 se han presentado epidemias de la infección de dengue, por lo que el disponer de un método de diagnóstico confiable, permite el prescribir el tratamiento adecuado al paciente, evitar contagios a la comunidad y establecer campañas para el control de la infección, una estrategia es controlando el vector.(3)(6)(7)(11)(15).

La incidencia de la infección de rubeóla a aumentado en los últimos años.

Gráfica No. 3. En 1978 la rubeóla ocupaba el 13o. lugar en infecciones transmisibles, en 1984 pasó a ocupar el 15o. lugar y en 1985 ocupa el 6o. lugar.(3)(6)(7).

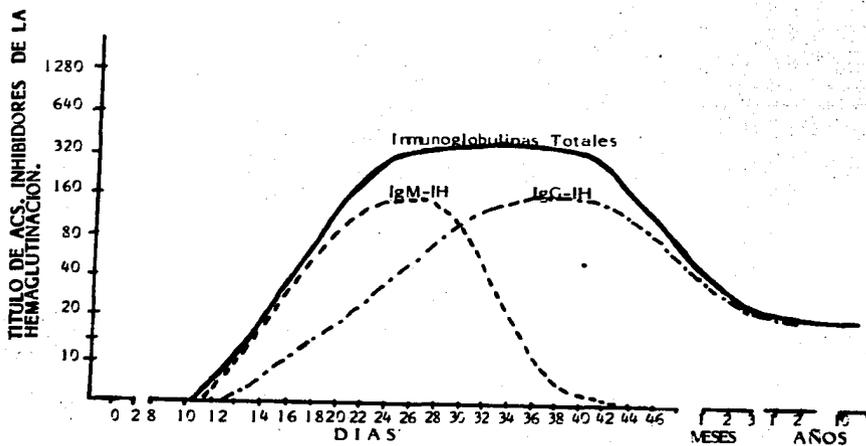
Este incremento puede reflejar un incremento real en la incidencia de la infección o una mejoría en el sistema de reporte de la infección o bien ambas causas pueden ser responsables.

Respuesta Inmunológica a las Infecciones de Dengue y Rubeóla.

En ambas infecciones aparecen las inmunoglobulinas M y G. La cinética y la concentración de estas varía de acuerdo a la infección.

Para dengue la inmunoglobulina M, aparece en el suero a los 10 días después del inicio de la infección, teniendo su máxima concentración alrededor del día 20 y

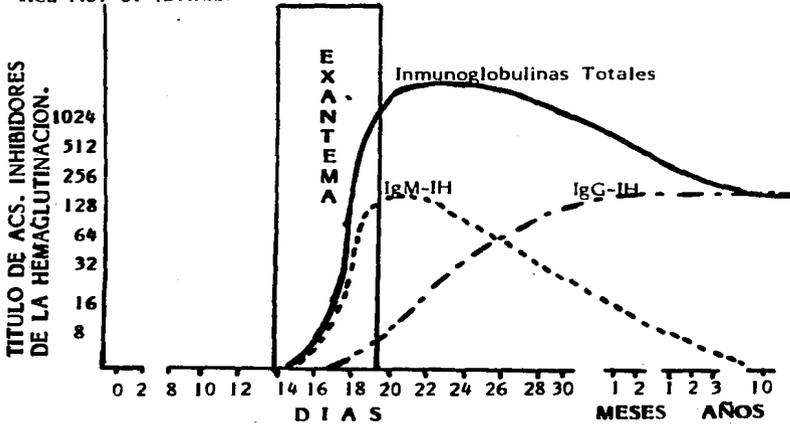
declinando rápidamente a niveles no detectables alrededor del día 45 después de la infección. Las inmunoglobulinas G aparecen 2 días después de las IgM, alcanzando su máximo alrededor del día 50, después del inicio de la infección; estas declinan lentamente pudiéndose detectar por algunos años. Gráfica No. 4 (37).



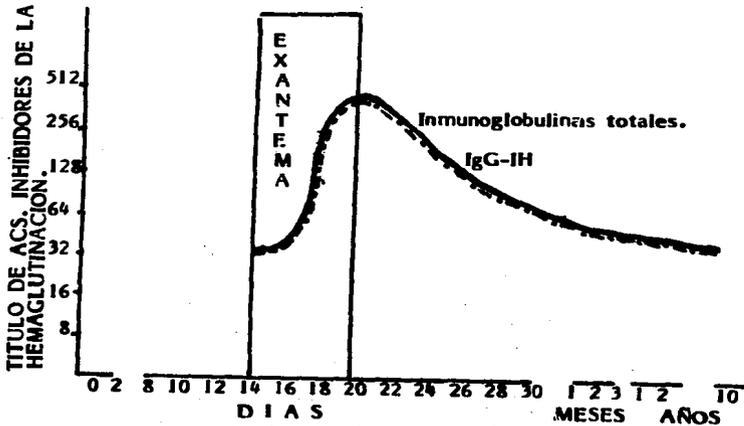
Gráfica No. 4. Dengue: Cinética de síntesis de las inmunoglobulinas inhibidoras de la hemaglutinación. (37).

En la rubeóla, la IgM antirubeóla aparece alrededor del día 16 después del inicio de la infección, alcanzando su máximo alrededor del día 25 y declinan rápidamente a niveles no detectables alrededor del día 50. Las inmunoglobulinas G aparecen 2 días después que las IgM, alcanzando su máximo alrededor del día 50, después del inicio de la infección y declinan muy lentamente persistiendo durante toda la vida. Gráfica No. 5. En una reinfección no aparece la inmunoglobulina M. Grá-

fíca No. 6. (21)(22)



Gráfica No. 5 . Rubeola: Cinética de síntesis de inmunoglobulinas inhibidoras de la hemaglutinación en primoinfección. (13).



Gráfica No. 6. Rubeola: Cinética de síntesis de inmunoglobulinas inhibidoras de la hemaglutinación en reinfección. (13)

Métodos para la Determinación de Inmunoglobulina M.

Los diferentes métodos para la determinación de inmunoglobulina M se basan en las propiedades fisicoquímicas de esta molécula. (4)(26)(31)(45)(47)

Método de reducción con 2-mercaptoetanol.- Se basa en la propiedad del 2-mercaptoetanol o ditiotrietol, para separar la molécula de IgM en cinco moléculas que no inhiben la hemaglutinación, por reducción de los puentes disulfuro entre las cadenas de los peptidos. El método es sencillo pero la sensibilidad es baja.

Método de fraccionamiento en gradiente de sacarosa. El método se basa en una diferencia en el coeficiente de sedimentación de las inmunoglobulinas M y G.

El de la IgM es de 19S y de otras inmunoglobulinas es de 7S a 11S. Estas inmunoglobulinas se pueden separar de otros anticuerpos por fraccionamiento en gradiente de sacarosa por ultracentrifugación.

La sensibilidad es alta cuando se incluyen controles apropiados, es factible de llevar a cabo cuando se trabaja un número pequeño de sueros, ya que la técnica es laboriosa y el uso de la ultracentrifuga es restringido por el tiempo de centrifugación. (26)(31).

Método de Cromatografía por Filtración en Gel.- Este método se basa en separar por tamaño las diferentes inmunoglobulinas al pasarlas a través de un gel. La inmunoglobulina M tiene un peso molecular de 900 000 y las otras inmunoglobulinas tienen un peso molecular de 150 000 a 400 000. Se utilizan columnas de Sepharosa (Sephadex - G200) o agarosa (Bio Gel A5M), a las cuales se les aplica el suero, las fracciones son colectadas y monitoreadas por densidad óptica a 280 nm.

Este método tiene alta sensibilidad, pero no es práctico para utilizarlo para el diagnóstico, ya que sólo dos sueros pueden trabajarse por día en cada gel.

Para descartar falsos positivos y tener resultados confiables se recomienda utilizar

22.
dos diferentes métodos, como reducción con 2-mercaptoetanol y gradiente de sacarosa o bien reducción con 2-mercaptoetanol con cromatografía por filtración en gel. (12)(42).

Técnicas Seleccionadas en este Trabajo.

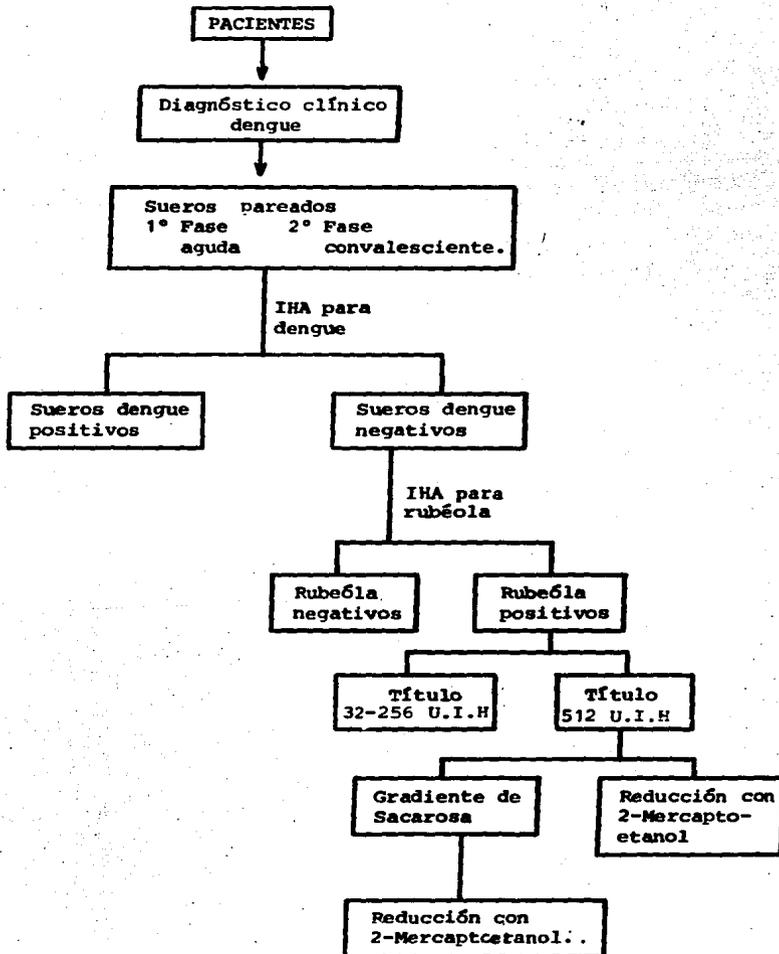
- Las técnicas utilizadas para el diagnóstico de las infecciones de dengue y rubeola fué el método de Inhibición de la Hemaglutinación (IHA). Para la detección de anticuerpos antirubeola se utilizó la técnica descrita por el manual del Centro de Enfermedades de Atlanta, Georgia, U.S.A.
- La demostración de inmunoglobulinas de la clase M, se realizó por dos métodos: 1º Reducción de 2-mercaptoetanol del suero total y 2º Separación en gradiente de sacarosa de las inmunoglobulinas M y G, reduciendo las fracciones con 2-mercaptoetanol.

Planteamiento del Problema.

Debido a que diferentes infecciones virales producen la misma sintomatología, es importante contar con la información que se obtiene en el laboratorio, para dar un diagnóstico certero.

Objetivo.

Comprobar por técnicas de laboratorio la ambigüedad del diagnóstico clínico entre dengue y rubeola.

DISEÑO EXPERIMENTAL.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO.

Antígeno de rubeóla.

Virus de rubeóla, cepa Therien, 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 de células VERO. El medio de mantenimiento consistía en medio basal (MBE), 0.2% de albúmina sérica bovina (ASB) y 0.5% de caldo triptosa fosfato.

La adaptación, propagación de este virus fué hecha por el M. en C. Enrique Ortega Soto y por las Q.F.B. Yolanda Varela Benítez y Teresa Montero Cañibe; quienes amablemente donaron el antígeno utilizado para este trabajo.

El virus de rubeóla se cultivó en células VERO, en medio esencial mínimo (MEM), adicionado de 10% de suero de ternera, 0.1% de penicilina y estreptomycinina y 50 µg/ml de nistatina. Las botellas de cultivo se incubaron a 35° C en atmósfera húmeda y CO₂; el sobrenadante se cosechó del 5º al 7º día postinfección.

Sueros Humanos.

1.- Ciento cuarenta y dos muestras de suero; de 71 pacientes con diagnóstico clínico de dengue y negativos por determinación de anticuerpos antidengue por la técnica de inhibición de la hemaglutinación. De estos sueros, 71 fueron de fase aguda y 71 de fase convalescente. Los 71 sueros pareados forman parte de un total de 331 muestras de sueros que fueron obtenidas durante la epidemia de dengue en Yucatán en 1984. Los sueros fueron enviados para su estudio por la M. en C. Ma. Alba Loroño, del Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" de la Universidad Autónoma de Yucatán.

- 2.- Sueros Humanos de referencia. Los sueros de referencia fueron donados por el Dr. Michel Trudel del Instituto Armand Frapper de la Universidad de Quebec, Cánada y titulados por la técnica de inhibición de la hemaglutinación en esa Institución.
- a) Suero control alto positivo, con título constante de 256 unidades inhibitoras de la hemaglutinación.
 - b) Suero control bajo positivo, cuyo título vario de 16 a 32 unidades inhibitoras de la hemaglutinación.
 - c) Suero control negativo, sin anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra rubeóla.
- 3.- Suero de refencia, donado por el Laboratorio de Salud Pública de Quebec, Cánada; con un título de 500 U.I./ml de IgG antirrubeóla.

REACTIVOS.

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

- Acido cítrico, Cat. 0110, Lot. M-36641.
- Barbital sódico, Cat. 7658. Lot. M-67891.
- Dextrosa anhidra, Cat. 1916, Lot. M-32342.
- Fosfato de sodio, Cat. 3818, Lot. M-301913.
- Sulfato de potasio, Cat. 9852. Lot. M-4582.

Procedente de Bio Rad, Laboratories, California, U.S.A.

2-mercaptoetanol. Lot. 27277.

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

- Acido clorhídrico, Cat. 317, Lot. 209296R.
- Cloruro de sodio, Cat. 6404, Lot. 206160R.

Etol absoluto, Cat. 15853, Lot. 211430N.

Fosfato de potasio monobásico, Cat. 104873, Lot. 901018.

Fosfato de potasio dibásico, Cat. 206586, Lot. 804353.

Hidróxido de sodio, Cat. 6598, Lot. 214102R.

Sacarosa, Cat. 9806, Lot. 8736.

Procedente de Ortho Diagnostic Systemans Inc. New Jersey, U.S.A.

Estándar de cianometahemoglobina, Lot. ACU208.

Reactivo de cianometahemoglobina, Lot. ACU865.

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

Albúmina sérica bovina, fracción V, Cat. A-9647, Lot.71F-0356.

Gelatina, grado bacteriológico. Cat. G0510.

Heparina, grado I, 100 000 unidades, Lot. 25F-0683.

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

Tween-80. Cat. 64590, Lot. 0381-Z.

MÉTODOS.

I. Obtención del antígeno de rubeóla.

El antígeno de rubeóla se obtiene tratando con Tween-80 al 20% y éter las cosechas virales.

a) Mezclar 0.9 volúmenes de la cosecha viral con 0.1 volúmenes de tween 80 al 20% en ASF pH= 7.3.

b) Incubar a 4°C; durante 15 minutos con agitación ocasional.

c) Adicionar 0.5 volúmenes de éter.

d) Incubar a 4°C; durante 15 minutos con agitación ocasional.

e) Eliminar la fase etérea con pipeta Pauster. El residuo de éter en la fase

acuosa es eliminado por medio de burbujeo de aire.

- f) Se titula el antígeno. (Ver titulación del antígeno).
- g) Conservar a 4°C o en atmósfera de nitrógeno.

II. Obtención de los eritrocitos de pollo, para el tratamiento del suero y para la prueba de inhibición de la hemaglutinación.

Se obtuvo la sangre de pollo de un día de nacidos y en ayunas de la raza Rhode Island Red de la casa Armour, Hatchery de México, S.A. de la siguiente manera:

- a) Preparar 6 gazas de 2 x 2 conteniendo alcohol etílico al 70%, para limpiar la zona del pollo donde se va realizar la punción.
- b) Colocar al pollo en un recipiente que contenga cloroformo (para eutanzarlo) y después sangrarlo.
- c) Prepara solución de Alsever.
- d) Asépticamente llenar un frasco de vidrio con unos 20 ml de solución de Alsever; etiquetar el frasco "Eritrocitos de pollo".
- e) Asépticamente poner en un frasco de 50 ml o en un vaso de precipitado de 50 ml solución de Alsever. En la zona de esterilidad llenar las jeringas con aproximadamente 3 ml de Alsever.
- f) Practicar la posición correcta para tomar el pollo para el sangrado.
 - Tomar el pollo en la mano y colocar entre los dedos índice y medio la cabeza y entre los dedos meñique y anular las patas.
 - Palpar y localizar la prominencia del esternón del pollo.
- g) Preparar una jeringa de 5 ml con una aguja de calibre No. 19, que contenga cerca de 3 ml de solución de Alsever.
- h) Insertar la jeringa por arriba de la prominencia, con inclinación de 45° con respecto al cuerpo del pollo, insertar 3/4 partes de la aguja y empezar a succionar hasta observar la salida de sangre y seguir succionando con movi-

mientos de la jeringa para evitar que se coagule la sangre. Sangrar a blanco.



Prominencia del esternón.

- i) Mezclar la sangre y el Alsever invirtiendo la jeringa varias veces y transferirla al frasco que está etiquetado "Eritrocitos de pollo".
- j) Repetir los pasos de h) al i) con cada uno de los pollos cambiando la jeringa para cada uno de ellos.
- k) El frasco de "Eritrocitos de pollo", se conserva a 4°C y puede utilizarse durante dos semanas a partir de la fecha de sangrado.

III. Determinación del volumen del paquete celular requerido para el tratamiento del suero y para la prueba de inhibición de la hemaglutinación.

Se necesita 0.5 ml del paquete celular para preparar una suspensión al 0.25%, para titular aproximadamente 200 sueros y el antígeno requerido para dicha titulación.

Se requiere aproximadamente 10 ml del paquete celular para tener una suspensión de eritrocitos al 50%, para retirar inhibidores no específicos de 200 sueros.

Para las pruebas de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación y para el tratamiento del suero, los eritrocitos se lavaron de la siguiente manera:

- a) Filtrar los eritrocitos de pollo a través de 2 gazas estériles y recibir el filtrado en tubos cónicos graduados de 15 ml y centrifugar a 900 g durante 10 minutos.
- b) Resuspender el paquete de eritrocitos de pollo en una solución de Alsever. Si no se utilizan de momento los eritrocitos de pollo, conservar a 4°C.
- c) Para lavar los eritrocitos, centrifugar a 900 g por 10 minutos y retirar el sobrenadante con pipeta Pasteur.
- d) Adicionar aproximadamente 10 ml de amortiguador Dextrosa-Gelatina-Vernal y resuspender el paquete celular.
- e) Retirar el sobrenadante por succión con pipeta Pasteur y repetir los pasos anteriores, hasta que el sobrenadante salga totalmente transparente.
- f) Medir el paquete celular en cada tubo y retirar el sobrenadante.

Multiplicar el volumen del paquete de eritrocitos de pollo por 24. El número dado es el necesario de volumen de amortiguador DGV para tener una suspensión de eritrocitos al 4%.

IV. Estandarización de la suspensión de eritrocitos para las pruebas de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación.

- a) Calentar el espectrofotómetro unos 10 minutos antes de leer.
- b) Comprobar que el estándar y el reactivo de cianometahemoglobina no esté caduco, para realizar la curva estándar.
- c) Hacer la curva estándar de cianometahemoglobina de la siguiente manera:

30.

	TUBOS				
Conc. cianometahemoglobina (mg%)	1	2	3	4	5
Vol. del estándar de 80 mg% (ml)	80	60	40	20	0 (Bco.)
Vol. del reactivo de cianometahemoglobina (ml)	4	3	2	1	0
	0	1	2	3	4

La concentración de la suspensión de eritrocitos al 4% se determina de la siguiente manera:

- d) Resuspender perfectamente y tomar un ml de la suspensión de eritrocitos al 4% y vertir en un matraz aforado de 25 ml.
- e) Aforar con reactivo de cianometahemoglobina. Invertir el matraz y dejar reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente, las células se lisan aproximadamente de 20 a 45 minutos. Cumplido ese tiempo se centrifugan a 900 g por 15 minutos, para bajar los estromas.
- f) Los diferentes tubos de la curva estándar así como el problema se leen a 540 nm.
- g) Sumar todas las concentraciones de los estándares en mg%. Sumar las densidades ópticas de los estándares. Calcular el factor, dividiendo la suma de las concentraciones entre la suma de las absorbancias de la curva estándar.

$$\text{FACTOR} = \frac{\sum \text{Concentraciones estándares}}{\sum \text{Absorbancias de los estándares.}}$$

- h) Calcular mediante las siguientes fórmulas, el volumen necesario para tener una suspensión de eritrocitos de pollo al 0.25%.

$$\text{Factor de la densidad óptica para una suspensión de eritrocitos de pollo al 4\%} = \frac{2.746 \text{ mg\% cmg.}}{\text{FACTOR}}$$

2.746 mg%, cantidad de hemoglobina que se convierte en cianometahemoglobina, en un eritrocito de pollo.

$$\text{Volumen final para tener una suspensión de eritrocitos al 0.25\%} = \left[\frac{\text{Densidad óptica de suspensión problema} - (\text{Vol. al que fué llevado la suspensión al 4\%} - 1 \text{ ml.})}{\text{Factor de densidad óptica para una suspensión de eritrocitos al 4\%}} \right]$$

- i) El resultado dado es el volumen necesario de amortiguador HSAG para tener una suspensión de eritrocitos de pollo al 0.25%.

V. Eritrocitos de pollo para el tratamiento de los sueros.

- a) Centrifugar los eritrocitos de pollo en un tubo cónico graduado a 900 g por 10 minutos.
- b) Retirar el sobrenadante.
- c) Leer el volumen del paquete celular.
- d) Agregar un volumen igual de amortiguador HSAG para tener una suspensión de eritrocitos al 50%.

VI. Tratamiento del suero para remover inhibidores no específicos y aglutininas por tratamiento con Heparina- $MnCl_2$.

- a) Colocar 0.4 ml de amortiguador HSAG en tubos de 13 x 100 mm.
- b) Adicionar 0.2 ml de cada uno de los sueros controles o de los pacientes a los tubos que contienen amortiguador HSAG y mezclar.
- c) Adicionar 0.2 ml de solución de Heparina- $MnCl_2$, a cada uno de los tubos y mezclar.
- d) Incubar los tubos a 4°C; durante 15 minutos.
- e) Adicionar 0.2 ml de la suspensión de eritrocitos al 50%.
- f) Incubar a 4°C; durante 1 hora.
- g) Adicionar 0.8 ml de amortiguador HSAG y agitar, posteriormente centrifugar a 900 g por 15 minutos.
- h) Recolectar el sobrenadante con pipeta Pasteur estéril, teniendo precaución de no resuspender el paquete de células. El suero tiene una dilución de 1:8.
- i) Conservar a 4°C, por tiempo indefinido.

VII. Titulación del antígeno.

El antígeno de rubeóla se titula por hemaglutinación, el título se expresa en unidades hemaglutinantes y se determina por una titulación por triplicado y se calcula el promedio del punto final de las tres titulaciones.

El antígeno utilizado debe tener un título mínimo de 64 unidades hemaglutinantes.

Para tener el antígeno en 4 unidades hemaglutinantes se hace de la siguiente manera:

- El título del antígeno dado debe dividirse entre 4; la dilución que debe hacerse para que el antígeno tenga 4 unidades hemaglutinantes por 0.025 ml, es el recíproco de este valor.

Ejemplo:

Dilución estimada de la titulación por triplicado del antígeno es igual a 1:128. Dividir la dilución estimada entre 4.

$$\frac{128}{4} = 32$$

La dilución del antígeno se hará: 1 ml de antígeno en 31 ml de amortiguador HSAG frío, para tener el antígeno en 4 unidades hemaglutinantes.

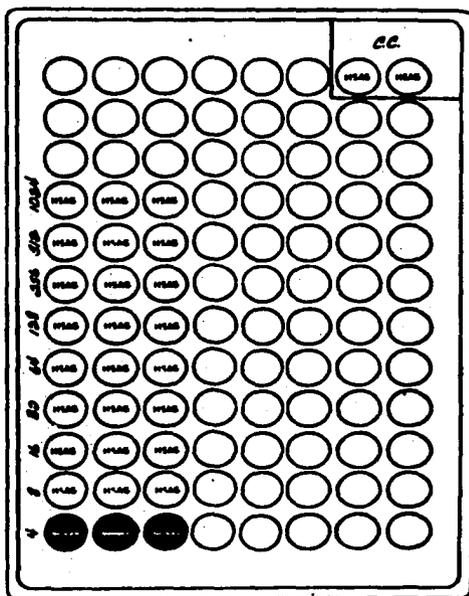
La titulación se hace por triplicado en cajas de microtitulación de 96 pozos de fondo tipo "V" como a continuación se describe.

- a) Usando una micropipeta de 0.025 ml, adicionar 0.025 ml de amortiguador HSAG frío, del segundo pozo hasta el noveno pozo, en el primer pozo se coloca 0.05 ml de antígeno, en 3 carriles diferentes. En los pozos posteriores colocar una gota de amortiguador HSAG y 0.05 ml de eritrocitos de pollo al 0.25%.
- b) Colocar los microdilutores en los primeros pozos conteniendo 0.05 ml de antígeno y agitar para tomar un volumen de 0.025 ml y pasarlos al

segundo pozo y así sucesivamente hasta el noveno pozo y descartar los últimos 0.025 ml. 33.

- c) Adicionar a cada serie de pozos 0.05 ml de la suspensión de eritrocitos de pollo al 0.25%.
- d) Mezclar por un minuto, en un vibrador mecánico.
- e) Incubar a 4°C, durante 60 a 90 minutos, para la formación del botón o de la aglutinación.

El punto final estimado de la hemaglutinación, debe utilizarse para hacer la dilución del antígeno y tenerlo a 4 unidades hemaglutinantes por 0.025 ml.



MODO DE INTERPRETACION.

Aglutinación Completa.		+
	Células aglutinadas cubren el fondo del pozo formando una malla.	
Aglutinación Parcial.		+
	Células formando un anillo difuso.	-
No Aglutinación.		-
	Células formando un botón compacto.	-

El título esta dado por la dilución que todavía presenta hemaglutinación.

El control de los eritrocitos debe estar compacto, si presenta hemaglutinación los eritrocitos se están aglutinando solos y ésto da falsos positivos.

Ejemplo de interpretación de la titulación del antígeno.



El título dado es de 8 unidades hemaglutinantes.

VIII. Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (IHA).

Los reactivos deben conservarse a 4°C, para el uso de la prueba de inhibición de la hemaglutinación .

Se usan placas de microtitulación de fondo en "V" de 96 pozos, las cuales se distribuyen de la siguiente manera:

- a) Los sueros de los pacientes y los sueros controles se les asigná un carril vertical.
- b) Escoger 2 pozos para el control de células.
- c) En una sola placa, hacer las diluciones del antígeno, para rectificar

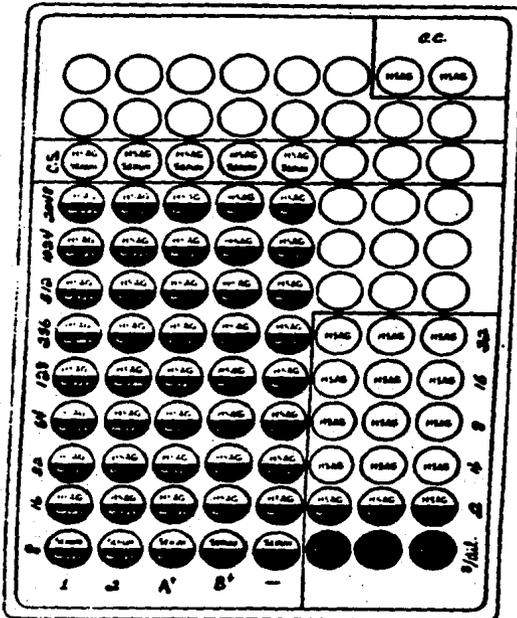
que el antígeno tenga 4 unidades hemaglutinantes por cada 0.025 ml; realizar esta prueba por triplicado.

Realización de la prueba de inhibición de la hemaglutinación.

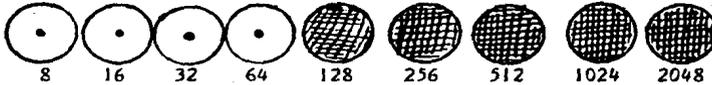
- a) Con una pipeta de 0.025 ml, colocar en cada carril del pozo 2 al 10, una gota de amortiguador HSAG frío.
- b) Colocar 0.05 ml de amortiguador HSAG frío a cada pozo para el control de células en cada placa.
- c) Usando una pipeta de 0.2 ml diferente para cada suero, adicionar 0.05 ml del suero tratado con una dilución de 1:8 a los primeros pozos de cada hilera etiquetada para cada suero y 0.025 ml para el control del suero.
- d) Colocar los dilutores de la microtitulación en el primer pozo de cada carril de cada suero y hacer diluciones seriadas dobles, completando los nueve pozos y desechando las gotas que quedan en los microdilutores.
- e) Adicionar una gota de 0.025 ml de antígeno de rubeóla con un título de 4 unidades hemaglutinantes a cada pozo en las series de las diluciones del suero (no poner en los controles del suero, ni en el control de los eritrocitos) y 0.025 ml a cada uno de los primeros pozos de cada una de las tres hileras de la titulación del antígeno.
- f) Mezclar la placa en un vibrador mecánico por un minuto.
- g) Incubar a 4°C, por una hora.
- h) Adicionar 0.05 ml de la suspensión de eritrocitos de pollo al 0.25% a las diluciones del suero, la titulación del antígeno, controles del suero y control de células.
- i) Mezclar la placa en un vibrador mecánico por un minuto.
- j) Incubar a 4°C, aproximadamente de 60 a 90 minutos.
- k) Si después de 90 minutos, el control de células presenta un botón compac-

to se puede leer la prueba. El control del antígeno que se tiene por triplicado debe ser cercanamente idéntico. Si presentan variaciones los controles de los sueros, se debe a un funcionamiento impropio de los dilutores o que las placas de microtitulación no estén limpias.

- 1) Estimar el punto final de la titulación por inhibición de la hemaglutinación, está dado por la máxima dilución que no presente aglutinación.



Ejemplo de interpretación de la prueba de inhibición de la hemaglutinación.



El título es 64 unidades inhibitorias de la hemaglutinación.

IX. Preparación del Gradiente de Sacarosa.

- a) Determinar el número de sueros que se van a utilizar para la prueba y que correspondan al número de tubos requeridos para el gradiente de sacarosa.
- b) Cada tubo para el gradiente de sacarosa requiere de 0.2 ml de solución de sacarosa al 50%, 1.6 ml de soluciones de sacarosa del 37% y 23% y 1.4 ml de solución de sacarosa al 10%.
- c) Con una pipeta de 1 ml, adicionar 0.2 ml de solución de sacarosa al 50% hasta el fondo del tubo.
- d) Usando una pipeta de 2 ml, adicionar resbalando por las paredes del tubo, 1.6 ml de solución de sacarosa al 37%, evitando que se revuelva con la solución de sacarosa al 50%.
- e) Adicionar con una pipeta de 2 ml, 1.6 ml de solución de sacarosa al 23%, del mismo modo que el anterior.
- f) Usando la misma técnica, adicionar 1.4 ml de solución de sacarosa al 10%.
- g) Los tubos preparados se colocan a 4°C, para permitir que se difundan por 4 a 6 horas.



1.4 ml, sacarosa al 10%.

1.6 ml, sacarosa al 23%.

1.6 ml, sacarosa al 37%.

0.2 ml, sacarosa al 50%.

X. Preparación del Suero para el Gradiente de Sacarosa.

- a) A cada tubo etiquetado, adicionar 0.3 ml del suero del paciente.
Se puede utilizar suero ya tratado con Heparina-MnCl₂.
- b) Adicionar 0.3 ml de Amortiguador ASF pH= 7.2, a cada uno de los tubos y mezclar.
- c) Conservar a 4°C, si no se va utilizar.

XI. Formación del Gradiente de Densidad de Sacarosa por Centrifugación.

- a) Determinar el número de sueros para ser fraccionados y que correspondan al número de tubos requeridos para el gradiente.
- b) Etiquetar los tubos del gradiente.
- c) Usando una pipeta de 1 ml, adicionar a cada tubo del gradiente 0.3 ml del suero del paciente tratado y sin tratar.
- d) Colocar los tubos en el rotor SW-39 ó SW-50-1, de la ultracentrifuga.
- e) Poner una membrana delgada de grasa de alto vacío en cada cubeta del rotor.
- f) Orientar cada tubo en el rotor.
- g) Colocar el rotor en el cuarto frío.
- h) Centrifugar por 16 a 18 horas a 135 897 g en el rotor SW-39 ó a 101 559 g en el rotor SW-50-1.
- i) Cuando la centrifugación se ha terminado retirar individualmente los tubos del gradiente.
- j) Preparar un número apropiado de tubos etiquetados para la colección del fraccionamiento.
- k) Utilizando una pequeña sonda hipodérmica insertarla a cada tubo del gradiente ó picar el tubo por la parte inferior.
- l) Colectar fracciones aproximadamente de 0.5 ml cada una, para cada

tubo del gradiente.

- m) Las fracciones colectadas se conservan a 4°C , por una semana para posteriormente ser tituladas.

XII. Tratamiento de los Sueros con 2-mercaptoetanol.

- a) Colocar 0.1 ml del suero, en un tubo de vidrio de 13 x 100 mm.
- b) Adicionar 0.1 ml de 0.2 M de 2-mercaptoetanol a cada uno de los tubos.
- c) Incubar a 37°C por una hora.
- d) Titular tomando en cuenta la dilución que se tiene.

XIII. Determinación de Porcentaje de Sacarosa por Refractometría.

- a) Verificar que no esten rayadas las placas de vidrio del refractometro.
- b) Calibrar el aparato colocando una gota de agua en las placas.
- c) Limpiar y colocar una gota de la fracción con menor concentración en las placas.
- d) Leer el índice de refracción.
- e) Limpiar después de leer cada una de las diferentes fracciones.
- f) Los valores obtenidos se refieren a las tablas de valores estándar de sacarosa, para obtener la concentración en porcentaje de sacarosa.

RESULTADOS

Origen de los sueros estudiados.

Durante la epidemia de dengue en 1984, en el estado de Yucatán, se obtuvieron sueros en fase aguda y fase convalescente de 331 pacientes con sintomatología clínica de dengue.

A estos sueros se les determinó por inhibición de la hemaglutinación el título de anticuerpos contra dengue, de los cuales 200 pacientes (60%), resultaron positivos y 131 (40%) fueron negativos. Se consideró concluyente de infección activa para dengue aquellos sueros que de fase aguda a fase convalescente presentaban un incremento en el título de anticuerpos en un factor de cuatro con respecto al suero obtenido en fase aguda, o si se obtuvo una sola muestra de suero, que tuviera un título mayor o igual a 1280 unidades inhibitoras de la hemaglutinación para dengue. De los sueros que fueron negativos se encontró evidencia de infección previa para dengue en el 40% de esta población y el 60% no tuvieron título de anticuerpos contra los Flavivirus.

Suero de referencia con título expresado en unidades internacionales por mililitro.

El suero se tituló por la técnica de inhibición de la hemaglutinación para tener una relación del título expresado en unidades inhibitoras de la hemaglutinación y en unidades internacionales por ml. El suero sin diluir (500 U.I./ml) dió un título de 1024 U.I.H.; diluido 1:2 dió un título de 512 U.I.H. y así sucesivamente como se muestra en la Tabla No. 1

Título U.I/ml	Título U.I.H
500	1024
250	512
125	256
62.5	128
31.2	64
15.6	32
7.8	16
3.9	8
< 3.9	Neg.

Tabla No. 1 Relación entre el título expresado en U.I/ml y el título expresado en U.I.H.

Titulación de Anticuerpos Antirrubeóla por Inhibición de la Hemaglutinación.

De los sueros que resultaron negativos para dengue, se pudieron rescatar 71 de ellos, a los cuales se les determinó la concentración de anticuerpos antirrubeóla por inhibición de la hemaglutinación y se expresó en unidades inhibitoras de la hemaglutinación y en unidades internacionales. Los resultados se muestran en la Tabla No. 1 .

Es importante mencionar que se considera inmunidad protectora para la infección de rubeóla a un título de anticuerpos igual o mayor que 15.6 unidades internacionales/ ml.

Como se observa once pacientes (15.4%) no presentaron anticuerpos antirrubeóla en ninguna de las dos muestras tomadas, en un paciente (1.4%), el título de anticuerpos antirrubeóla fue de 8 U.I.H.; cuatro pacientes, (5.6%), presentaron un título de anticuerpos antirrubeóla de 16 U.I.H., este grupo de pacientes en total un porcentaje de 22.4, tuvieron un título inferior al

Tabla No. 2 Títulos de Anticuerpos Antirrupeóla.

Número de Suero	Sexo	Edad	Título Fase Aguda*		Título Fase Convalescente**		Sueros***	
			U.I.H.	U.I.	U.I.H.	U.I.	Fase Aguda	Fase Convalescente
1.-	F	40	128	62.5	128	62.5	7	15
2.-	M	64	32	15.6	32	15.6	2	15
3.-	M	43	128	62.5	128	62.5	4	11
4.-	F	12	256	125	256	125	5	19
5.-	F	26	256	125	1024	500	2	35
6.-	F	20	2048	500	512	250	32	44
7.-	M	29	16	7.8	32	15.6	5	10
8.-	M	7	128	62.5	256	125	9	22
9.-	M	38	32	15.6	32	15.6	3	8
10.-	F	37	512	250	512	250	9	13
11.-	F	72	64	31.2	64	31.2	35	41
12.-	F	37	128	62.5	128	62.5	4	10
13.-	F	50	32	15.6	32	15.6	8	14
14.-	M	15	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	1	7
15.-	M	29	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	5	8
16.-	M	34	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	8	14
17.-	F	17	128	62.5	128	62.5	5	9
18.-	M	37	512	250	512	250	4	10
19.-	M	24	128-256	62.5-125	256	125	3	6
20.-	M	48	128	62.5	128	62.5	2	7
21.-	F	21	128-256	62.5-125	256	125	9	27
22.-	M	30	64	31.2	64	31.2	3	8
23.-	F	36	256-512	125-250	---	---	2	15
24.-	F	34	64	31.2	64	31.2	4	21
25.-	M	30	128	62.5	---	---	4	7
26.-	F	23	256	125	256	125	3	9
27.-	M	14	64	31.2	64	31.2	3	6
28.-	M	26	128	62.5	64-128	31.2-62.5	2	5
29.-	F	34	16	7.8	16-32	7.8-15.6	5	35
30.-	F	30	32	15.6	16	7.8	--	--
31.-	--	--	256	125	256	125	--	--
32.-	F	23	128	62.5	128-256	62.5-125	5	12
33.-	F	26	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	5	12
34.-	F	23	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	6	39
35.-	F	40	64	31.2	64-128	31.2-62.5	2	8
36.-	M	37	128	62.5	128	62.5	5	13
37.-	F	28	32	15.6	16	7.8	4	11
38.-	M	31	16	7.8	32	15.6	2	8
39.-	F	30	32	15.6	32	15.6	3	10
40.-	F	14	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	6	11
41.-	M	45	128	62.5	128	62.5	3	8
42.-	M	28	64	31.2	64	31.2	4	7
43.-	M	30	8	3.9	8	3.9	--	--
44.-	M	38	64	31.2	64-128	31.2-62.5	--	--
45.-	F	25	256	125	256	125	--	--
46.-	M	--	32	15.6	32-64	15.6-31.2	1	6
47.-	M	22	32-64	15.6-31.2	64	31.2	1	7
48.-	M	41	256	125	256	125	1	13

Continuación Tabla No. 2

Número de Suero.	Sexo	Edad	Título Fase Aguda*		Título Fase Convalescente**		Sueros***	
			U.I.H	U.I	U.I.H.	U.I.	Fase Aguda	Fase Convalescente.
49.-	M	32	64-128	31.2-62.5	64-128	31.2-62.5	2	8
50.-	M	24	256-512	125-250	256-512	125-250	4	12
51.-	M	35	128	62.5	128	62.5	2	9
52.-	F	28	1024	500	1024	500	3	9
53.-	M	27	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	6	10
54.-	F	10	2048	500	2048	500	6	10
55.-	F	24	128	62.5	64-128	31.2-62.5	4	10
56.-	M	45	128	62.5	128	62.5	2	6
57.-	F	11	128-256	62.5-125	256	125	5	13
58.-	M	12	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	3	12
59.-	M	24	128	62.5	64-128	31.2-62.5	2	10
60.-	M	26	256-512	125-250	256-512	125-250	5	9
61.-	M	33	256	125	256	125	4	18
62.-	M	6	2048	500	1024	500	7	14
63.-	F	47	64	31.2	64	31.2	7	9
64.-	F	19	128	62.5	128	62.5	4	10
65.-	M	--	128	62.5	128	62.5	8	16
66.-	M	28	256-512	125-250	512	250	5	14
67.-	F	19	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	3	9
68.-	F	25	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	18	23
69.-	M	15	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	3	8
70.-	M	27	64	31.2	64	31.2	--	--
71.-	F	13	64-128	31.2-62.5	64-128	31.2-62.5	9	15

* Título en unidades inhibitoras de la hemaglutinación (U.I.H)

** Título en unidades internacionales (U.I)

*** Los valores corresponden a los días postinfección cuando se tomaron las muestras.

nivel protector. Gráfica No. 7

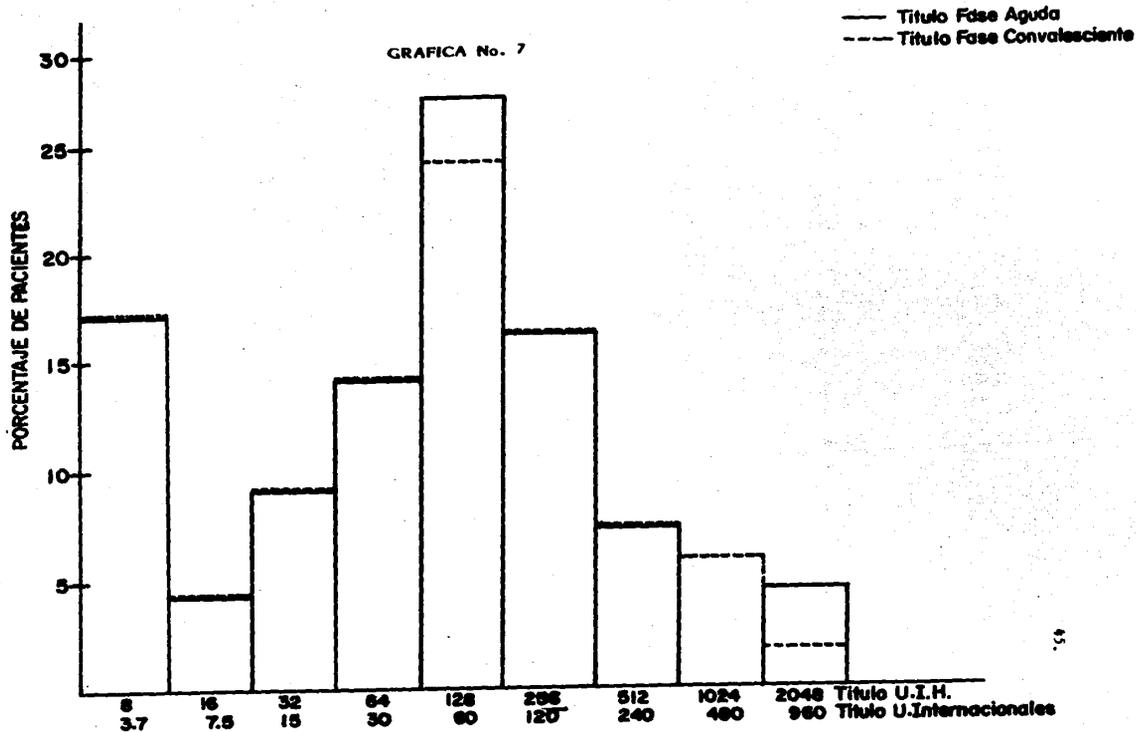
Seis pacientes (8.1%), tuvieron un título de anticuerpos antirubeóla de 32 U.I.H.; diez pacientes (14%), presentaron un título de anticuerpos antirubeóla de 64 U.I.H.; diez y nueve pacientes (26.56%), presentaron un título de anticuerpos antirubeóla de 128 U.I.H.; once pacientes (15.4%), presentaron un título de anticuerpos antirubeóla de 256 U.I.H.; cinco pacientes (7.0%), tuvieron un título de anticuerpos antirubeóla de 512 U.I.H.; tres pacientes (4.1%), presentaron un título de anticuerpos antirubeóla de 1024 U.I.H y dos pacientes un título de anticuerpos antirubeóla de 2048 U.I.H. (2.8%). Gráfica No. 7

De los sueros estudiados, 37 pacientes pertenecen al sexo masculino (52.1%), 32 pacientes al sexo femenino (45.09%) y dos pacientes (2.8%) no se tienen sus datos.

Determinación de IgM antirubeóla .

a) Por tratamiento con 2-mercaptoetanol de los sueros con alto título de anticuerpos antirubeóla.

Se seleccionaron para buscar la presencia de IgM en aquellos sueros que presentaron un título de anticuerpos antirubeóla igual o mayor a 512 U.I.H. en las muestras en fase aguda. Para esto se trataron con 2-mercaptoetanol y se titularon nuevamente por inhibición de la hemaglutinación. Los resulta-



dos obtenidos se muestran en la Tabla No. 3

No. del suero	Título en U.I.H antes del tratamiento con 2-mercaptoetanol.	Título en U.I.H. después del tratamiento con 2-mercaptoetanol.
5	1024	64
6	2048	128
10	512	32
18	512	512
50	512	512
52	1024	64
54	2048	128
60	512	512
62	2048	128
66	512	64

Tabla No. 3. Título de los sueros antes y después de la reducción con 2-mercaptoetanol en unidades inhibitoras de la hemaglutinación.

Como se observa en los sueros No. 18, 50 y 60, el título de anticuerpos se mantuvo constante después del tratamiento con 2-mercaptoetanol indicando que no había inmunoglobulina M.

En los sueros No. 5, 6, 10, 52, 54, 62 y 66, se encontró una disminución en el título después del tratamiento con 2-mercaptoetanol, el cambio presentado en el título fue en un factor de 3-4 veces menos, por lo que sugiere la presencia de IgM antirubeóla.

b) Separación de IgM e IgG por gradiente de sacarosa.

Para corroborar los resultados de los sueros al tratarlos con 2-mercaptoetanol, se realizó gradiente de sacarosa para separar las dos diferentes inmunoglobulinas de acuerdo a su coeficiente de sedimentación. Cada una de las fracciones se titularon por inhibición de la hemaglutinación. Después las

fracciones se trataron con 2-mercaptoetanol y se titularon nuevamente por inhibición de la hemaglutinación.

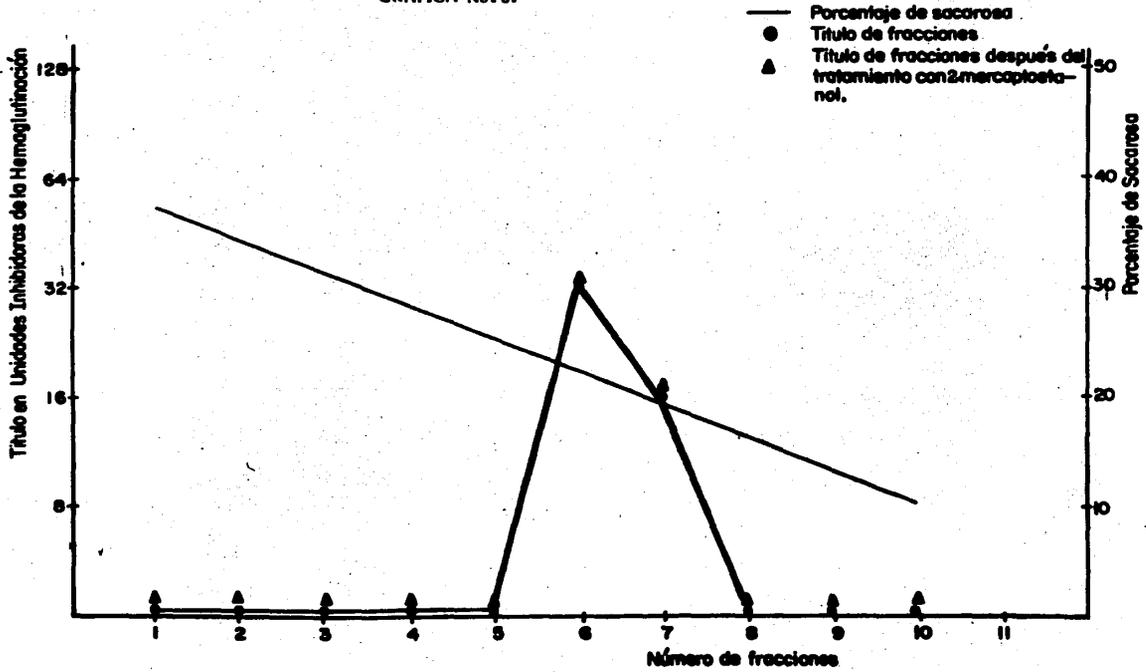
En primera instancia se realizó un gradiente de sacarosa para un suero control de IgG. Gráfica No. 8. Se escogió el suero No. 21 debido a que tenía un título alto y que no varió de fase aguda a fase convalesciente, teniendo un título de 256 unidades inhibitoras de la hemaglutinación. El suero en fase aguda se obtuvo al 9º día postinfección y en fase convalesciente 25 días después postinfección. En la gráfica se muestra el título de las diferentes fracciones obtenidas y se observa la presencia de un solo pico, el cual aparece de la fracción 5 a la 8 que corresponde a un porcentaje de sacarosa de 8 al 20 %. Las fracciones que presentaron título se trataron con 2-mercaptoetanol y se titularon, como puede observarse el título no varió, de esta manera se confirmó que la única inmunoglobulina inhibitora de la hemaglutinación que contenía el suero era la IgG, además que se encontraba en las fracciones del 8 al 20% de sacarosa.

En cuanto a los sueros No. 5, 6, 10, 52, 54, 62 y 66, Gráficas No.9, 10, 11, 14, 15, 17, 18; se encontraron que al titular por inhibición de la hemaglutinación las diferentes fracciones obtenidas, la presencia de dos picos, el primero que va de la fracción 1 a la 4 y que se presenta en un porcentaje de sacarosa de 26 - 40 % y el segundo pico de la fracción 5 a la 9, teniendolo en un rango de sacarosa del 8 al 20%. Al ser tratadas las fracciones con 2-mercaptoetanol y tituladas el primer pico ya no aparece y el segundo permanece igual, por lo que en estos sueros se confirma la presencia de inmunoglobulinas M y G.

Los sueros No. 18, 50 y 60, Gráficas No. 12, 13, 16, al titular las fracciones obtenidas se observa solo un pico que va de la fracción 5 a la 10,

GRAFICA No. 8.

SUERO CONTROL IgG



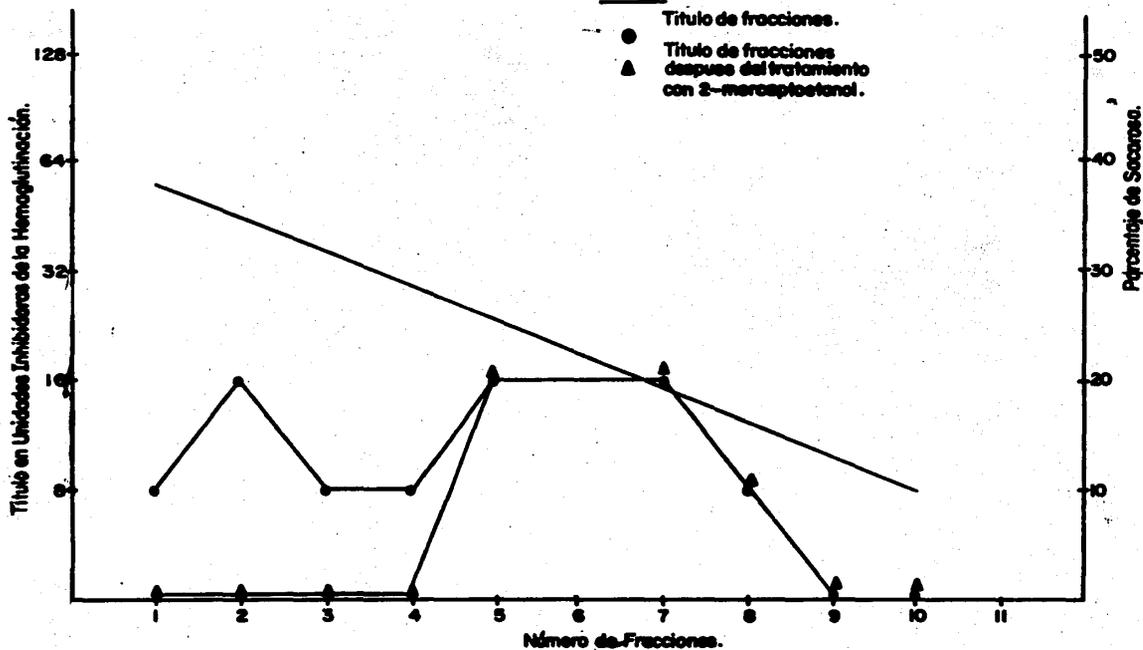
GRAFICA No. 9.

SUERO 5

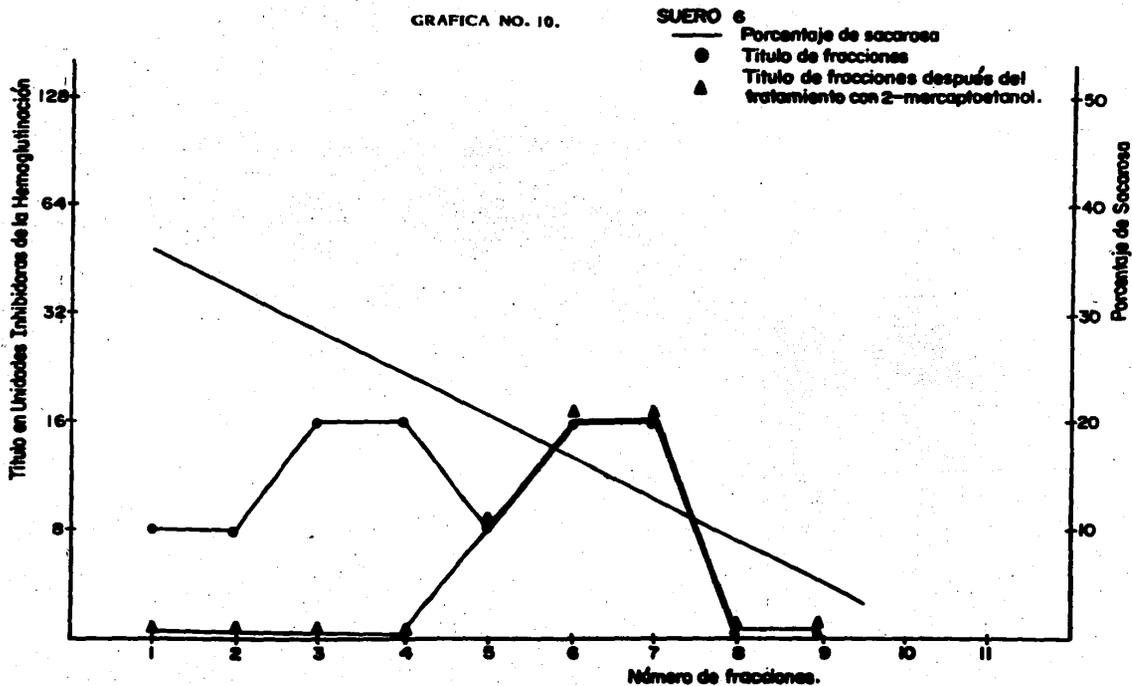
Porcentaje de sacarosa

Título de fracciones.

● Título de fracciones
▲ Título de fracciones
despues del tratamiento
con 2-mercaptoetanol.

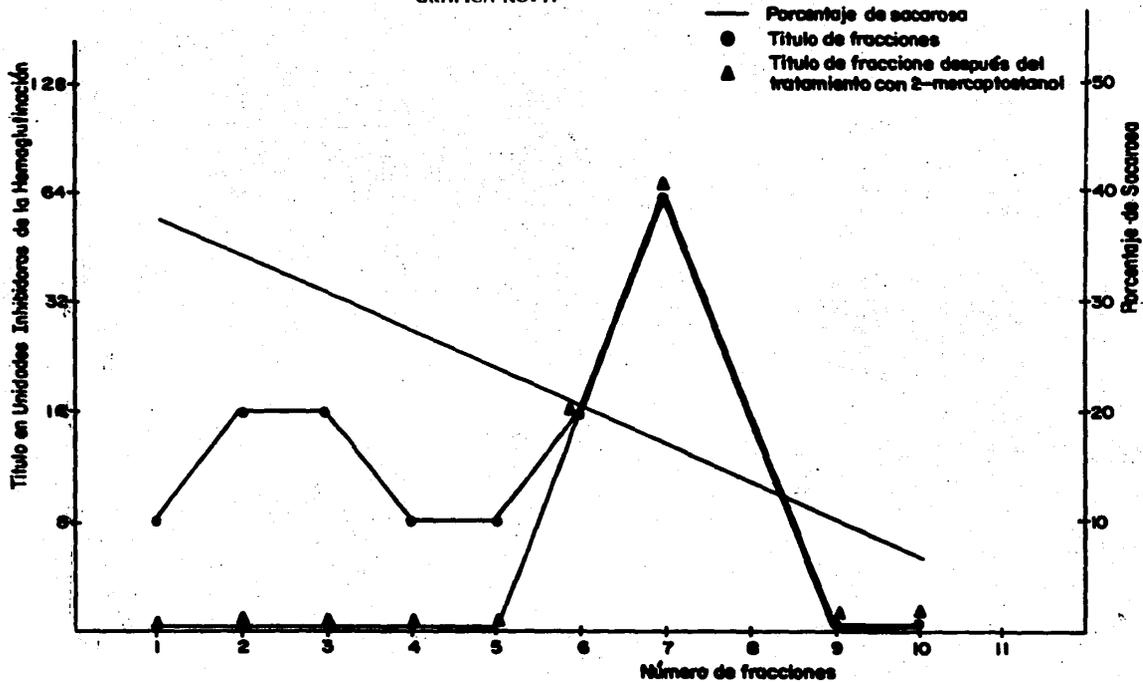


GRAFICA NO. 10.



GRAFICA NO. 11

SUERO 10



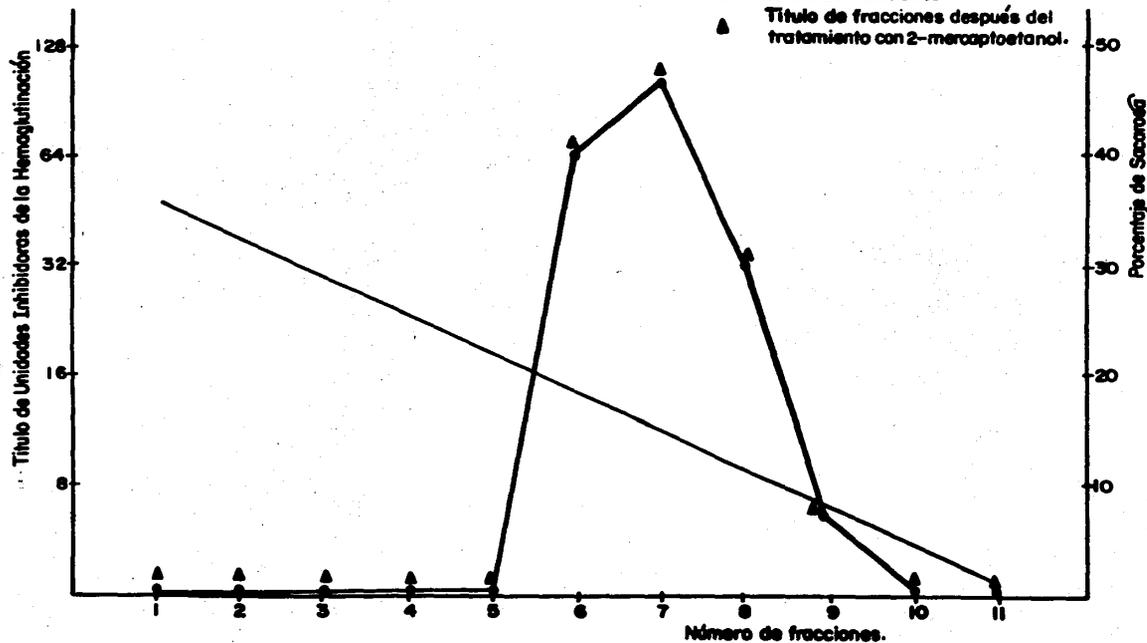
GRAFICA NO. 12.

SUERO 15

— Porcentaje de sacarosa.

● Título de fracciones.

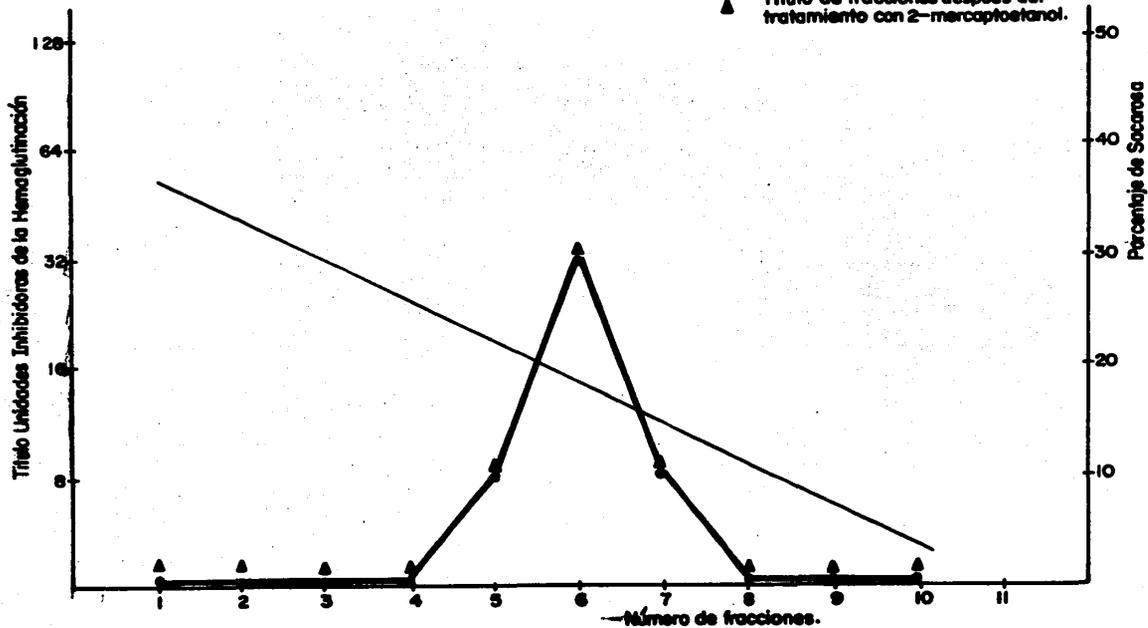
▲ Título de fracciones después del tratamiento con 2-mercaptoetanol.



GRAFICA NO. 13.

SUERO 50

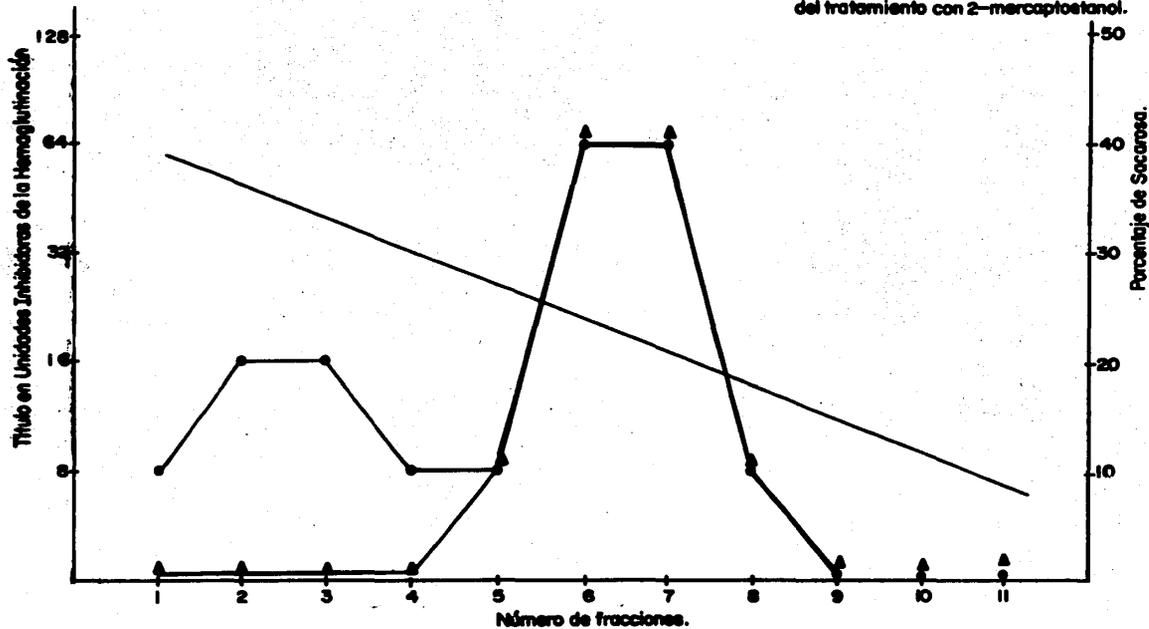
- Porcentaje de sacarosa.
- Título de fracciones.
- ▲ Título de fracciones después del tratamiento con 2-mercaptoetanol.



GRAFICA NO. 14

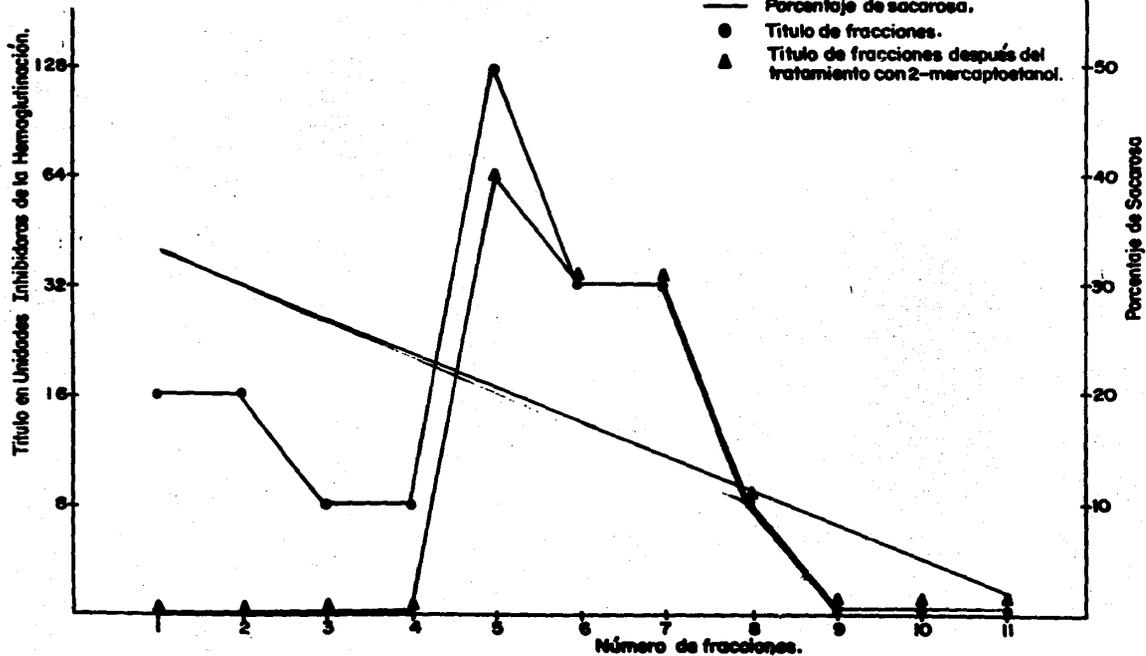
SUERO 52

- Porcentaje de sacarosa.
- Titulo de fracciones.
- ▲ Titulo de fracciones después del tratamiento con 2-mercaptoetanol.



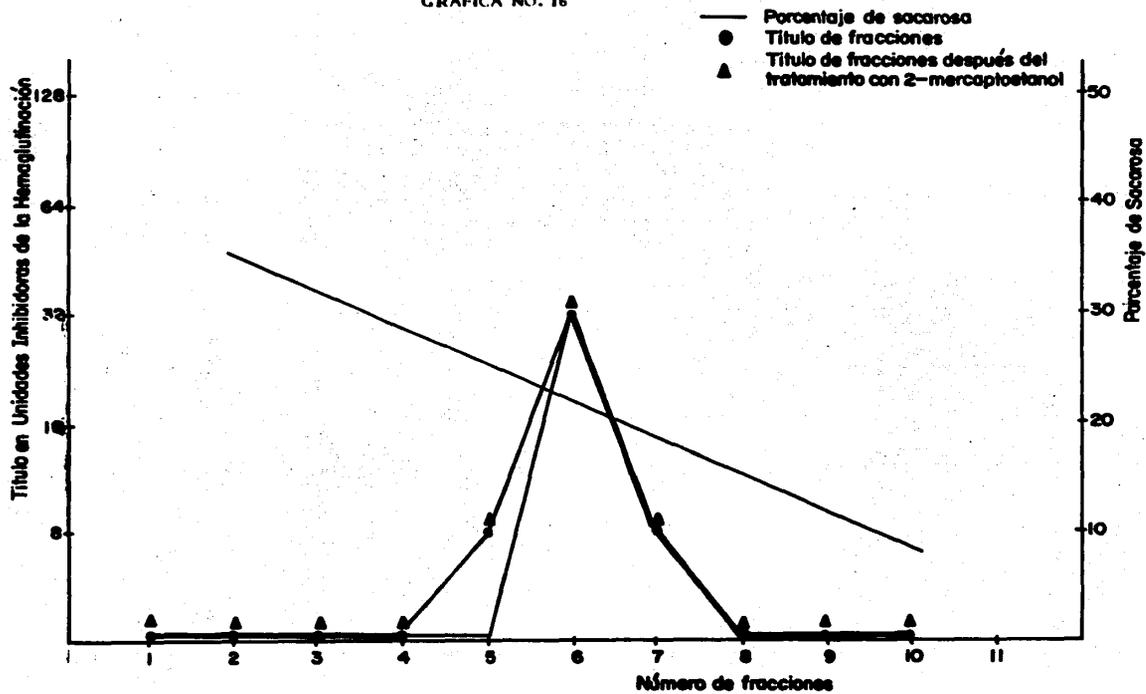
GRAFICA NO. 15

SUERO 5*



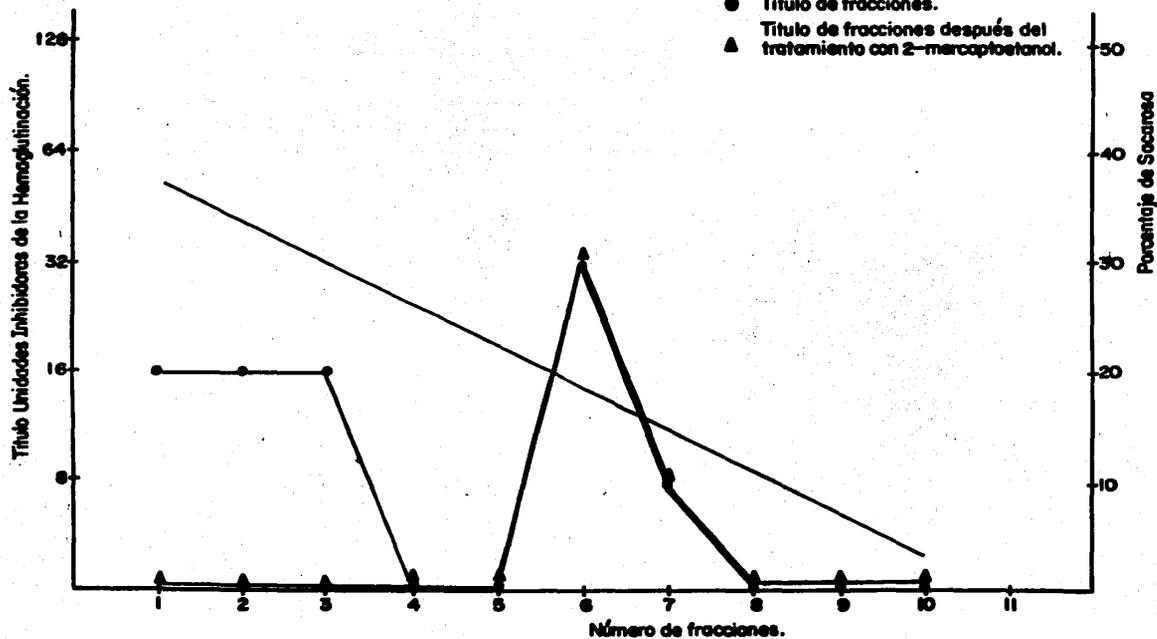
GRAFICA NO. 16

SUERO 60

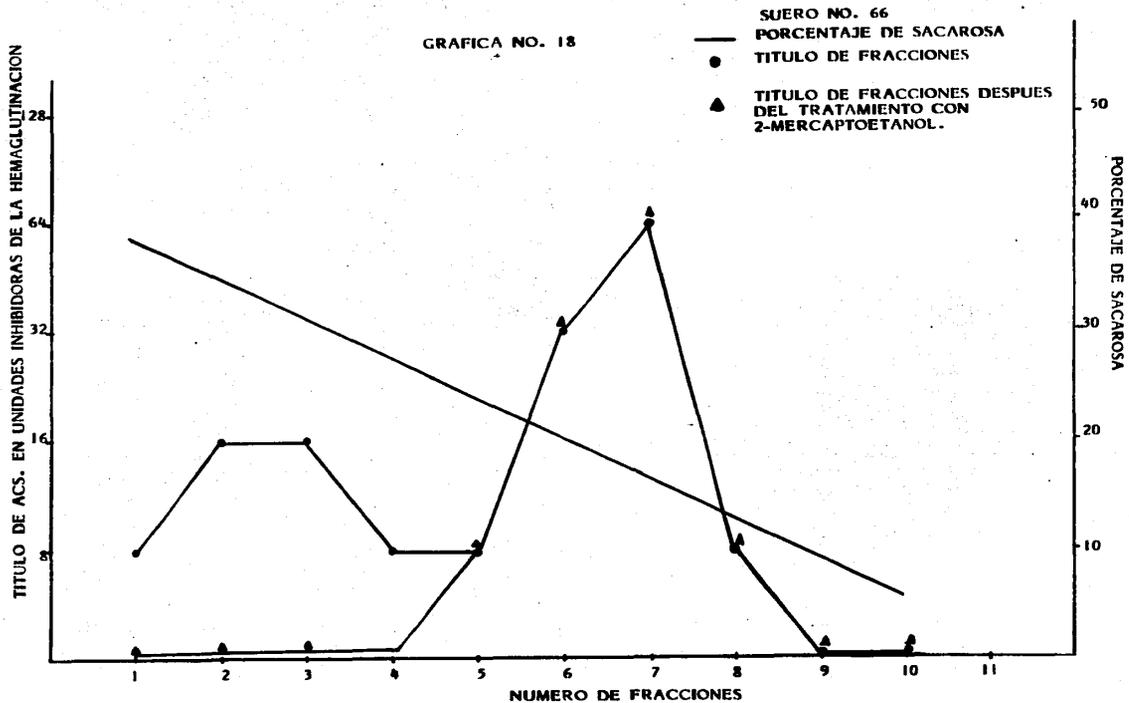


GRAFICA NO.17.

SUERO 62



GRAFICA NO. 18



en un rango de sacarosa del 8 al 20%. Estas fracciones al tratarse con 2-mercaptoetanol y titularse, vuelve aparecer el mismo pico. Esto nos indica que estos sueros tienen solo inmunoglobulina G.

El gradiente de sacarosa para todos los sueros fue lineal.

DISCUSION

La determinación de anticuerpos antirubeóla se realizó por la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación estandarizada del Centro del Control de Enfermedades de Atlanta, Georgia. La Inhibición de Hemaglutinación es la técnica base para realizar encuestas seroepidemiológicas y para establecer el diagnóstico de laboratorio de la infección de rubeóla, además de ser la técnica de referencia.

Se analizaron 331 sueros de pacientes, diagnosticados clínicamente como dengue, de estos 200 pacientes resultaron serológicamente como dengue positivos y los otros 131 pacientes resultaron dengue negativos. Ya que el dengue puede confundirse clínicamente con rubeóla, se procedió a analizar por inhibición de la hemaglutinación 71 sueros de pacientes dengue negativos.

De los 71 sueros estudiados un porcentaje del 22.44%, no presentaron título protector de anticuerpos antirubeóla, ya que tuvieron un título menor a 32 unidades inhibitoras de la hemaglutinación o menor a 15.6 unidades internacionales. Esto nos indica que el porcentaje de susceptibilidad de esta población es alto en comparación con estudios epidemiológicos realizados con anterioridad, en donde Michel Lozano y col., encuentran un porcentaje de inmunidad del 87% en mujeres adultas, la Dra. Ordoñez encuentra niveles de protección del 93.5% al 98.6% en mujeres adultas, Martín Sosa y col., encuentra en estudiantes universitarias el 91.9% de protección y Mejía Laguna y Martín Sosa encuentran que el 83.3% tienen títulos protectores de anticuerpos antirubeóla en una población universitaria (29) (30)(33).

Los resultados encontrados en esta población indican que el porcentaje de susceptibilidad es mayor; esto es grave si se considera que la incidencia de rubeóla tiene un ciclo epidémico de alrededor de 8 años y que podría presentarse una epidemia en la Cd. de Mérida, Yucatán, ya que hay mujeres en edad reproductiva susceptibles a la infección de rubeóla.

Por otra parte el mayor porcentaje de pacientes presentaron un título de anticuerpos de 128 unidades inhibitoras de la hemaglutinación que fue alrededor del 26%, seguidos por aquellos que tuvieron un título de anticuerpos de 256 unidades inhibitoras de la hemaglutinación (15.4%) y el 14% de los pacientes tuvieron un título de anticuerpos de 64 unidades inhibitoras de la hemaglutinación.

La mayor variación presentada fue en aquellos pacientes que tuvieron un título de anticuerpos mayor o igual a 512 unidades inhibitoras de la hemaglutinación entre los títulos de fase aguda a fase convalescente, esto nos indica que hubo un aumento en el título de anticuerpos antirubeóla, que probablemente tenía una infección reciente.

No en todo el grupo de estos sueros se presentó un incremento de fase aguda a fase convalescente, ya que no estuvieron bien tomadas las muestras en el período que indica el C.D.C. para observar el incremento en el título. El suero en fase aguda se debe tomar al 3er. día después de aparecer los primeros síntomas y el suero en fase convalescente de 1 a 2 semanas después de la primera muestra (12).

Excepto en dos sueros no se presentaron cambios significativos entre los títulos de fase aguda a fase convalescente y las diferencias presentadas están en el margen de error de la técnica de \pm una dilución. Este margen de error es el

aceptado por el C.D.C de Atlanta, Georgia (12).

Aquellos sueros que tenían un título mayor o igual a 512 unidades inhibitoras de la hemaglutinación se les realizó reducción con 2-mercaptoetanol y se observó que en tres sueros no presentaban variación en el título después del tratamiento, lo que indica que no tenían inmunoglobulina M, ya que el título no cambió; pero en siete sueros presentaron variación en su título después del tratamiento con 2-mercaptoetanol, esta variación fue en un factor de 3 a 4 veces por lo que estos sueros tenían presencia de IgM e IgG.

Para corroborar estos resultados se practico gradiente de sacarosa a estos sueros, las fracciones fueron tituladas y después reducidas con 2-mercaptoetanol, comprobándose que los sueros No. 18, 50 y 60 sólo presentaban inmunoglobulina G antirubeóla, por lo que se trataba de una reinfección por rubeóla, y que los sueros No. 5, 6, 10, 52, 62 y 66, tenían inmunoglobulina M y G antirubeóla, por lo que se trataba de una primoinfección.

El utilizar dos métodos para la determinación de IgM, nos evita falsos positivos y nos sirve para determinar si se trata de una primoinfección o reinfección; estos métodos también se pueden utilizar en caso de mujeres embarazadas que sospechen de la infección por rubeóla.

Como se observa el 14% de la población estudiada, fueron rubeóla positivos, lo que indica que pueden resultar frecuentes las equivocaciones si únicamente se toma en cuenta el diagnóstico clínico.

Como se ve con estos resultados es necesario hacer el diagnóstico de laboratorio de las infecciones virales que pueden presentar confusión en el diagnóstico clínico; ésto puede realizarse con métodos simples y confiables como es la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación.

CONCLUSIONES

El diagnóstico de infecciones virales, basado únicamente en observaciones clínicas no es confiable, ya que requiere de su comprobación por pruebas de laboratorio. Esto sobre todo en aquellas infecciones que pueden presentar una sintomatología muy parecida.

En nuestro caso se analizaron sueros de pacientes con sintomatología clínica de dengue y negativos por serología, para detectar si presentaban infección por rubeóla.

Se encontró que 10 pacientes presentaban altos títulos de anticuerpos antirubeóla, de estos 7 pacientes padecían la infección por primera vez comprobándose la presencia de IgM antirubeóla por reducción con 2-mercaptoetanol y fraccionamiento en gradiente de sacarosa; y 3 pacientes presentaban una reinfección.

El diagnóstico clínico de dengue y rubeóla no es confiable, por lo que deben de implementarse de manera rutinaria métodos para el diagnóstico viral por pruebas de laboratorio, ya que la identificación del agente etiológico responsable de la infección facilitaría el diagnóstico de las infecciones en fase temprana, posibilitando la prescripción del tratamiento adecuado que debe brindarse al paciente; de igual forma estos datos pueden servir para tomar las medidas necesarias que deben implementarse para la protección del personal hospitalario y a la comunidad, ya que se contará con datos más confiables para evitar posibles epidemias.

APENDICE

1.- Amortiguador Dextrosa-Gelatina-Veronal (DGV).

Se preparan dos soluciones "A" y "B".

Reactivos

Solución "A".

Acido barbitúrico	0.58 g
Gelatina	0.68 g
H ₂ O destilada	250.0 ml

Calentar poco a poco hasta ebullición para obtener la solución.

Solución "B".

Barbital sódico	0.38 g
Cloruro de calcio (CaCl ₂ · 2H ₂ O)	0.026g
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0.12 g
Cloruro de sodio (NaCl)	8.5 g
Dextrosa (C ₆ H ₆ O ₆)	10.0 g

Combinar las soluciones "A" y "B" en un matraz de vidrio graduado de

1000 ml y aforar con agua destilada. Ajustar el pH de la solución a

7.3. La solución se esteriliza por filtración a través de membrana

Millipore con un poro de 0.22 micras. Conservar a 4°C.

2.- Amortiguador Hepes Salino-Albúmina-Gelatina (HSAG).

Preparación de la solución stock de Hepes Salino 5X.

Reactivos

Hepes salino	29.8 g
Cloruro de sodio (NaCl)	40.95 g
Cloruro de calcio (CaCl ₂ · 2H ₂ O)	0.74 g

Aforar a 1000 ml con agua destilada. Ajustar el pH a 6.5. Esterilizar

por filtración a través de membrana Millipore con un poro de 0.22 micras.

Conservar a 4°C.

Preparación de la solución stock de albúmina sérica bovina 2X.

Reactivos

Albúmina sérica bovina en polvo. 20.0 g

Aforar a 1000 ml con agua destilada. Esterilizar por filtración a través de membrana Millipore con un poro de 0.22 micras. Conservar a 4°C.

Preparación de solución stock de gelatina 10X.

Reactivos

Gelatina 25.0 mg

Aforar a 1000 ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 120°C por 15 minutos. Conservar a 4°C.

Preparación del amortiguador HSAG, (preparar asépticamente).

Reactivos

Solución stock de hepes salino 5X. 200.0 ml

Solución stock de albúmina sérica bovina 2X. 500.0 ml

Solución stock de gelatina 10X. 100.0 ml

Aforar a 1000 ml con agua destilada. Mezclar y ajustar el pH a 6.2.

Conservar a 4°C.

3.- Preparación de solución de Alsever.

Reactivos

Dextrosa (C₆H₁₂O₆) 20.5 g

Citrato de sodio (Na₃C₆H₅O₇ · 2H₂O) 8.0 g

Cloruro de sodio (NaCl) 4.2 g

Acido cítrico (C₆H₈O₇) 0.55 g

Aforar a 1000 ml con agua destilada. Esterilizar por filtración a través

de membrana Millipore de 0.22 micras. Conservar a 4°C.

4.- Preparación de amortiguador Salino de Fosfatos (ASF).

Solución "A".

Reactivos

Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) 54.8 g
 Fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 15.75 g

Aforar a 2000 ml con agua destilada.

Solución "B".

Reactivos

Cloruro de sodio (NaCl) 8.5 g

Aforar a 100 ml con agua destilada.

Mezclar 40 ml de solución "A" y 100 ml de solución "B" y aforar a 1000 ml con agua destilada. Ajustar el pH a 7.2. Esterilizar en autoclave a 120°C, durante 15 minutos.

5.- Preparación de solución de Sacarosa al 50% en amortiguador ASF pH= 7.2.

Reactivos

Sacarosa 100.0 g

Adicionar 200 ml de amortiguador ASF a pH= 7.2, disolver en baño maria a 37°C. Esterilizar pasando a través de membrana Millipore de 0.22 micras. Conservar a 4°C.

6.- Preparación de soluciones de sacarosa al 37%, 23% y 10% en amortiguador ASF A pH= 7.2.

Preparación de solución de sacarosa al 37% en amortiguador ASF a pH=7.2.

- Tomar asepticamente 26 ml de amortiguador ASF a pH= 7.2, en un matraz Erlenmeyer de 250 ml estéril.

- Adicionar asépticamente 75 ml de solución de sacarosa al 50%. Mezclar.
- Conservar a 4°C.

Preparación de solución de sacarosa al 23% en amortiguador ASF pH=7.2.

- Tomar asépticamente 54 ml de amortiguador ASF y colocarlos en un matraz Erlenmeyer de 250 ml estéril.
- Adicionar asépticamente 46 ml de solución de sacarosa al 50%, mezclar.
- Conservar a 4°C.

Preparación de solución de sacarosa al 10% en amortiguador ASF pH=7.2.

- Tomar asépticamente 80 ml de amortiguador ASF y colocarlos en un matraz Erlenmeyer de 250 ml estéril.
- Adicionar asépticamente 20 ml de solución de sacarosa al 50% estéril, mezclar.
- Conservar a 4°C.

7.- Preparación de solución de Heparina-MnCl₂.

-Heparina de sodio USP 5000 U/ml.

Si la solución de heparina esta más concentrada, diluir a 5000 U/ml con agua destilada. Esterilizar por filtración a través de membrana Millipore de 0.22 micras.

- Cloruro de Manganeso (MnCl₂) 1M.

Pesar 39.6 g de MnCl₂ · 4H₂O y aforar a 200 ml con agua destilada.

Esterilizar por filtración a través de membrana Millipore de 0.22 micras.

Guardar en la obscuridad y conservar a 4°C.

Combinar en partes iguales de Heparina 5000 U/ml y MnCl₂ 1M. Preparar al momento de utilizarse.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Almeida, J.D. Rapid Viral Diagnosis by Electron Microscopy. *Scand J. Infect. Dis. Suppl.* 1982, 36:117-120.
- 2.- Anderson, N.G. High-Resolution Protein Separation and Identification Methods Applicable to Virology. En: Bachmann, P.A. *New Developments in Diagnostic Virology.* Spinger-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1983, p: 197-217.
- 3.- Anuario estadístico 1984. Dirección General de Inf. y Evaluación. Secretaría de Salud, México. 1985.
- 4.- Banatvala, J.E., Best, J.M., Keneedy, E.A., Smith, E.E., Spence, M.E. A Serology Method for Demonstrating Recent Infection by Rubella Virus. *Brit. Med. J.* 1967. 3:285-286.
- 5.- Baumgarten, A. Viral Immunodiagnosis. *Yale J. Biol. Med* 1980. 53: 71-83.
- 6.- Boletín de Epidemiología. La Problemática del Dengue. Koopman, S.S. Feb. 1986. 12: 1-5.
- 7.- Boletín de Epidemiología de la S.S. Vol. 4, No. 14-15. 1984.
- 8.- Best, J.M., Banatvala, J.E., Watson, D. Serum IgM and IgG responses in postnatally acquired rubella. *Lancet.* 1968. p:65-68.
- 9.- Buchaman, R.A., Galasso, G.J., Meringan, T.C., *Antiviral Therapy Today.* Raven Press. 1979. p:681-703.
- 10.- Carrada Bravo, T., Vázquez, V.L., López, G.T. Ecología del Dengue y el *Aedes aegypti*. Invest. preliminar 3era. Parte. *Salud Pública.* 1984. p: 26-27.
- 11.- Center for Disease Control. Follow up on Dengue México. *Morbidity and Mortality Weekly.* 1980. 29: 169-170.
- 12.- Center for Disease Control. Rubella Hemagglutination Inhibition Test. *Immunology No. 2.* 1980. Atlanta, Georgia.
- 13.- Center for Disease Control. Rubella Prevention Recommendation of the Immunization Practice Advisory Committee. *Annals of Internal Medicine.* 1984. 101: 505-513.
- 14.- Davidsohn, I., Henry, J.B. Diagnóstico clínico por el Laboratorio. Ed. Salvat. 1976. p: 151-156.
- 15.- Dengue México. *Morbidity and Mortality. Weekly Report.* 1984. 33(15) : 209-210.

- 16.- Dubis-Dalcq, M., Holmes, K.V., Renter, B. Assembly of Envelope RNA Virus. Spinger-Verlag Wien. 1984. p: 136-148.
- 17.- Fener, F., White, D.O. Virología Médica. 2da. Edición. La Prensa Médica, México. 1979. p:411-420.
- 18.- Galasso, G.J., Merigan, R.C., Buchanan, R.A. Antiviral Agentes and Viral Diseases of Man. Raven Press. 1980. p:681-703.
- 19.- Garden, P.S. Rapid Virus Diagnosis. J. Gen. Virol. 1977. 36:1-29.
- 20.- Gunasegaran, K., Lim, T.W., Ahmed, A., Aaskov, A., Lam, S.K. and Pany, T. Hemadsorption Immunoabsorbent Technique for Detection Dengue Immunoglobulin M Antibody. J. Clinical Microbiology. 1986. p: 170-174.
- 21.- Herrman, K.L. Rubella Virus. Lennette, E.H., Schmidt, N.J., Balows, A., and Hauster, W. Ed. Manual of Clinical Microbiology. 4th. Ed. American Society for Microbiology. 1985. p:779-784.
- 22.- Herrman, K.L. Rubella Virus. Lennette, E.H., and Schmidt. Ed. Diagnostic Procedures for Viral Rickettsial and Chlamydial Infection. 5th. Ed. American Public Health Association. 1979. p:725-726.
- 23.- Horstmann, K.L. Rubella. En. Evans, A.S. Viral Infections of Humans. Epidemiology and Control. 2nd. Ed. Plenum Medical Book. 1982. p: 519-539.
- 24.- Horstmann, Oker-Blon, C., Kalkinen, M., Kaarimiam, L. Peterson, R. F. Rubella Virus contains one capsid protein and three envelope glycoprotein, E₁, E_{2a} y E_{2b}. J. Virol. 1983. 46-3: 964-973.
- 25.- Inioye, S., Matsumo, S., Kono, R., Sangkawibha, N., y Thonggcharoen, P. Hemagglutination-Inhibitory Immunoglobulin A Antibody in the Serum of Patients with Dengue Hemorrhagic Fever. Med. Scien. Biol. 1980. 33: 181-184.
- 26.- Kobayashi, N., Suzuki, M., Nakagawa, R., Matumoto, M. Separation of Hemagglutination-Inhibiting Immunoglobulin M Antibody to Rubella Virus in Human Serum by High-performance Liquid Chromatography. J. B. Microbiology. 1986. p: 1143-1145.
- 27.- Kumate, Jesús., Gutiérrez, Gonzalo. Rubéola. Dengue. Manual de Infectología. 10a. Ed. 1984. p: 247-254 y 475-484.
- 28.- Landry, M.L., Mayo, D.R., and Hsiung, G.D. The Need for an Rapid and Accurate Viral Diagnosis. Pharme Ther. 1983. 18: 107-132.
- 29.- Martín Sosa S., Magaña, M.C. Encuesta de Anticuerpos contra la Rubéola en Estudiantes Universitarias. bol. Med. Hosp. Inf. 1974. 31: 1165-1170.

- 30.- Mejía Laguna, J.E., Martín Sosa, S., Pliego, C.A., Magaña, M.C., Nava, V., Aviles, S.S. Investigación de Anticuerpos Antivirus del Sarampión y antivirius de la Rubeóla en Pacientes de la Población Universitaria. Memorias IV. Jornadas Internas de Trabajo y 1er. Congreso Nacional de Salud Escolar y Universitaria. Dirección General de Servicios Médicos de la UNAM. Dic. 1979.
- 31.- Meurman, O. Demonstration of Specific IgM-Class Antibodies in Diagnosis of Viral Diseases. Medical Lab. 1980. 8: 1-15.
- 32.- Michel, L.P. Encuesta Serologica para detectar Anticuerpos contra Rubeóla en Cd. de Guadalajara. Rev. Invest. Salud Pública. 1970. 30: 51-62.
- 33.- Ordoñez, B.R. Frecuencia de la Rubeóla en México. Investigación Epidemiológica. Gac. Méd. México. 1969. 99: 1163-1175.
- 34.- Oresteín, W.A. Methods of Assessing the Impact of Congenital Rubella Infection. Rev. Infect. Dis. 1985. 7(Suppl. 1) : 322-328.
- 35.- Osborn, J.E. Precise Viral Diagnosis: Why Bother. En . Lennette, D.A. Spectar, S., and Thompson, K.D. Diagnosis of Viral Infections: The Role of Clinical Laboratory University Park Press. Baltimore. 1984. p: 1-11.
- 36.- Panorámica Nacional del Dengue.
- 37.- Portfield, J.S. Immunological Enhancement and the Pathogenesis of Dengue. J. Hyg. Camb. 1982. 89: 355-364.
- 38.- Russel, P.K., Branat, E.E., and Dalrymple, J.M. Chemical and Antigenic Structure of Flavivirus. J.V. 1986. p: 31-46.
- 39.- Schmidt, N.J. Laboratory Diagnosis in Viral Infections. En. Galasso, G. J., Merigan, T.C. and Buchanan, R.A. Antiviral Agents and Viral Diseases of Man. Raven Press, New York. p:209-252.
- 40.- Sever, J.L., and Cleghorn, C. Rubella Diagnostic Test. What is a Significant Result? Postgraduate Medicine. 1982. 71: 71-77
- 41.- Stango, S. General Aspects of Immunoserology. En. Lennette, D.A., Spectar, S., and Thompson, K.D. Diagnosis of Viral Infections: The Role of Clinical Laboratory. University Park Press. Baltimore. 1979. p: 49-61.
- 42.- Stewart, G.L., Parkaman, P.D., Hoops, H.E., Douglas, J., Hamilton, P., and Meyer, H.M. Rubella Virus Hemagglutination-Inhibition Test. N. Eng. J. Med. 1967. 276: 554-557.
- 43.- Trudel, M., Nadan, F., Comtois, R., Payment, P., Bonneum, A.M., and Lecomte, J. Identification of Rubella Virus Structural Proteins by Immunoprecipitation. J. Virol. Methods. 1982. 5: 191-197.

- 44.- U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service Center for Disease Control Bureau of Tropical Diseases. Vector Biology and Control. Atlanta, Georgia. Vector Topics No. 2. Control del Dengue 1980.
- 45.- Vesikari, T., Vahari, A. Rubella a Method for Rapid Diagnosis of a Recent Infection by Demonstration of IgM Antibodies. Brit. Med. J. 1968. p: 221-223.
- 46.- World Health Organization. Rapid Laboratory Techniques for the Diagnosis of Viral Infections. Report of a WHO Scientific Group. 1981. p: 60.
- 47.- Zigelmaier, R., Behreus, F., Enders, G. ELISA Demonstration of IgG and IgM Antibodies in Infections with Cytomegalo (CMC) and Rubella Virus Medical Laboratory. 1980. 8:17-25.