

24
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"

**" ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS METODOS:
INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION Y HEMA-
GLUTINACION REVERSA PASIVA EN EL
DIAGNOSTICO DE LA RUBEOLA "**

TESIS CON
FALSA IE ORIGEN

T E S I S

Que, para obtener el Título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Presenta:

NOEMI MARCOS ZEPEDA

Director de Tesis:
JESUS CASASOLA FLORES



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.

CONTENIDO

1. INTRODUCCION
2. GENERALIDADES
 - 2.1 Antecedentes Históricos
 - 2.2 La rubéola
 - 2.3 La rubéola congénita
 - 2.4 Características del virus de la rubéola
 - 2.5 Diagnóstico de la rubéola
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
4. OBJETIVOS
5. HIPOTESIS
6. MATERIAL Y METODOS.
7. RESULTADOS
8. DISCUSION
9. CONCLUSIONES
10. ANEXOS
 - 10.1 A. Abreviaturas
 - 10.2 B. Preparación de soluciones
 - 10.3 C. Formulas de estadística
11. BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUCCION

El estudio de la Virología molecular durante los últimos 50 años ha permitido que las enfermedades de etiología viral sean manejadas en forma más directa permitiendo que se estructuren nuevos programas de investigación en el campo de la virología para mantener la vanguardia en la ciencia.

A los virus se les atribuyen gran número de enfermedades que atacan a plantas, animales, bacterias y al hombre. Su importancia en Medicina se debe a la frecuencia con que se presentan algunas infecciones virales, muchas de las cuales se dan en forma epidémica. Durante el último siglo las epidemias de etiología viral fueron serias amenazas para los humanos: En 1918, el virus de la Influenza, los Poliovirus en los años 50's, Rubéola y Herpes en los 60's y ahora en los 80's el virus de la inmunodeficiencia humana (1). Además el hombre padece las enfermedades virales con mayor frecuencia que las de cualquier otra etiología; desde antes del nacimiento el producto puede padecer enfermedades virales, ya que durante su desarrollo intrauterino se encuentra expuesto a contraer infecciones que sufra la madre durante el embarazo, las cuales son transmitidas a través de la placenta, como consecuencia de ello el recién nacido puede estar enfermo o convalesciente de enfermedades que haya adquirido durante la gestación (2).

Varias infecciones maternas no bacterianas producen infección transplacentaria las cuales provocan malformaciones congénitas reconocidas como Síndrome de TORCH. El término TORCH es un acrónimo formado por las primeras letras de los agentes que suelen ser la causa de las manifestaciones clínicas definidas en los virus comprometidos en este Síndrome (3). Ver cuadro No.1.

T= *Toxoplasma gondii* (parásito)

O= Virus entéricos

R= Rubéola

C= Citomegalovirus

H= Herpes virus

Aunque los signos generalizados de infección intrauterina por cualesquiera de los agentes del TORCH pueden ser parecidos entre sí, hay ciertas características típicas de la infección causada por cada agente. Dichas características se enumeran en el cuadro No.2 .

La rubéola fue la primera infección reconocida como causa de malformaciones congénitas. Actualmente en muchos países como en el nuestro, la falta de información estadística, que haga posible establecer la magnitud del problema de las malformaciones congénitas atribuibles al virus de la rubéola o a otros agentes, no permite llegar a una conclusión sólida sobre la trascendencia epidemiológica de estos padecimientos infecciosos (4) . En este trabajo se enfoca la necesidad de encontrar la manera más rápida y veraz de dar un diagnóstico confiable para la rubéola

Cuadro No. 1 Malformaciones congénitas por los agentes del TORCH

	Microftalmia
Oculares	Cataratas
	Coriorretinitis
	Glaucoma
Cardiovasculares	Cardiopatías
	Miocarditis
	Sordera neurosensorial
	Retraso mental
Del S.N.C.	Microcefalia
	Hidrocefalia
	Hipotonía muscular
	Calcificaciones cerebrales
Viscerales	Hepatosplenomegalia
	Hepatitis
	Neumonía

Cuadro No.2. Características que sugieren un agente particular del síndrome de TORCH.

	Hidrocefalia
Toxoplasmosis	Calcificaciones diseminadas en la corteza cerebral
	Coriorretinitis focal
	Retinopatía en sal y pimienta
Rubeola	Cataratas
	Glaucoma
	Sordera
	Calcificaciones cerebrales
Citomegalovirus	periventriculares
	Eritema petequiral
	Microcefalia
Herpes	Lesiones cutáneas con costras
	Erupciones vesiculares

2. GENERALIDADES

2.1 ANTECEDENTES HISTORICOS

La infección causada por el virus de la rubéola se conoce desde el S. XVIII y se atribuye su descubrimiento a dos médicos alemanes por lo cual muchos también le llaman sarampión alemán. Inicialmente se pensaba que la rubéola era una variedad de sarampión o de escarlatina (2,5).

Veale en 1868 fue quien reconoció las diferencias clínicas y epidemiológicas entre el sarampión y la rubéola, y 30 años más tarde Koplik describió las lesiones en la mucosa bucal las que fueron consideradas por muchos años como patognomónicas del sarampión (2).

Hiro y Tasaka en 1938, propusieron la naturaleza viral de este padecimiento, pudieron causar la enfermedad en niños susceptibles al ser inoculados con material filtrado de lavados nasales obtenidos de pacientes con rubéola durante la fase aguda (6,7).

En 1941, Norman Gregg, oftalmólogo italiano observó la asociación de rubéola con defectos congénitos como cataratas y cardiopatías en mujeres embarazadas e infectadas durante el curso de los primeros meses de gestación, después de la primera epidemia de rubéola ocurrida en Australia en los años 1939-40 (2,6,7,8,9).

Krugmann y Ward en 1953 demostraron que la enfermedad puede cursar sin exantema , e hicieron experimentos de transmisibilidad con voluntarios humanos (9,10).

Parkman , Buescher y Artenstein en 1962, cultivaron el virus al descubrirlo a través de su interferencia con el virus ECHO tipo 11 en cultivos primarios de ríñon de mono (2,6,8). En 1963 Selzer reporto el aislamiento del virus de un feto abortado demostrando así la infección transplacentaria y el posible mecanismo de transmisión (2).

Neva F.A.; Alford C.A. y Weller T.H. en 1964 observaron algunos efectos citopáticos característicos, como redondeamiento de células y presencia de cuerpos de inclusión citoplasmáticos eosinófilos , en cultivos primarios de amnios humano (9).

En 1967 , Halonen , Stewart et.al. Describieron la técnica original de la Inhibición de la hemaglutinación utilizando eritrocitos de pollo recién nacido, que con mínimas modificaciones ha sido la base para para la estimación serológica de mayor preferencia, para anticuerpos contra el virus de la rubéola (11).

En 1966, Osuno L. S., Schmidt y Lennette observaron la formación del virus de la rubéola en la superficie y en las membranas plasmáticas de las células infectadas (9). En el mismo año se obtiene la licencia para la vacuna contra la rubéola (7).

Biddle, 1971. Quirin et al., 1972; Bannerman and Ross, 1973; Nelson et al., 1974; Ivata et al., 1974. Demostraron que los eritrocitos humanos tipo "O" eran más sensibles que los eritrocitos de pollo frescos, para la técnica de Inhibición de la hemaglutinación. (11)

Kohler y Milstein en 1975; introdujeron la técnica de fusión de células somáticas para la producción de anticuerpos monoclonales. Esta técnica fue extendida para estudiar diferentes epitopos de una amplia variedad de proteínas por Massey y Schochetman en 1981; Bruck et al., en 1982; Ho-Terry et al., en 1984. Ofreciendo con ello una valiosa colaboración en la biología molecular del virus de la rubéola y en particular, la identificación de requerimientos estructurales necesarios para la inducción de inmunidad humoral contra este virus. (11, 12, 14)

Simultáneamente han realizado numerosos estudios en busca de nuevas técnicas, más información acerca de la relación de esta enfermedad viral con otras a nivel genético, las características de las vacunas, su duración, sus complicaciones...

2.2 LA RUBEOLA.

Debido a que la enfermedad frecuentemente es subclínica o de difícil diagnóstico, la epidemiología de la rubéola ha sido estudiada fundamentalmente en encuestas serológicas las cuales revelan la frecuencia y distribución de los individuos con anticuerpos específicos, como índice indirecto de la infección (21,26,27,28).

Los humanos son los únicos huéspedes naturales del virus de la rubéola. La diseminación se lleva a cabo por gotitas de saliva o transplacentariamente como ocurre en la infección congénita. Aún cuando se ha demostrado que la enfermedad es altamente transmisible y muy frecuente en la infancia, principalmente durante la edad escolar, las epidemias ocurren con menor frecuencia que las del sarampión. La elevada incidencia, fundamentalmente en niños está relacionada con el hacinamiento y las malas condiciones higiénicas prevalentes en nuestro país. Niños y niñas se afectan por igual, no se ha podido encontrar ninguna asociación estadísticamente significativa entre la prevalencia de anticuerpos y las variables sociodemográficas: sexo, nivel socioeconómico, lugar de nacimiento de padres e hijos o número de orden del hijo (19,7,8,29).

Las epidemias se presentan generalmente en la primavera, pero los brotes mayores se presentan únicamente a intervalos de

varios años. De acuerdo con muchos estudios los niños escapan a la infección hasta la edad escolar y cerca de un 10% de las mujeres en edad de concebir permanecen susceptibles. Los anticuerpos maternos son protectores durante los 8 primeros meses de vida únicamente (6,7,8,17). En algunas comunidades isleñas como la de Trinidad y Hawaii, el porcentaje de adultos susceptibles puede ser hasta de un 50% .

En el síndrome de la rubéola congénita, el virus puede aislarse de las secreciones nasofaríngeas, heces, sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, y de órganos afectados en el neonato. La eliminación del virus persiste durante períodos de hasta 12 a 18 meses, convirtiendo al lactante en una fuente de infección para otros niños mayores y adultos no inmunizados, incluyendo mujeres embarazadas, personal que está al cuidado de ellas como enfermeras, médicos, afanadoras etc.. El riesgo de malformaciones congénitas entre los recién nacidos de mujeres que contrajeron la infección durante el inicio de su embarazo es muy elevado. Del 100% si la infección fue durante las primeras semanas. Del 40% si se adquirió durante el segundo mes y aproximadamente del 15% durante el tercer mes. El riesgo sigue disminuyendo a un 4% durante el segundo trimestre y casi se anula durante el tercero (7,10, 28).

Cuadro clínico.

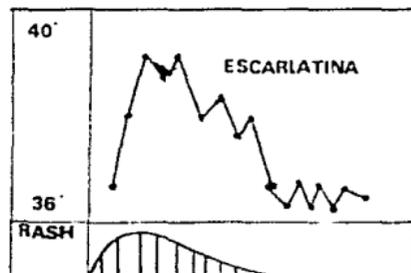
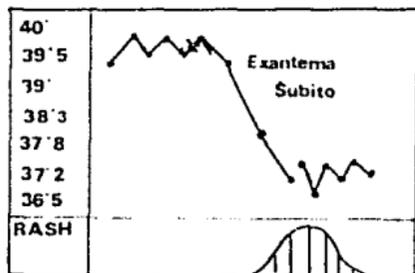
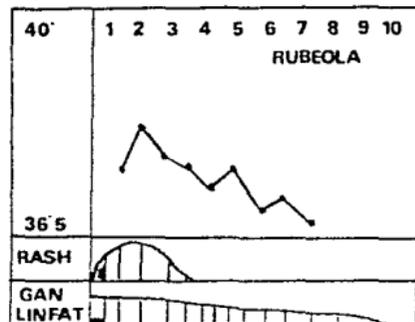
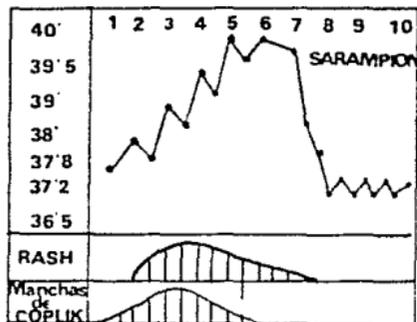
En el niño la rubéola es una enfermedad exantemática leve y por lo general de curso favorable, muy parecida al sarampión o a la escarlatina. Es una infección viral que se transmite por medio de secreciones nasofaríngeas de personas enfermas o con infección subclínica, el virus también se encuentra en sangre, orina, y heces (7,6). El mecanismo de transmisión más frecuente es el contacto directo, aunque también se ha señalado a los objetos contaminados con secreciones nasofaríngeas, heces u orina (7). Los humanos son los únicos huéspedes naturales del virus de la rubéola (7). El período infeccioso va desde 7 días antes de la aparición del exantema hasta 5 días después. El tiempo entre la entrada del agente infectante y la aparición de los primeros signos y síntomas de la enfermedad, tiene una duración de 10 a 21 días.

El cuadro clínico inicia con los signos y síntomas más comunes de la enfermedad, el período prodromico el cual tiene una duración de 1 a 2 días; se caracteriza por faringitis, conjuntivitis, fiebre y signos catarrales, todos de intensidad muy leve que muchas veces pueden pasar inadvertidos. El signo más característico de este período son las adenopatías retroauriculares, cervicales posteriores y postoccipitales (17,2). Los ganglios pueden llegar a medir hasta 20 mm, la linfadenopatía es evidente al menos 24 horas antes del inicio de,

exantema, alcanza su máximo durante el período febril y puede estar presente una o varias semanas después (5,17). La fiebre casi siempre es leve y con duración de 3 a 4 días, en los adolescentes es frecuentemente más elevada (6) y aparece 2 o 3 días antes del exantema. En algunos casos se observa exantema en el paladar blando que consiste en manchas rojas muy pequeñas (2) que pueden confluir y producir enrojecimiento el cual puede extenderse hacia la faringe. Toda ésta sintomatología disminuye rápidamente después del primer día de la aparición del cuadro eruptivo.

Cuadro eruptivo

El exantema que se presenta tiene mucho parecido con el del sarampión; se inicia en la parte retroauricular y se extiende con rapidez. Su evolución es tan rápida que puede estar desapareciendo al tiempo que surge en el tronco. Hay un gran número de pequeñas máculo-pápulas de 2 a 5 mm de diámetro que en su mayoría no son coalescentes, se observan también extensas áreas de enrojecimiento que abarcan con rapidez todo el cuerpo, generalmente en 24 horas. El exantema puede ser confluyente, particularmente en la cara. Durante el segundo día la erupción toma un aspecto puntiforme, especialmente en el tronco recordando a la escarlatina (Ver figura No.1). Puede haber prurito moderado, la erupción puede desaparecer al tercer día sin dejar



Curso clínico de la rubéola sarampion, exantema súbito y escarlatina

fig. No. 1

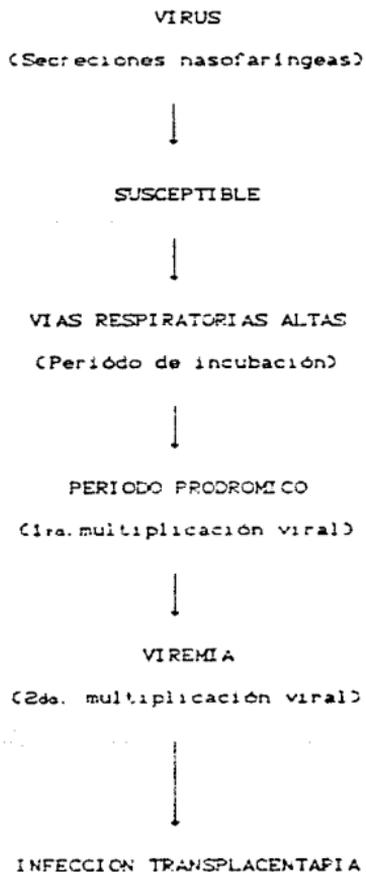
pigmentación y la descamación es mínima. También se han reportado casos de rubéola sin exantema. Las mucosas faríngea y conjuntival están ligeramente inflamadas. En contraste con el sarampión, en la rubéola no se presenta fotofobia. La fiebre es escasa o inexistente y, cuando se presenta, lo hace en el momento máximo de la erupción con una duración de 1 a 2 días. La temperatura en pocas ocasiones sobrepasa a los 38.5 °C. No son frecuentes en la rubéola la anorexia, la cefalea y el malestar general. Aproximadamente el 50% de los enfermos presenta esplenomegalia (2,7,8,16,17).

Patogenia

Existen pocos estudios histopatológicos relativos a la rubéola adquirida después del nacimiento ya que como se dijo antes evoluciona casi siempre en forma benigna. La puerta de entrada son las vías respiratorias altas, multiplicándose el virus y diseminándose ampliamente antes de la aparición del exantema, puesto que se le ha encontrado hasta una semana antes en heces, orina, y sangre. Los virus pueden ser aislados a partir de secreciones nasofaríngeas, y en algunos casos de las heces y de la orina, desde siete días antes de la aparición del exantema, hasta aproximadamente cinco días después. Durante la primera multiplicación y diseminación viral en las vías respiratorias altas, ocurre el período prodrómico coincidiendo con la linfadenopatía cervical y occipital. Durante este período y uno o dos días después de la aparición del exantema; el virus puede ser aislado de la sangre donde lleva a cabo su segunda replicación (Ver cuadro No. 3). En la rubéola no se han descrito lesiones patológicas características; exceptuando las graves lesiones que ocasiona en fetos infectados, afectando tejidos de todas las capas germinales (6,7,9,17).

Muy raros son los casos en que además de las lesiones inflamatorias moderadas en la mucosa nasal o en la faringe, con el exantema cutáneo también se presente artropatía inflamatoria aguda transitoria o encefalitis postinfecciosa.

Cuadro No.3 Proceso de infección del virus



Reacción Inmunológica.

En el momento de la aparición del exantema, el individuo presenta generalmente anticuerpos neutralizantes, fijadores de complemento e inhibidores de la hemaglutinación, estos anticuerpos alcanzan títulos máximos al iniciarse la etapa de convalecencia y persisten junto con la inmunidad, durante muchos años e incluso toda la vida del individuo (Ver figura No. 2). Los anticuerpos del tipo IgM o IGS son los que se producen inicialmente cuando ocurre la infección; después se forman los de la variedad 7S o IgG. Los niveles de anticuerpos IGS descienden cuando los virus desaparecen del huésped; la inmunidad persistente se atribuye a los anticuerpos 7S (7,9,10). Los anticuerpos vacuna-inducidos brindan una protección contra la rubéola clínica y la viremia asintomática por un período de al menos 15 años.

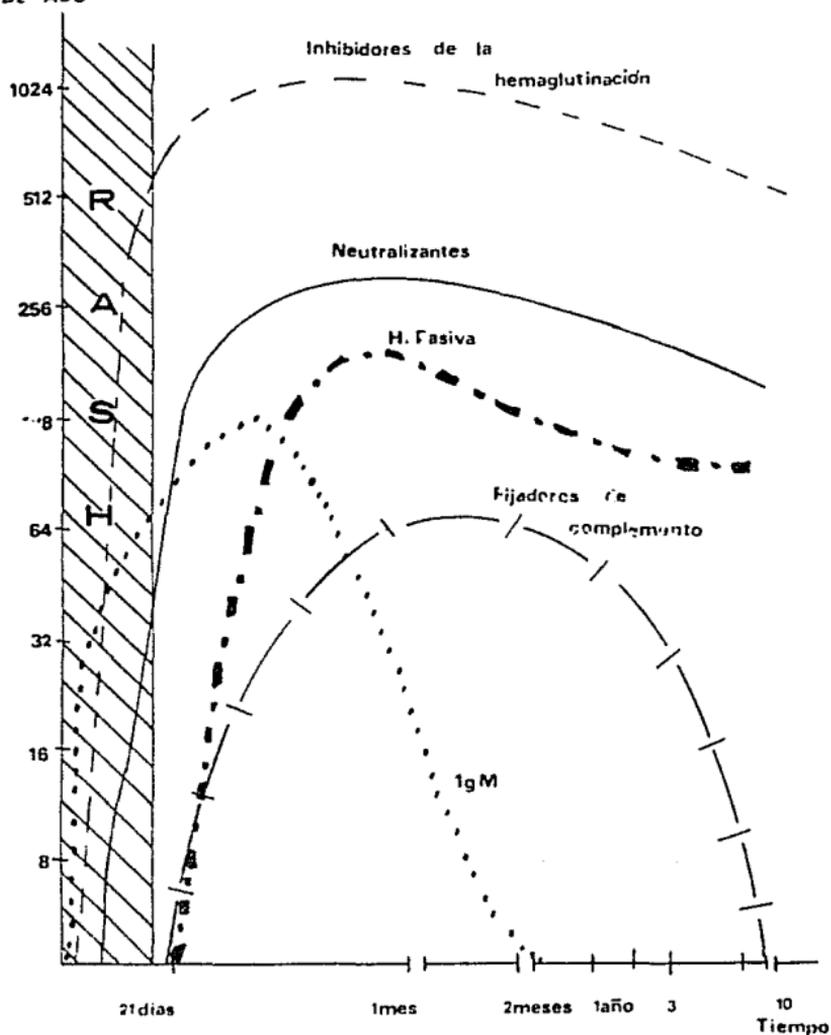
Los anticuerpos fijadores de complemento se desarrollan más lentamente que los anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación, presentándose alrededor del noveno día después de la aparición de la enfermedad, alcanzando sus niveles máximos de 4 a 6 semanas después de la infección y empiezan a disminuir 4 a 6 meses más tarde, desapareciendo a los pocos años.

Pueden detectarse anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación conjuntamente 2 a 3 días después de la viremia, alcanzando su máximo 24 a 28 días más tarde, finalmente el título decrece hasta dejar anticuerpos residuales, que persisten durante muchos años.

fig. No. 2

RESPUESTA DE ACS A LA INFECCION
POR EL VIRUS DE LA FUBEOLA

TITULO
DE ACS



2.3 LA RUBEOLA CONGENITA.

En 1941 el oftalmólogo N.Gregg (1,6,7,8,9) describió por primera vez la asociación de defectos congénitos e infección materna con el virus de la rubéola. La triada clásica descrita en niños con rubéola congénita es sordera, cataratas y cardiopatía. Desde entonces y especialmente después de la epidemia de rubéola en los años 60's, se intensificaron los trabajos sobre la rubéola congénita y se ampliaron los estudios sobre posibles alteraciones a nivel de los ojos, oídos, sistema nervioso, corazón, hematológico, hepático, dérmico, etc., (4,5,6,7,8,9).

Dado que una persona infectada con el virus de la rubéola es transmisor desde 5-7 días antes de que el cuadro eruptivo se presente, y aun cuando éste no aparezca, el individuo susceptible que ha sido contagiado, puede entrar en fase de viremia, aún antes de que el contagiante haya presentado la erupción, y si ésta no ocurre, el contagio pasa inadvertido, lo cual reviste gran importancia cuando la que está en peligro es una mujer embarazada, durante el primer trimestre de gestación, que corresponde al período en que la infección congénita afecta en mayor grado. El hecho de que la embarazada no presente exantema de ningún modo significa que el feto esté a salvo del contagio transplacentario y sufrir malformaciones u otras secuelas (6,7).

La viremia es evidentemente la fase más importante en la patogénesis de la infección fetal, ya que por esta vía el virus es capaz de atravesar la placenta y causar daños irreversibles en las células fetales (18).

A diferencia de la rubéola post-natal, la rubéola congénita puede ser causa de muy diversas y graves lesiones como:

a) Cardiopatías: El defecto congénito más frecuente es la cardiopatía (60 a 100%). La lesión característica es una proliferación de la capa íntima de las arterias pulmonares y sistémicas de mayor calibre, de carácter segmentario con probable falla de crecimiento localizado que causa estenosis . Otros hallazgos cardíacos frecuentemente encontrados son la persistencia del conducto arterioso y la comunicación interventricular (6,7,19,20,21).

b) Cataratas: Es el rasgo clínico que más frecuentemente acompaña a la cardiopatía. (85%) pueden ser unilaterales, o bilaterales. Otras malformaciones oculares que se presentan en la rubéola congénita son: glaucoma, retinopatía, microftalmia, opacidad corneal y estrabismo (6,7,19).

c) Sordera: La cardiopatía frecuentemente se acompaña de sordera, aunque no en todos niños afectados se manifiesta en primeros meses de vida, puesto que hasta el 50% de los niños seropositivos al virus de la rubéola, oyen bien al nacer pero presentan sordera en la niñez (6,7,8,19).

Existen otras manifestaciones clínicas también importantes aunque menos frecuentes como:

d) Alteraciones cerebrales: Encefalitis, microcefalia, retraso psicomotor, parálisis (7,8).

e) Lesiones viscerales diversas: Hepatitis, esplenomegalia, neumonía.

f) Lesiones óseas: Desmineralización de las metafisis e irregularidad de los cartilagos articulares, por defectos de calcificación del osteoide (7,8).

g) Hallazgos fenotípicos de la cara: Nariz pequeña con aletas hipoplásicas, labios alargados y finos, cara alargada con diametro bifrontal estrecho y fisuras palpebrales pequeñas (20).

Pueden existir además otros datos relacionados directamente con el proceso infeccioso, tales como púrpura trombocitopénica, ictericia, anemia, hepatoesplenomegalia, encefalitis con abombamiento de la fontanela y pleocitosis (6,7,8).

Patogenia.

En relación a la patogénesis de la enfermedad la infección placentaria se produce con doble frecuencia que la infección fetal reconocible clínicamente, con el amplio espectro de defectos que varían desde el estado subclínico hasta malformaciones multisistémicas evidentes. La infección subclínica puede manifestarse más tarde con alteraciones psicomotoras e intelectuales. La posibilidad de riesgo y el grado de defectos congénitos que presente el recién nacido depende de dos factores; el estado inmunológico de la madre en relación a la infección y la edad gestacional en la cual ocurre la exposición al virus (19).

El mayor daño ocurre principalmente en los fetos infectados durante el primer trimestre de embarazo. Por lo general en los fetos humanos infectados, al igual que en la mayoría de los cultivos celulares, el virus de la rubéola es relativamente no citocida, se encuentran pocos cambios inflamatorios o necróticos. El crecimiento retardado de los niños así como la serie de alteraciones morfogénicas están asociadas a la persistencia de la infección durante el período crucial de la organogénesis y al efecto de la infección viral sobre la maquinaria biosintética; reducción de la división celular por una inhibición de la mitosis y un gran número de roturas cromosómicas, lo que da origen a órganos hipoplásicos con cifras subnormales de células (7,20).

Lo anterior ha sido observado al estudiar células de embrión humano, de necropsias y de recién nacidos infectados congénitamente, las cuales muestran defectos embrionarios relacionados con la disminución del desarrollo de las tres capas del embrión (10,20). El virus puede ser aislado virtualmente de cualquier órgano del recién nacido con síndrome de rubéola congénita, aunque solamente una minoría de células en un órgano dado se encuentra alterado.

Reacción Inmunológica de la Rubéola Congénita. El síndrome de la rubéola en los lactantes dió oportunidad para observar el fenómeno de tolerancia inmunológica. El feto humano infectado con este virus es capaz de producir anticuerpos específicos antes del nacimiento (7). (ver figura no. 3). La IgG encontrada en los fetos es de origen materno pero los altos niveles de IgM deben haber sido sintetizados por el feto mismo, ya que la IgM no atraviesa la placenta normalmente, la presencia de anticuerpos de la clase IgM en el recién nacido es evidencia de infección congénita (22, 23). Después del nacimiento, los títulos de IgM e IgG permanecen elevados, ya que el lactante continúa sintetizando ambos tipos de anticuerpos debido a la presencia del virus en sus células, no obstante estos anticuerpos no arrojan de su ambiente intracelular al virus, y continúa eliminando virus contagiante por un año o incluso más tiempo. En los niños infectados congénitamente los niveles máximos de anticuerpos de la clase IgM se alcanzan entre el cuarto y el séptimo mes de vida posnatal. Los anticuerpos transplacentarios tienen una vida media de aproximadamente un mes (7) ver figuras 3, 4, y 5.

Durante la infección transplacentaria en la fase virémica de la madre, los anticuerpos formados por la madre pueden inhibir la diseminación del virus pero no logran eliminar a las células productoras de virus que continúan dividiéndose a una velocidad

fig. No. 3

Nivel de ACS 1gG en el recién nacido
(Materna)

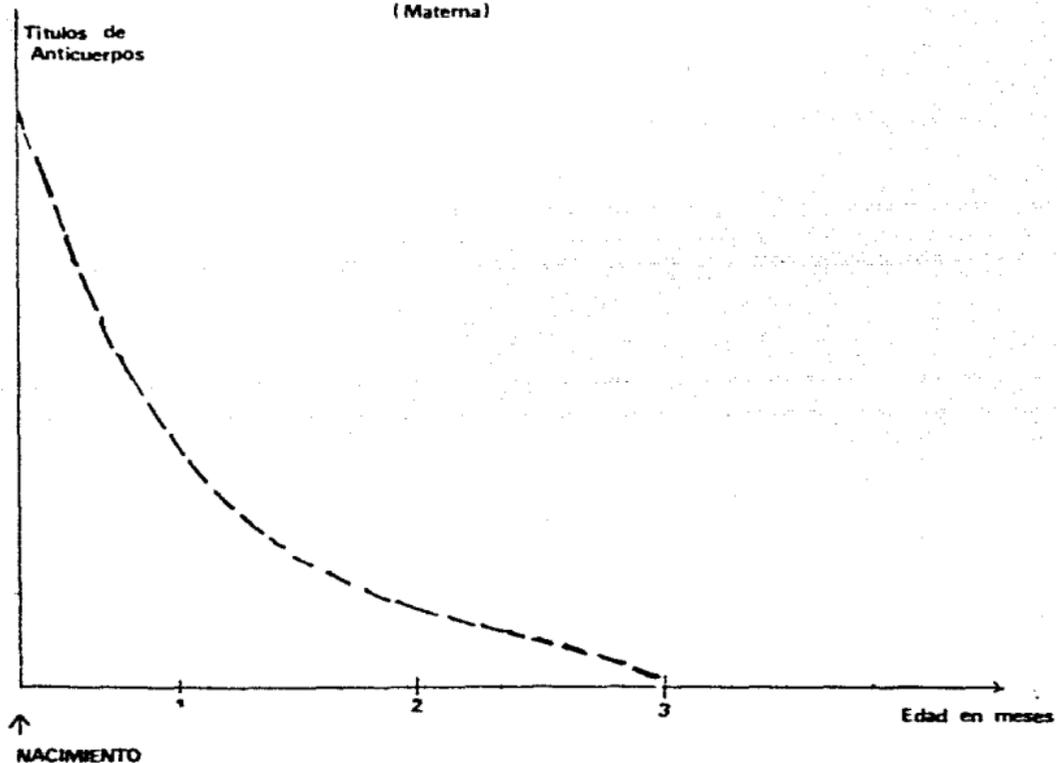


fig. No.4

TITULO

Niveles de ACS en la Infección Congenita

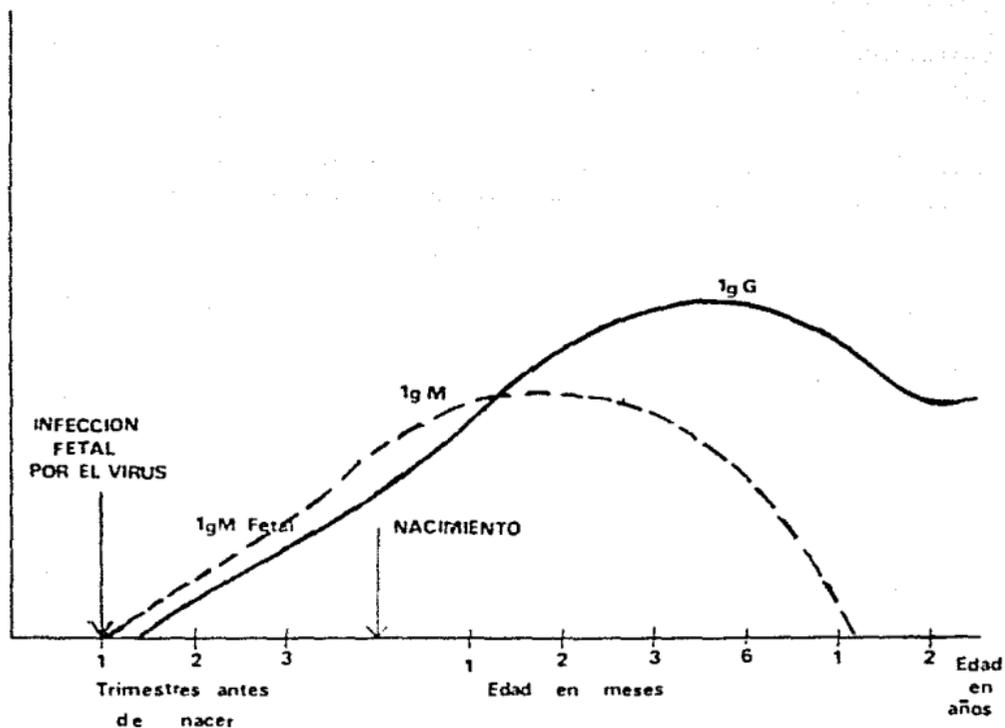
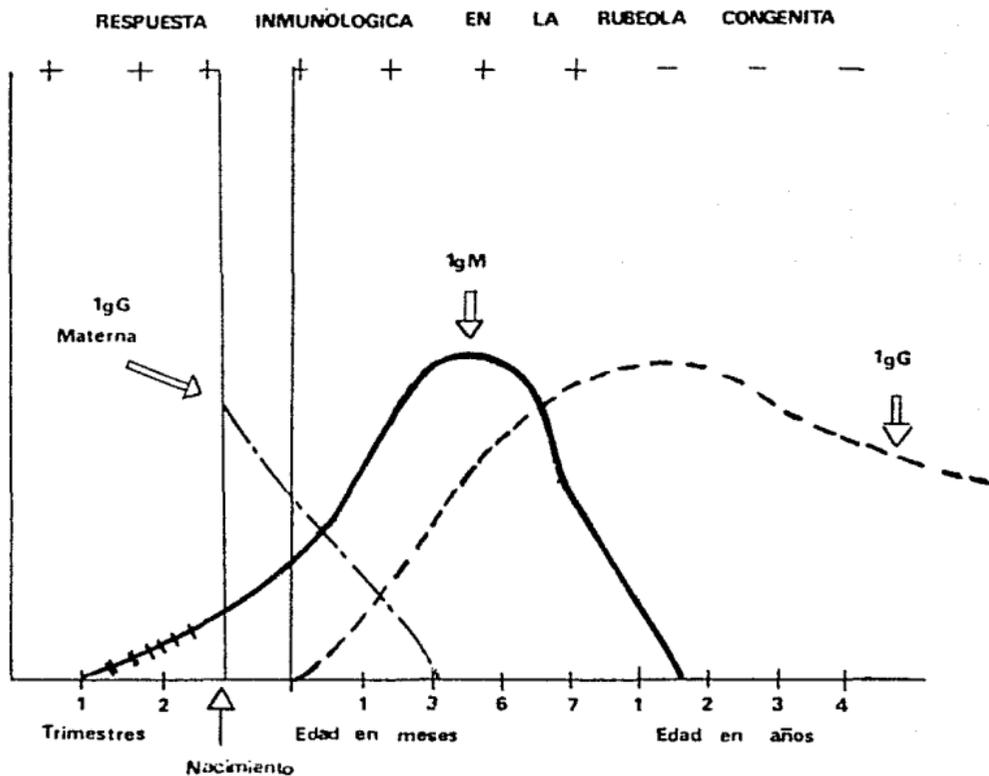


fig. No. 5



menor que las células normales. Por lo general los clones resultantes de células infectadas se pierden algunos meses después del nacimiento, pero ocasionalmente pueden persistir en sitios especiales por más tiempo.

Los anticuerpos neutralizantes del virus de la rubéola se han podido demostrar en niños con infección congénita y en niños no contaminados, cuya madre era inmune a la enfermedad; pero los niveles de anticuerpos difieren: persisten altos en los niños que han sufrido la infección, mientras que los que han recibido inmunidad transmitida por la madre, los niveles descienden con rapidez.

Profilaxis.

a) Quimioterapia: Aunque el clorhidrato de amantadina es capaz de proteger a los cultivos celulares, contra el virus de la rubéola, su empleo en la embarazada esta prohibido por tratarse de un producto antimetabólico con poderoso efecto teratogénico (10).

b) Inmunización pasiva : El uso de la inmunoglobulina humana IgG, administrada después de la exposición al virus de la rubéola no previene la infección ni la viremia, pero si puede modificar los síntomas (24, 25, 26). La practica de administrar dosis elevadas de inmunoglobulina a mujeres embarazadas que habian estado en contacto con enfermos de rubéola ha sido abandonada, puesto que solo aumentaba el número de casos con infección subclínica, incrementándose los posibles contagios, además se han reportado casos de recién nacidos con rubéola congénita cuyas madres recibieron una dosis vacunal poco tiempo después de la exposición al virus, lo cual confirma que no se disminuye el riesgo de infección ni la viremia (6, 10, 24).

c) Inmunización activa : La inmunización activa puede ser adquirida de dos formas:

- Inmunización por exposición al virus y contraer la enfermedad. Antes de que se contara con la vacuna, las madres sugerian a sus hijas la conveniencia de adquirir la inmunidad para la rubéola exponiendose deliberadamente a la infección;

incluso se llegaron a inventar las fiestas rubéola donde asistían enfermas, convalescentes y susceptibles con el firme propósito de infectarse. Pero una mujer embarazada, debe evitar todo contacto con enfermos de rubéola. Los niños afectados por rubéola son un peligro potencial a este respecto, deben conservarse en aislamiento estricto, lejos de hospitales de maternidad, por el riesgo extremo de transmitir la infección a enfermeras, doctoras, visitantes, mujeres embarazadas atendidas en la clínica prenatal (7, 24, 28)

- Administración de vacunas: La amplia epidemia aparecida en Australia en 1940, y en 1950 con casos en todo el mundo; en Estados Unidos se reportaron anomalías en alrededor de 20 mil niños, provocando problemas emotivos y una pérdida económica de gran magnitud. Para evitar estas consecuencias de la enfermedad es muy importante la prevención de la infección materna (24).

Existen tres vacunas de virus vivo atenuado en uso:

a) HPV-77 : Esta vacuna se desarrolló en Estados Unidos por el pase del virus de la rubéola 77 veces en cultivos de células de riñón de mono verde africano, y después varias veces en cultivos de embrión de pato para reducir el riesgo de contener virus de simios. Esta vacuna provoca en personas adultas artritis en un alto porcentaje (7, 24).

b) Cendehill. Vacuna desarrollada en Bélgica por pases del virus de la rubéola en cultivos primarios de células de riñón de conejos libres de gérmenes. Esta vacuna es más atenuada que la HPV-77 y rara vez produce artralgia en los adultos y muy raramente linfadenopatía.

c) RA27/3. Esta vacuna se desarrolló en Estados Unidos por crecimiento del virus en una cepa diploide de fibroblastos de pulmón embrionario humano de la línea WI-38. Puede ser administrada directamente por vía intranasal donde su prendimiento es bastante satisfactorio, o bien por vía subcutánea (5,17). Esta vacuna tiene varias ventajas sobre las demás, ya que produce anticuerpos nasofaríngeos y una amplia gama de anticuerpos séricos, proporcionando protección mejor contra la reinfección y una mejor semejanza con la inmunidad inducida por la infección natural. El virus vacunal es sensible al calor y a la luz, por eso la vacuna debe almacenarse en el refrigerador a 4°C y utilizarse tan pronto como se reconstituya. La vacuna es producida en forma monovalente o en forma combinada Rubéola-Parotiditis y Rubéola-Parotiditis-Sarampión (25).

Los títulos de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación y neutralizantes son en cierta forma más altos con la vacuna RA27/3. Experimentos clínicos indican que el 95% de los vacunados susceptibles que recibieron una dosis única contra la rubéola presentaron protección contra el cuadro clínico y la viremia

durante un período de por lo menos 15 años, sin embargo un pequeño número de reportes indican que la reinfección después de la exposición puede ocurrir en personas vacunadas que presentan bajos niveles de anticuerpos detectables (22,24,26,29,30).

Algunos vacunados emiten intermitentemente pequeñas cantidades de virus desde la faringe, de los 7 a los 29 días después de la vacunación. Sin embargo estudios de contactos con familiares susceptibles y la experiencia ganada indican que el virus de la vacuna no se transmite. Estos datos indican que la vacunación de niños susceptibles cuyas madres u otros familiares son mujeres embarazadas no presentan riesgo de contagio, al contrario, la vacunación de dichos niños protege a esas mujeres (24).

Efectos colaterales y reacciones adversas de la vacuna.

Algunos niños que reciben la vacuna presentan efectos colaterales tales como fiebre moderada, exantema y linfadenopatía. Cerca de un 40% de los vacunados presentan dolores en las articulaciones pero casos de artritis bien declarada solo se presentan en un 2% de los casos. La artralgia y la artritis pasajera tienden a ser más severas en mujeres adultas que en los niños (24).

La vacunación con el virus vivo atenuado es recomendable en niños desde los doce meses de edad, no debe ser administrada a

infantes más jóvenes porque antes de un año todavía persisten anticuerpos maternos que podrían interferir con la seroconversión. Cuando la vacuna de la rubéola es parte de una vacuna combinada que incluya el antígeno del sarampión, la vacuna deberá ser administrada a los 15 meses o más, que es cuando se alcanza una tasa de prevalencia de anticuerpos protectores mayor contra el sarampión (7,24,25).

Precauciones y contraindicaciones.

La vacuna no puede administrarse a mujeres embarazadas. Si una mujer embarazada es vacunada o se embaraza antes de que pasen tres meses de la vacunación debe ser advertida de un posible riesgo para el feto (24,25).

La vacunación de personas con enfermedad febril severa deberá posponerse hasta su recuperación, sin embargo niños susceptibles con ligera fiebre pueden ser vacunados sin riesgo. Las reacciones de hipersensibilidad rara vez son seguidas de la administración de la vacuna, la mayoría de estas reacciones son consideradas menores y pueden consistir en ronchas, fuegos o urticarias en el sitio de la inyección. Las personas que han sufrido reacciones alérgicas a la penicilina pueden no recibir la vacuna por contener ésta, trazas de neomicina.

La replicación del virus de la vacuna puede ser potenciada en pacientes con enfermedades de deficiencia inmune y supresión.

de la respuesta inmune, como ocurre en las leucemias, linfomas, terapias con corticosteroides, drogas alquilantes, antimetabólicas y radiación, pacientes en tales condiciones no deberán recibir la vacuna (24). Las terapias menores de dos semanas con corticosteroides, terapias con esteroides tópicos, inyección intraarticular o de tendones no presentan inmunosupresores y no son necesariamente contraindicativas para la administración de la vacuna con el virus vivo de la rubéola.

Transporte y almacenamiento de la vacuna.

La administración de la vacuna en forma inapropiada puede provocar una falta de protección contra esta enfermedad. Antes de ser reconstituida la vacuna puede ser almacenada de 2° a 8°C o congelada. Deberá ser protegida de la luz puesto que el virus es fotosensible. Una vez reconstituida la vacuna deberá ser descartada si no se usa dentro de las 8h. siguientes. La vacuna debe ser transportada en un recipiente en hielo seco o a 10°C.

Medidas Preventivas.

Las medidas preventivas están enfocadas hacia el síndrome de la rubéola congénita, ya que la enfermedad adquirida después del nacimiento es benigna en niños sanos y bien nutridos. Algunas de las actividades recomendadas para disminuir las terribles consecuencias de niños infectados trasplacentariamente incluyen :

a. Proporcionar al público en general una mayor información sobre la problemática de este padecimiento, especificando las causas y consecuencias.

b. Inmunizar a la población susceptible, especialmente a mujeres en edad de concebir, asegurándose de que estén vacunadas por la implantación de un programa de rutina en la atención médica y ginecológica, inmunizar a las mujeres susceptibles después de un aborto o un parto.

c. detectar a las mujeres susceptibles antes de contraer matrimonio, usando una prueba serológica rápida para la detección de anticuerpos específicos. Esta prueba puede ser un requisito prenupcial. El control puede realizarse desde las escuelas.

d. Realizar una prueba serológica para detectar anticuerpos específicos a todo el personal dedicado a la atención hospitalaria, ya que ellos pueden ser una fuente de infección.

e. Mejorar las condiciones higiénicas y de hacinamiento en la medida en que sea posible.

2.4 CARACTERISTICAS DEL VIRUS DE LA RUBEOLA

La rubéola es una enfermedad de origen viral. El virus pertenece a la familia *Togaviridae*. este grupo de virus es muy numeroso y su clasificación está basada en las propiedades físicas y bioquímicas de los viriones. El prefijo *Toga* indica que el grupo posee una rica cubierta lipídica pero no es un término que indique una característica singular del grupo. Lo que realmente distingue a los *Togavirus* de otras familias es que se trata de los virus más pequeños que tienen envoltura, con una cadena de ARN y sin transcriptasa reversa. una característica adicional útil para su identificación es que la mayoría de los *togavirus* son transmitidos por artrópodos, pueden ser replicados en insectos y en líneas celulares diversas (1,7,13). El virus de la rubéola es un *togavirus* que no es transmitido por artrópodos y ha sido separado en el género *Rubivirus* (2). Ver cuadro No.4 .

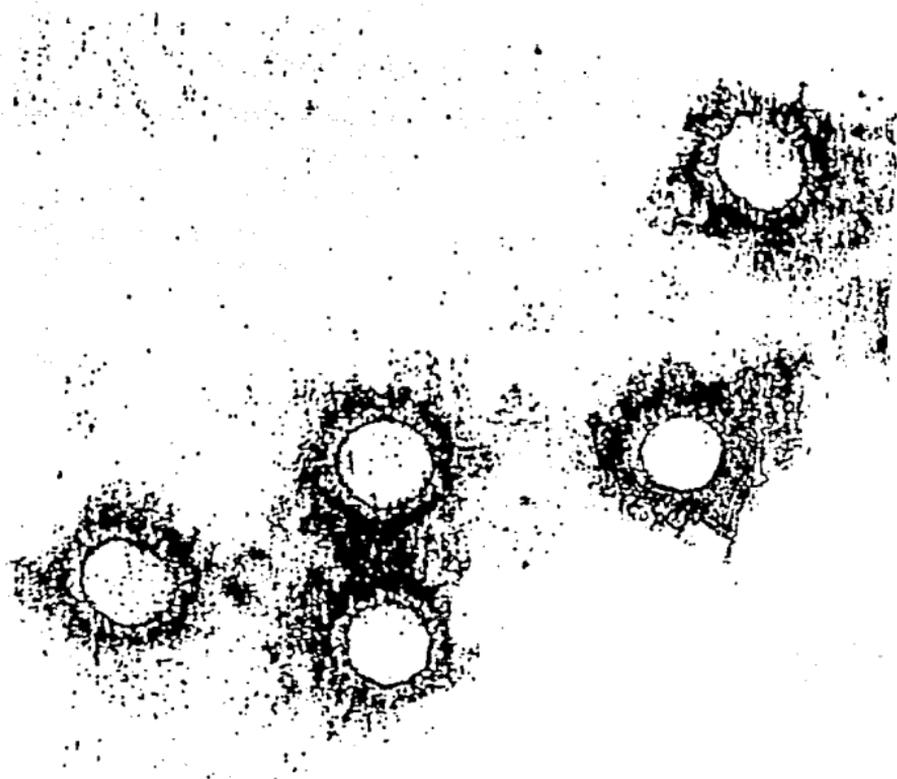
Morfología

El virión es de forma esférica y presenta un diámetro de 50 nm tanto en cortes finos como en preparaciones con tinción negativa, dicho virión se halla formado por una porción central icosaédrica de 30 nm, encerrado por una cubierta laxa firmemente adherida. Posee pequeñas espículas en su superficie que se proyectan entre 4 y 7 nm a partir de la envoltura (1,7,9,13.). Ver Fig. No.8

Cuadro No. 4 Clasificación de la familia Togaviridae

Género	Subgrupo	Especies	Enfermedad
Alfavirus	I	E E E	Encefalitis
		V E E	Encefalitis
		W E E	Encefalitis
		Sindbis	Subclínica
	II	Chikungunya	Cefalea, fiebre, mialgia, artralgia.
Flavivirus	I	Encefalitis de St Luis	Encefalitis
	II	Dengue	Cefalea, fiebre, mialgia
	III	Fiebre amarilla	Fiebre, nefritis hepática
Rubivirus		Virus de la rubéola	Exantema, fiebre, malformaciones congénitas.

FIGURA NO. 6 EL VIRUS DE LA RUBEOLA



Composición

El virus de la rubéola está formado por ARN, lípidos y proteínas.

Contiene una cadena simple de ácido ribonucleico ARN(1) cuyo peso molecular es de aproximadamente 4.3×10^6 Daltons (1.15) que comparado con el ARN de los paramixovirus es considerablemente menor. Tiene un coeficiente de sedimentación de 49 S. Este ARN es infeccioso y por lo tanto de polaridad positiva (13). Posee las características típicas de un ARN mensajero eucariota, es decir una terminal 3' poliadenilada (Poly-A) y una terminal 5', faltando, igual que en los ARN de los virus de plantas, grupos metilos internos (1) las secuencias de ambas terminales son complementarias por lo cual las moléculas de ARN pueden formar moléculas circulares.

Los lípidos de la envoltura del virión son derivados de la membrana de la célula que infectó y por consiguiente específicas para las enzimas del husped (2). Estos lípidos están formados por fosfolípidos, lípidos neutros incluyendo colesterol y glucolípidos.

Se ha demostrado que el virus de la rubéola contiene cuatro proteínas estructurales denominadas: E-1 (PM 55000), E-2a (PM 47000), la E-2b (PM 42000) y la C (PM 39000); determinadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (14.15).

E-1, E-2a, y E-2b son glicoproteínas que pueden asociarse con la membrana viral, mientras que la proteína básica C de la cápside se encuentra asociada con el ARN genómico 49S. La composición de aminoácidos de esta proteína muestra que es especialmente rica en prolina y arginina lo cual le da el carácter básico, mientras que su contenido de lisina es bajo (14).

Las proteínas de la envoltura tienen regiones que son ricas en secuencias de aminoácidos hidrófobos (Leu-Isoleu-Val-Phe) y éstas son siempre embebidas en la membrana plasmática mientras que las regiones hidrofílicas forman el interior de las espículas (1).

La composición de aminoácidos de las proteínas E-2a y E-2b son muy similares, su principal diferencia radica en el patrón de oligosacáridos simples o complejos ligados a las cadenas de aminoácidos. La proteína E-2a contiene muy poca manosa y es rica en galactosa, mientras que la proteína E-2b es muy rica en manosa y pobre en galactosa (15). De los análisis de digestión enzimática y corrimientos electroforéticos se ha sugerido que las proteínas E-2a y E-2b son trasladadas por un gen único y que las dos formas de E-2 obtenidas son el resultado de glicosilaciones u otras modificaciones traslacionales posteriores (13, 14).

Los hechos que confirman lo anterior son :

. Solo una de las especies de E-2 es predominantemente detectada en células infectadas con el virus de la rubéola.

. Los mapas peptídicos determinados para ambas proteínas por rastreo radiactivo son iguales.

. El tamaño del precursor para las proteínas E-1, E-2 y C con un peso molecular de 11000 daltons sugieren la presencia de una sola especie de E-2.

Las proteínas E-1 y E-2 son muy similares también en sus secuencias de aminoácidos. Las variaciones que muestran son la proporción de azúcares para cada uno: La glicoproteína E-1 tiene baja concentración de glucosamina, manosa, fucosa y galactosa mientras que la glicoproteína E-2, contiene mayor proporción de glucosamina (13).

Propiedades Inmunológicas

Hasta el momento se ha detectado un solo tipo antigénico del virus de la rubéola (9).

La capacidad inmunogénica del virus radica en las tres glicoproteínas de la envoltura E-1, E-2a, E-2b. Hay datos que indican que el epítipo para la neutralización está localizado en la proteína E-1 del virus y la parte oligosacárida de la cadena no está involucrada puesto que la deglicosilación con una mezcla de glicosidasas bacterianas no impide la unión con los anticuerpos neutralizantes (15). El componente hemaglutinante se localiza en la parte oligosacárida de la cadena de la glicoproteína E-1 (1). Estudios realizados con anticuerpos monoclonales 11C12, demuestran que los anticuerpos neutralizantes no inhiben la capacidad hemaglutinante, con lo cual se confirma que estas dos actividades están localizadas en diferentes epítopos (15). La glicoproteína E-1 se ha detectado que reacciona con la mayoría de los sueros con títulos de anticuerpos contra el virus de la rubéola, mientras que la glicoproteína E-2 frecuentemente pierde su reactividad, lo cual sugiere que ésta última se encuentra en menor proporción, está menos expuesta o es menos inmunogénica (15).

El virus de la rubéola mantiene su capacidad inmunogénica y su reactividad inmunológica después de que su infectividad haya sido eliminada por el formal, calor, pH ácido, β -propionolactona u otros agentes (9,15).

Acción de los Agentes Físicos y Químicos

El virus se inactiva a temperaturas ligeramente elevadas. Se inactiva rápidamente a 37°C durante 60 min., durante 30 min. a 56°C. es relativamente estable a 4°C y permanece considerablemente a -70°C. Es labil a la radiación ultravioleta y completamente resistente a los antibióticos y desinfectantes ordinarios. El virus resiste a la liofilización usando albumina o gelatina como estabilizador (2,8,9).

Los togavirus por el alto contenido de lípidos en su envoltura son rápidamente inactivados por el éter, cloroformo, detergentes, desoxicolato de sodio, agentes reductores, cloruro de cesio y cloro libre (2,8).

El virus de la rubéola pierde rápidamente su infectividad a pH ácido por debajo de 5.9 y es inalterable a pH básico desde 6.8 hasta 8.1.

El virus de la rubéola ha sido concentrado y purificado usando polietilenglicol 6000 como agente precipitante, partiendo de un cultivo celular con un medio pobre en suero. La hemaglutinina sigue siendo biológicamente activa después de la disgregación de la partícula vírica y la neuraminidasa no altera la propiedad de aglutinar GP de pollo recién nacido, ganso o humano del grupo O tripsinizados.

Multiplicación Viral

Mediante autorradiografía de células infectadas expuestas a un breve contacto con uridina tritiada y realizando el estudio con actinomicina D para inhibir la síntesis de ARN Celular se pone de manifiesto que el ARN del virus de la Rubéola se replica en el citoplasma. El ARN marcado se encuentra únicamente a nivel del citoplasma, mientras que en las células no infectadas y en ausencia de actinomicina-D, se encuentra tan solo en el núcleo celular (9).

El virus de la rubéola es capaz de multiplicarse en diversos cultivos celulares primarios, continuos y diploides de distintas especies. El máximo título vírico se alcanza 30 a 40 horas después de la infección y permanece elevado durante varias semanas. La maduración del virus se lleva a cabo a nivel de la membrana celular, esta incorpora proteínas víricas y libera nucleocapsides por gemación, la hemaglutinina se incorpora durante la liberación. Las células infectadas pueden reconocerse por el fenómeno de hemadsorción.

El ECP no se observa en todos los cultivos celulares, se presenta dos a tres semanas después de la inoculación las células se redondean y agrandan, con formación de cuerpos de inclusión citoplasmáticos eosinofílicos de forma circular o irregular.

2.5 DIAGNOSTICO DE LA RUBEOLA

El diagnóstico clínico frecuentemente es difícil dado que muchas otras infecciones víricas pueden producir síntomas y erupciones similares, eventualmente es necesario confirmarlo tal como sucede en las señoras embarazadas en las que se sospecha la enfermedad o que han estado en contacto con un caso dudoso. La rubéola resulta una enfermedad difícil de diagnosticar clínicamente, salvo en caso de epidemia. No es de fiar una historia de rubéola pasada o de vacunación contra esa enfermedad (26,31,32). En la rubéola adquirida después del nacimiento debe hacerse un diagnóstico diferencial principalmente con otros padecimientos exantémicos. La rubéola en sus formas más severas puede confundirse con casos leves de escarlatina o de sarampión. La roseola infantil o exantema de subitio se distingue de la rubéola por la fiebre elevada y la aparición del exantema al final del episodio febril y no en el ascenso culminante de los signos y síntomas. Los exantemas medicamentosos pueden ser difíciles de diferenciar de la rubéola, donde el aumento característico de los ganglios linfáticos ayudará al diagnóstico de esta última. En la mononucleosis infecciosa puede haber una erupción semejante a la rubéola y un agrandamiento de los ganglios linfáticos que llevaría a confusión, pero los hallazgos hematológicos de la mononucleosis infecciosa son suficientes para distinguir ambas entidades. Las infecciones por enterovirus son

acompañadas por exantemas, se diferencian por su período de incubación más breve y por la ausencia de adenopatias suboccipitales (6,7,9,16).

En la rubéola congénita principalmente se debe establecer la diferencia con infección congénita por citomegalovirus, con toxoplasmosis, con sífilis y con herpes. Tales agentes son conocidos como síndrome TORCH, para determinar el agente causal del síndrome de infección congénita en un lactante se requiere hacer cultivos apropiados y pruebas serológicas específicas ya que las características clínicas y malformaciones congénitas pueden ser variables y múltiples (1,3,6,7).

Técnicas serológicas.

Las técnicas serológicas aplicables a los virus incluyen muchas de aquellas con las que se está familiarizado en bacteriología, en la práctica las más útiles son: Fijación de complemento, neutralización, inhibición de la hemaglutinación, inmunodifusión, inmunofluorescencia y radioinmunoensayo. Para todas estas se han producido microtécnicas que han sido automatizadas para su aplicación en virología, en esta forma los pequeños volúmenes de reactivos concentrados van siendo agregados en forma de simples gotas, utilizando pipetas calibradas, microplacas de plástico, y microdilutores metálicos calibrados (7,31,32,33,34,35,36,37).

Las pruebas serológicas más comunes en el laboratorio de diagnóstico virológico, sirven para calcular el contenido de anticuerpos de una muestra de suero mediante la determinación de la mayor dilución de éste que presente todavía una actividad inmunológica adecuada. Lo inverso de la dilución de suero que presenta reacción positiva, se denomina título del suero. La mayoría de los métodos serológicos se hacen por diluciones seriadas del suero 1:10, 1:20, 1:40, etc.. Los datos estadísticos indican que el error en la dilución seriada es de aproximadamente una dilución por encima o por abajo de la dilución correcta. Como consecuencia un incremento diagnóstico se define como la diferencia de por lo menos dos diluciones seriadas entre los títulos del suero (32).

Reacciones de aglutinación

En este trabajo sólo nos ocuparemos de las reacciones de aglutinación : Inhibición de la Hemaglutinación (IHA) y Hemaglutinación Pasiva (HP) para la titulación de anticuerpos específicos contra el virus de la rubéola.

La hemaglutinación depende de la formación de puentes de moléculas de anticuerpos, con glóbulos rojos (GR) el antígeno debe ser particulado de tal manera que al reaccionar con el anticuerpo al formar la malla o agregado pueda distinguirse en forma visible el acutulo del complejo formado. Como en cada GR se hallan varios millares de cada antígeno, hay gran oportunidad para la formación de la red necesaria para crear acumulos de GR visibles con facilidad (33,34).

La aglutinación depende de varios factores no específicos como el pH, la temperatura, la fuerza iónica del sistema en el cual se lleva a cabo la reacción. La reacción se lleva a cabo en solución salina fisiológica, se ha observado que en ausencia de anticuerpos y a un pH fisiológico las bacterias pueden aglutinarse si se les adiciona cloruro de sodio en cantidad suficiente para abatir sus cargas o bien aglutinar si la cantidad de sales es muy escasa (2). La mayor parte de las hemaglutininas son anticuerpos de la clase IgM, debido en gran parte a su gran valencia serológica, también se le suele llamar anticuerpos completos, muchas de estas hemaglutininas IgM se

llaman crioaglutininas a causa de su amplitud termica peculiar, pues actuan mucho mejor a 25°C o incluso a 4°C que a 37°C, temperatura en la cual son esencialmente inactivas. Es posible que a causa de sus dimensiones mas pequenas o de su valencia serológica más baja, los anticuerpos de la clase IgG son hemaglutininas menos eficaces por lo que también se les suele llamar anticuerpos incompletos. Puede lograrse la agregación de células revestidas de anticuerpo incompleto siempre que disminuya la carga repulsiva electronegativa normal de los GR o potencial Z lo anterior puede lograrse por los siguientes metodos:

a) Al exponer las células no reactivas a enzimas proteolíticas como la bromelina, papaína, o la tripsina, liberando de esta forma los grupos electronegativos de la superficie celular de modo que disminuye el potencial Z de la cifra normal de 18-20 mV a casi 8mV (2,23,31,37).

b) Modificando la constante dielectrica del liquido de dilución al añadir albumina.

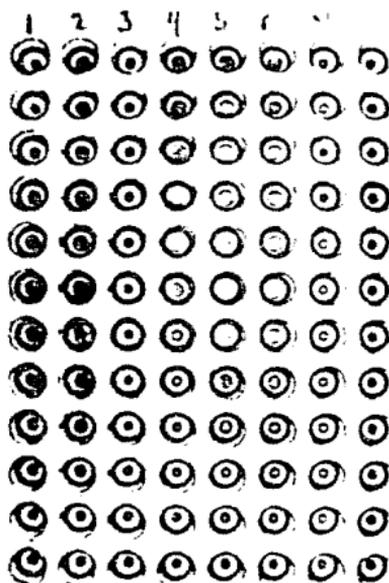
c) Aumentando la salinidad del diluyente hasta una concentración de 1.85% en vez de 0.85%.

Para interpretar la hemaglutinación puede emplearse el cuadro de sedimentación de eritrocitos en tubos o en pozos moldeados en bloques de plástico. Este metodo goza de mucha aceptación en estas técnicas de microtitulación (7,33,40)

Aglutinación negativa: Las células ruedan hacia el fondo del pozo uniformemente formando un botón compacto central de color rojo oscuro. Ver figura No. 7 .

Aglutinación positiva: Las células aglutinadas se extienden en el fondo del pozo formando una alfombra de células. En casos de aglutinación muy intensa son característicos los bordes irregulares o desgarrados del cuadro celular. Ver figura No. 7

Figura no. 7. Cuadro de sedimentacion de eritrocitos



Inhibición de la Hemaglutinación.

La prueba de la IHA es muy sensible, puede detectar concentraciones de anticuerpos por debajo de $1\mu\text{g/ml}$, y muy específica ya que mide solamente aquellos anticuerpos que se unen directamente a la hemaglutinina viral, es decir a las puntas de las proyecciones de los peplómeros de la mayoría de los virus con envoltura (1,7). El empleo de la prueba de la IHA se limita a los virus que poseen alguna aglutinina demostrable para los eritrocitos. La prueba es sencilla, económica y rápida, pero los inhibidores no específicos de la hemaglutinación que normalmente aparecen en los sueros, enmascaran la presencia de anticuerpos específicos dificultando su titulación. La mayoría de los inhibidores no específicos son lipoproteínas o glicoproteínas que deben destruirse por algún tratamiento químico; por ejemplo, peryodato, tripsina, calcio, heparina-cloruro de manganeso, bentonita o rivanol. Los inhibidores termolábiles se destruyen por calentamiento a 56°C durante 30 minutos (7,31,32,33,34).

Los anticuerpos pueden inhibir la hemaglutinación mediada por virus, bloqueando la superficie del virión, ver figura 7.

Después de la incubación de las diluciones sericas con 4-8 unidades hemaglutinantes de virus de la rubéola, se han unido específicamente el antígeno y el anticuerpo si es que estos se encontraban en el suero. Al añadir la suspensión de GR tripsinizados, el virus no será capaz de aglutinarlos. Cuando la dilución de anticuerpos sea muy grande estos dejarán libre al antígeno y este podrá aglutinar a los eritrocitos (31, 33).

Hemaglutinación Pasiva.

La HP utiliza antígenos solubles, fijándolos a un soporte particulado por ejemplo, GR, partículas de bentonita, latex o poliestireno, por medio de agentes como el ácido tánico, la bencidina diazoadada, las carbodiimidias, cloruro cromoico y otros como se muestra en el cuadro No. 5. (31).

Los GR suelen preferirse a otras partículas como soportes debido a su sensibilidad como indicadores, puesto que la hemaglutinación es una técnica serológica bien conocida y los resultados se interpretan con facilidad. Su posibilidad de almacenamiento es una propiedad importante ya que los GR al ser tratados con formalina, glutaraldehído o aldehído pirúvico, pueden ser almacenados durante tiempo prolongado a 4°C. Aunque éste no es aplicable a todos los antígenos que recubren, el tratamiento con estos preservativos puede ser efectuado a menudo ya sea antes o después del acoplamiento con el antígeno. Cuando los GR son usados como partículas inertes se deben adsorber las muestras de suero con GR lavados, no cubiertos por antígeno, para eliminar los anticuerpos heterofílicos que podrían aglutinar inespecíficamente.

La técnica de acoplamiento del antígeno al GR con ácido tánico quizá sea el método más usado, también es llamado del eritrocito curtido. Con este tratamiento se aumenta la cantidad de antígenos proteicos que son subsiguientemente adsorbidos aumentando la sensibilidad del método (31, 34).

Cuadro no. 5. Métodos empleados para recubrir eritrocitos frescos y tratados con aldehído , con diversos antígenos y anticuerpos para el análisis de la hemaglutinación.

Agente Acoplador	tipo de acoplamiento	Antígeno.
Ninguno	Absorción	Penicilina, antígenos bacterianos ovoalbúmina.
Acido Tánico	Absorción por cambios analogos a las enzimas.	amplio espectro de antígenos.
Bencidina bisdiazoada (BDB)	Enlaces Covalentes azoados.	Proteínas y antígenos de polen.
1-3difluoro 4-6-dinitrobenzenc.	Absorción posterior a una modificación de la membrana celular	Proteínas purificadas y GCH.

Agente acoplador	Tipo de acoplamiento	Antígeno.
Cloruro Crómico	Fijación de proteínas por el efecto de carga de cationes trivalentes	Proteínas
Glutaraldehído. Cloruro cianúrico o-dianiciilina tetra- zoada.	Enlace Cruzado	Diversas Proteínas y enzi- mas.
Carbodiimida hidro- soluble.	Enlace Covalente	Proteínas.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente en los laboratorios de Virología es muy común el uso de la técnica de la inhibición de la hemaglutinación para detectar anticuerpos contra el virus de la rubéola, sustituyendo a métodos más sofisticados y costosos; IHA resulta una prueba de bajo costo, buena sensibilidad y especificidad. Sin embargo se han diseñado modificaciones a la técnica tradicional mejorando su eficiencia reemplazandola para ser realizada con un mínimo esfuerzo y tiempo.

El diagnóstico serológico de infecciones por rubéola es corrientemente llevado a cabo por otra gran variedad de ensayos inmunológicos, debido a que la IHA tiene algunas desventajas: El método requiere dos especímenes de suero, obtenidos por un intervalo de dos semanas, cuando el primer espécimen es obtenido tarde el título de anticuerpos puede no ser detectado, sino hasta después de una semana ocurrida la infección.

La hemaglutinación pasiva constituye un método adecuado debido a la amplia aplicación de las técnicas de aglutinación y por la diversidad de antígenos solubles que pueden absorberse de manera pasiva o acoplarse químicamente a los eritrocitos u otro soporte inerte. Esta técnica puede convertir a técnicas serológicas menos sensibles en métodos de aglutinación de alta sensibilidad al acoplarse a anticuerpos específicos. Esta prueba es un método disponible para el virus de la rubéola, con

posibilidades de mejorar a la técnica habitual para esta determinación, proporcionando un método más práctico para muchos laboratorios y un ahorro significativo de tiempo en los laboratorios más grandes obteniéndose resultados mejores o competitivos en cuanto a sensibilidad y especificidad.

Es muy importante disponer de un método rápido y eficaz en la detección de anticuerpos específicos contra el virus de la rubéola en mujeres susceptibles y por consiguiente la prevención de casos de síndrome de la rubéola congénita, así como de diagnosticar con mayor grado de certidumbre los casos de rubéola congénita en pacientes con síndrome de TORCH.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

Comparar la técnica de la inhibición de la hemaglutinación con la hemaglutinación pasiva para la determinación de anticuerpos específicos contra el virus de la rubéola.

4.2 Objetivos particulares:

Conocer las desventajas experimentales de la técnica de la inhibición de la hemaglutinación.

Determinar las ventajas que ofrece la técnica de la hemaglutinación pasiva.

Explicar los mecanismos inmunológicos que se llevan a cabo en estas reacciones de aglutinación.

Comparar los títulos de anticuerpos obtenidos experimentalmente por ambas técnicas.

Conocer la importancia clínica y epidemiológica de la rubéola en mujeres en edad de concebir.

5. HIPOTESIS DE TRABAJO

Si el método de acoplar con ácido tánico el antígeno de la rubéola a eritrocitos humanos fijados con glutaraldehído, resulta ser un método equiparable con la técnica de inhibición de la hemaglutinación en la detección de anticuerpos específicos contra el virus de la rubéola, entonces podrá usarse indistintamente como método de rutina en el laboratorio clínico.

6. MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron sueros de pacientes del Hospital Infantil de México "Federico Gómez".

Las muestras de suero empleadas se colectaron del trabajo de rutina del laboratorio de Virología de este hospital.

Los sueros probados fueron de distintas procedencias:

a) Mujeres no inmunizadas que habían estado en posible contacto con casos de rubéola durante el primer trimestre de su embarazo y deseaban conocer con urgencia si debían ser sometidas a un aborto.

b) Mujeres que presentaron un ligero exantema durante los primeros meses de su embarazo.

c) Jóvenes adolescentes o recién casadas que deseaban saber si habían padecido con anterioridad de rubéola y por lo tanto rechazar la inmunización sin correr riesgos.

d) Bebés recién nacidos de madres afectadas o que presentaron un exantema al principio de su embarazo.

e) Bebés recién nacidos cuya apariencia dio lugar a que se sospechara de alguna infección congénita por cualesquiera de los agentes del síndrome de TORCH.

Se utilizaron 100 sueros incluyendo algunos controles negativos. Los sueros colectados se almacenaron en congelación a -20°C hasta el momento de la determinación de anticuerpos. Se determinó el título de anticuerpos de todas las muestras por ambos métodos a probar utilizando microplacas de polipropileno con controles positivos de títulos conocidos y negativos en cada placa de titulación.

MATERIAL DE LABORATORIO:

Tubos de centrifuga graduados 8X75 mm
Pipetas serologicas 5 ml
Vasos de precipitado 100 ml
Matraz Erlenmeyer 125 ml
Tubos de ensayo 12X75 mm
Gradillas
Micropipeta de volúmenes ajustables
Placas de polipropileno, fondo en "U"
Microdilutores calibrados 25 µl
Centrifuga clinica (IEC Centra-4R)
Baño serológico
Congeladores (4, -30 y -80 grados centigrados)
Estufa bacteriológica
Potenciometro (Zeromatic II)

SOLUCIONES Y MATERIAL BIOLÓGICO:

Auletta
CANM
Caolin
Acido tánico
Solución salina de fosfatos pH 7.2 (PBS)
Solución anticoagulante Alsever
Eritrocitos humanos grupo O, Rh positivo
Antígeno de la rubéola

6.1 PRUEBA DE LA INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION

Preparación de la suspensión de eritrocitos tripsinizados

1. Colectar la sangre de cinco donadores voluntarios tipo "O" positivo, mezclandola con Alsever como anticoagulante (ver anexo B).
2. Centrifugar la sangre total a temperatura ambiente a 2000 rpm, durante 20 min.
3. Lavar los eritrocitos tres veces con solución diluyente Auletta (ver anexo B), y preparar una suspensión de eritrocitos al 10%.
4. Agregar 0.1 ml de tripsina al 1% por cada ml de suspensión de eritrocitos al 10%.
5. Dejar reposar a temperatura ambiente durante una hora, agitando con suavidad cada 15 min.
6. Lavar los eritrocitos 3 veces con solución diluyente Auletta, y preparar una suspensión al 10%.
7. Preparar una suspensión de eritrocitos para la prueba al 0.4% de eritrocitos en solución CANN (Ver anexo B). Los eritrocitos así tratados deben ser utilizados en las 48 horas siguientes.

Tratamiento de los sueros problema.

1. En un tubo de ensayo de 12x75 colocar 100ul de suero problema, agregar 300 ul de una suspensión de caolin al 25%. (ver anexo B), mezclar y dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 min agitando 2-3 veces durante este lapso.
2. Centrifugar durante 10 min a 2000 rpm a temperatura ambiente. Pasar el sobrenadante a otro tubo e inactivarlo en un baño serológico a 56°C durante 30 min. Los sueros así tratados quedan diluidos 1:4

Titulación de los anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación

1. Con una micropipeta calibrada a 25ul/gota, colocar una gota de solución de CAHM en cada pozo que se va a utilizar de las placas para microtitulación de fondo en "U".
2. Tomar 25 ul de suero problema tratado previamente, con un microdilutor calibrado a 25 ul, colocarlo en la primera cavidad de la placa y hacer las diluciones hasta el último pozo. Utilizar un suero de título conocido como control.
3. Agregar a cada pozo 25 ul de antígeno conteniendo 4 unidades hemaglutinantes (4UH), mezclar cuidadosamente.

4. Dejar en reposo durante una hora en refrigeración a 4°C.
5. Agregar a cada pozo 50 µl de la suspensión al 0.4% de eritrocitos tripisinizados, mezclar cuidadosamente.
6. Dejar en reposo durante 120 min a 4°C tiempo habitualmente suficiente para una aglutinación completa.
7. Leer la placa e interpretar los resultados, el título corresponde a la última dilución del suero que inhibe totalmente la hemaglutinación.

6.2 PRUEBA DE LA HEMAGLUTINACION PASIVA

6.2.1 Fijación de eritrocitos humanos tipo "O" positivo

1. Colectar la sangre de cinco donadores voluntarios tipo "O" positivo, mezclandola con Alsever como anticoagulante.
2. Centrifugar la sangre total durante 20 min a 2000 rpm a temperatura ambiente.
3. Lavar el paquete celular tres veces con solución salina isotónica (SSI). Ver anexo B. Enfriar el paquete celular a 4°C.
4. Preparar una solución al 1% de glutaraldehido (al 25%) de la siguiente manera: 1 volumen de solución buffer de fosfatos (PBS) de pH 7.2, 9 volúmenes de SSI y 5 volúmenes de agua destilada. Enfriar la solución a 4°C.
5. Utilizando la solución anterior preparar una suspensión de eritrocitos al 2% (v/v). Incubar a 4°C durante 30 min con agitación suave ocasional.
6. Centrifugar a 2000 rpm a Temp. Amb. durante 10 min. Lavar el paquete celular 5 veces con SSI y 5 veces con agua destilada. El volumen de lavado será una décima parte del volumen total. Suspender a una concentración final del 30% en agua dest.

Sensibilización de eritrocitos con el antígeno de la rubéola.

1. Lavar el volumen de células que se van a utilizar, previamente fijadas con glutaraldehído, 5 veces con SSI.
2. Preparar una suspensión de eritrocitos al 2.5% con SSI.
3. Mezclar un volumen de la suspensión celular al 2.5% con un volumen de ácido tánico diluido 1:2000 en SSI (Ver anexo B). Incubar a 37°C durante 15 min.
4. Lavar el paquete celular con PBS (pH=7.2) 3 veces. Resuspender en PBS los eritrocitos hasta formar una suspensión al 50%.
5. Preparar la siguiente mezcla: 0.4 ml de suspensión de eritrocitos al 50%, 0.8 ml de antígeno de la rubéola (Ver anexo B) y 1.1 ml de PBS. Incubar durante 30min a 37°C.
6. Centrifugar a 2000rpm durante 5min. Lavar el paquete celular 2 veces con solución salina y una vez con PBS. El volumen de lavado será la mitad del volumen total.
7. Resuspender las células hasta el 2% en PBS. Conservar a 4°C. Esta suspensión está lista para ser utilizada en la prueba.

Titulación de los anticuerpos

1. Utilizar placas para microtitulación de fondo en "U", limpias y secas.
2. En cada pozo que va a ser utilizado, colocar 25 μ l de PBS con una micropipeta calibrada a 25 μ l/gota.
3. Colocar en el primer pozo 25 μ l de suero problema con un microdilutor calibrado a 25 μ l.
4. Realizar las diluciones del suero pasando los microdilutores de pozo en pozo hasta el último. Usar sueros control en la placa.
5. Agregue a cada uno de los pozos 50 μ l de eritrocitos sensibilizados previamente, con una micropipeta calibrada.
6. Mezclar suavemente, tapar y dejar en reposo durante 30 min. a temperatura ambiente.
7. Leer las placas cuidadosamente, determinando el título de anticuerpos para cada muestra. El título corresponde a la última dilución en que se aprecia claramente la aglutinación de los eritrocitos sensibilizados.

7. RESULTADOS

Las tablas 1 y 2 que se muestran a continuación contienen los títulos de anticuerpos obtenidos por las técnicas IHA y HF en 100 muestras de suero.

En las gráficas 1, 2, 3, 4, 5 y en la tabla No. 6 que se muestran a continuación se observan las proporciones y distribuciones para las técnicas IHA y HF

TABLA NO. 1

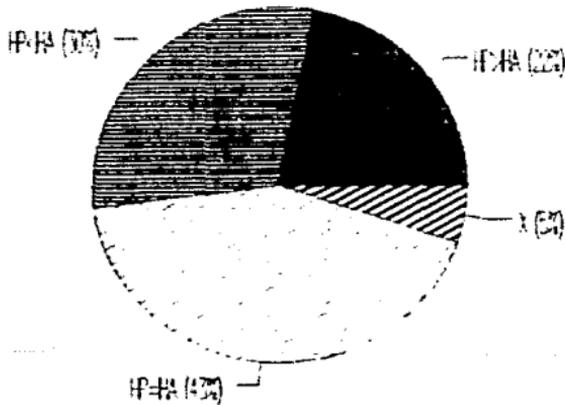
No. muestra	H P	IHA	No. muestra	H P	IHA
1	64	128	26	32	32
2	32	8	27	32	32
3	64	64	28	32	64
4	64	128	29	64	128
5	32	64	30	32	32
6	32	8	31	64	128
7	32	8	32	16	32
8	64	64	33	32	32
9	32	64	34	N	N
10	16	8	35	64	32
11	32	32	36	32	64
12	32	32	37	32	32
13	64	32	38	64	64
14	64	32	39	N	N
15	64	32	40	64	32
16	N	N	41	32	32
17	32	32	42	32	64
18	256	128	43	64	128
19	32	32	44	64	32
20	64	64	45	128	8
21	32	32	46	128	256
22	256	128	47	64	32
23	64	32	48	64	64
24	32	16	49	64	64
25	32	16	50	64	128

TABLA NO. 2

No. muestra	H P	IHA	No. muestra	H P	IHA
51	32	64	76	32	32
52	32	64	77	64	32
53	32	32	78	128	256
54	16	16	79	32	32
55	32	64	80	64	32
56	32	32	81	32	64
57	16	64	82	64	32
58	16	8	83	16	16
59	16	32	84	8	16
60	64	128	85	128	64
61	32	32	86	8	16
62	128	128	87	16	16
63	64	64	88	32	16
64	16	32	89	N	N
65	16	16	90	64	64
66	16	16	91	32	32
67	64	64	92	128	256
68	32	64	93	16	32
69	16	32	94	8	16
70	128	128	95	16	16
71	32	16	96	64	64
72	64	64	97	32	32
73	64	128	98	64	128
74	64	128	99	128	64
75	64	32	100	64	64

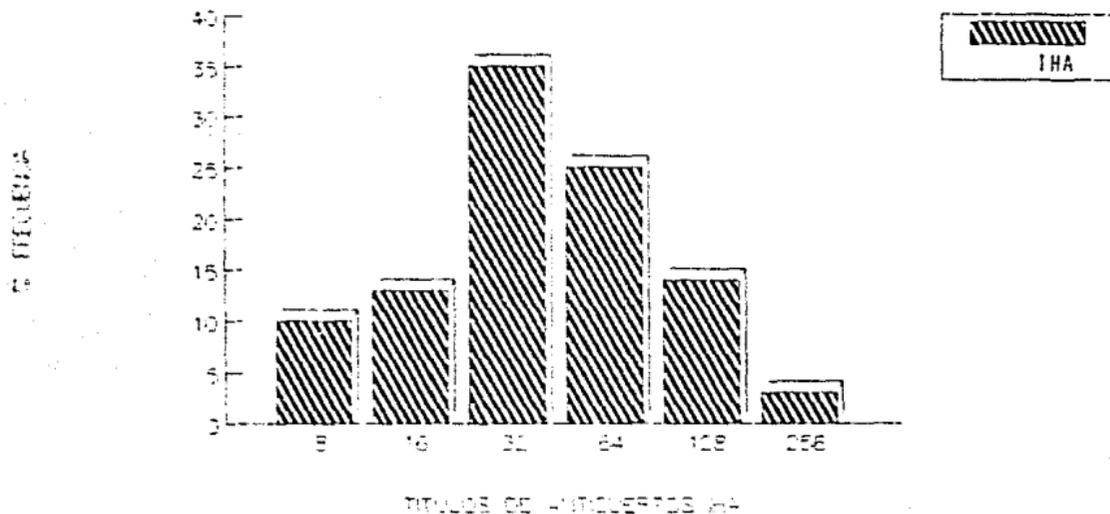
GRAFICA NO. 1

DISTRIBUCION DE LA VARIABILIDAD DE LOS TITULOS HP , IHA

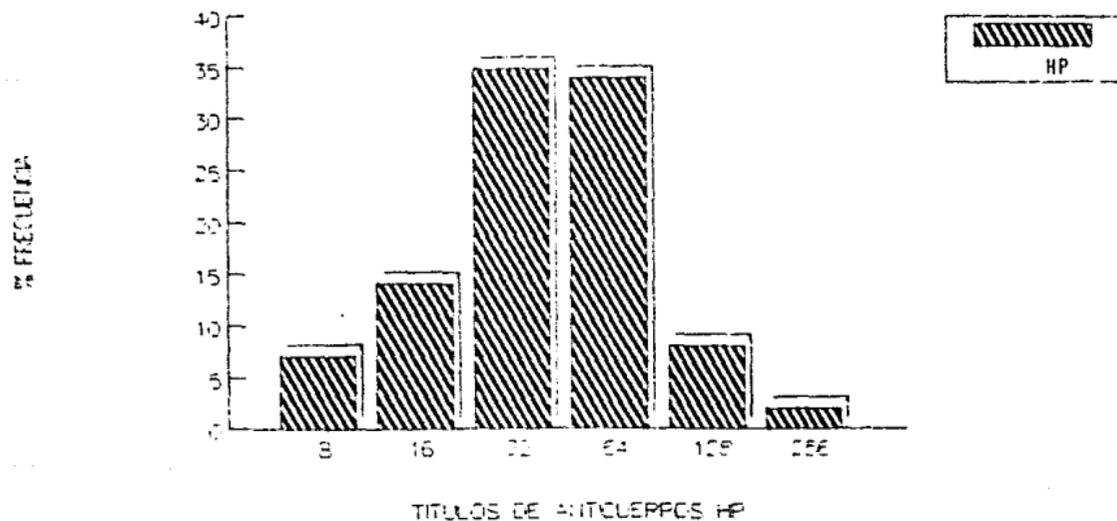


GRAFICA NO. 2

DIST. DE LOS TITULOS DE ANTICUERPOS POR IHA



DIST. DE LOS TITULOS DE ANTICUERPOS POR HP



GRAFICA NO. 4

DIST. DE LOS TITULOS DE ANTICUERPOS POR IHA Y HP

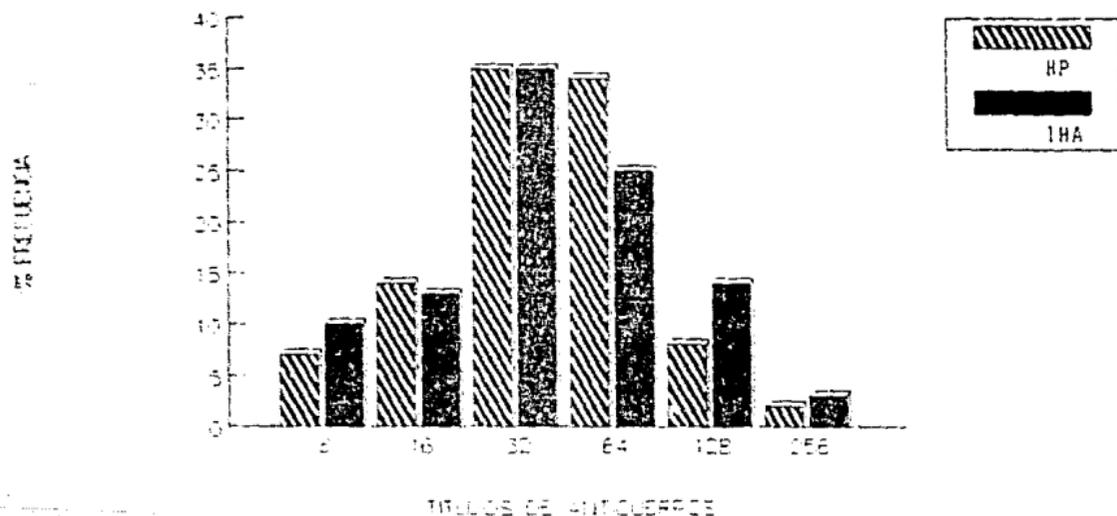


TABLA NO. 5

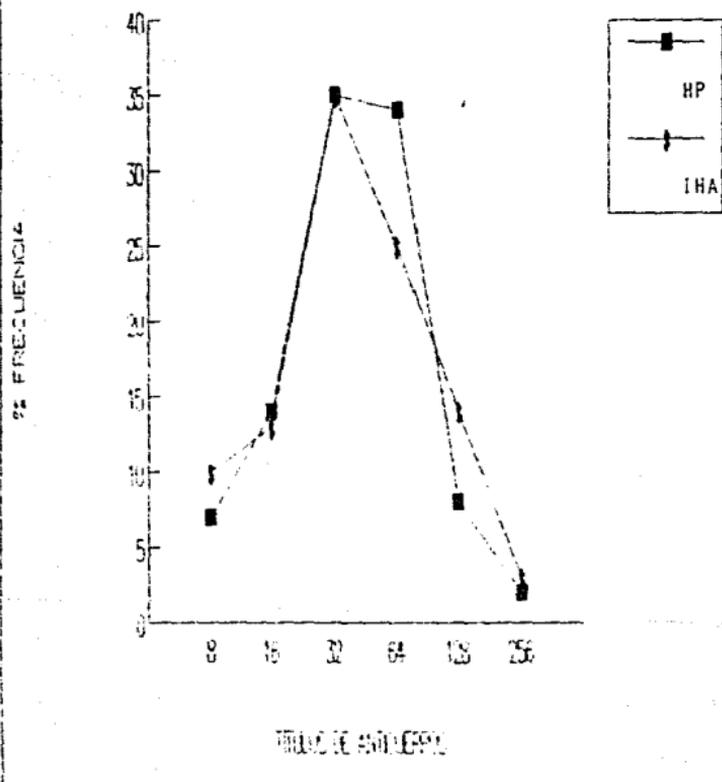
COMPARACION DE LOS TITULOS DE ANTICUERPOS POR LOS METODOS DE IHA Y HRF EN 100 PACIENTES CON SINDROME DE TORCH

TITULOS DE ANTICUERPOS POR HRF

		TITULOS DE ANTICUERPOS POR HRF					
		58	16	32	64	128	N 256
A		7	14	35	34	8	2
TITULOS DE ANTICUERPOS POR IHA	10	10	10	3	0	1	0
	16	10	6	4	0	0	0
	32	35	0	5	19	11	0
	64	35	0	1	9	13	0
	128	14	0	0	0	10	0
	256	0	0	0	0	0	0

A: NO. DE MUESTRAS PARA CADA DILUCION.

DIST. DE LOS TITULOS DE ANTICUERPOS POR IHA Y HP



7.1 COMPROBACION DE LA IGUALDAD DE VARIANZAS UTILIZANDO LA
DISTRIBUCION F DE FISHER

Hipótesis nula $H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$
 Hipótesis alterna $H_A: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$

Parámetros estadísticos obtenidos de los títulos de anticuerpos
por las técnicas de IHA y HP.

PARAMETRO	H P.	IHA
\bar{x}	50.80	55.36
S	42.99	50.26
σ	42.77	50.03
Σx	5080	5536
S^2	1848.14	2528.08
n	100.00	100.00

* Las fórmulas utilizadas en el análisis estadístico se encuentran en el apéndice C

$$\text{Estadígrafo} = F_{\text{calc.}} = \frac{S_1}{S_2} \quad \begin{array}{l} 1=\text{IHA} \\ 2=\text{HP} \end{array}$$

$$F_{\text{calc.}} = 1.40$$

$$g.l. = n-1$$

$$g.l. = 99$$

El valor de F a un nivel de significación del 5%:

$$P < F < 0.05 \quad 0.63, 1.59$$

Intervalo de aceptación:

$$0.63 < F_{\text{calc.}} < 1.59$$

Así pues a un nivel de significación del 5% no es significativamente grande y se acepta la hipótesis nula, es decir que no existe una diferencia significativa en cuanto a precisión. La HP y la IHA son equiparables en cuanto a precisión.

7.2 COMPROBACION DE LA CORRELACION ENTRE LAS TECNICAS IHA Y HP, UTILIZANDO EL COEFICIENTE DE CORRELACION DE PEARSON Y LA ECUACION DE REGRESION.

PARAMETROS ESTADISTICOS OBTENIDOS CON LOS TITULOS DE ANTICUERPOS

PARAMETRO	IHA	HP
SUM X	5526	5060
SUM X ²	567936	441024
SUM XY	417152	417152
SUM X ²	30647246	25806400
MED X	55.26	50.60

Si $X = IHA$ y $Y = HP$ se obtiene lo siguiente:

Coefficiente de Correlacion $r = 0.7$

Pendiente $M = 0.52$

Ordenada al origen $b = 21.76$

Ecuacion de la recta $Y = rX + b$ es decir $T HP = T IHA (m) + b$

Usando la ecuacion anterior

TIT. IHA	TIT. HP
0	20
15	31
32	35
64	55
126	68
255	105
512	206

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

B. DISCUSION DE LOS RESULTADOS

En este trabajo se compararon dos metodos rapidos para la determinación de titulos de anticuerpos especificos contra el antigeno de la rubéola. Las técnicas serologicas que se comparan son ambas semicuantitativas por aglutinación de eritrocitos en placa.

Se trabajo con 100 muestras de suero de distintas procedencias como se indicó anteriormente. todas las muestras fueron analizadas por la técnica IHA y HP. Los resultados obtenidos por ambas técnicas se muestran en las tablas 1 y 2. De los datos de estas tablas se observa la gran similitud entre los titulos de anticuerpos. solo en un porcentaje muy reducido. se observa una diferencia significativa. Un 5% de las muestras dan un titulo mayor a un cuadruple de la dilución que es estadísticamente significativo al analizar una muestra. En la gráfica No. 1 se dan las proporciones de muestras que dan titulos iguales por ambas técnicas (el 43%), titulos menores por HP (30%) el 22% tienen un titulo mayor por HP que por IHA lo cual puede relacionarse con la mayor especificidad de la técnica HP al acoplar el antigeno a los eritrocitos.

Se incluyeron controles negativos y positivos de titulo conocido. se observó que en ausencia de anticuerpos especificos ninguna de las dos técnicas detectó anticuerpos. lo cual indica una baja probabilidad de falsos positivos por reacciones cruzadas o fallas en la seroconversion.

En la grafica No. 2 se observa la distribución de los títulos de anticuerpos por la IHA, de donde se observa que la mayoría de la población tiene anticuerpos protectores contra el virus (73%), son considerados títulos protectores 16, 32, y 64, las muestras con títulos mayores de 64 son de personas con una infección activa, en este caso los títulos 128 y 256 cuyos porcentajes suman el 17%. El 10% restante de esta población corresponde al grupo susceptible con títulos menores de 16 quienes no han sido expuestos, la mayor parte de ellos son mujeres adultas o niños recién nacidos que aun no se han contaminado, algunos con diagnostico de TORCH casos en los cuales es descartada la rubeola congénita.

En la gráfica No. 3 se encuentra la distribución de anticuerpos por la técnica de HRP donde un 83% se refiere a la población con títulos protectores, un 10% a infecciones recientes y un 7% al grupo susceptible.

Con los resultados anteriores se puede decir que ambas técnicas se pueden usar indiferentemente, la grafica No.4 es una comparación de la distribución de anticuerpos por ambas técnicas donde se aprecia mas clara la similitud en los resultados. Se encontró una diferencia de un 7% de pacientes con infección activa, 10% en los títulos protectores y un 3% en el grupo de los susceptibles, estas diferencias son aceptables, como se

demuestra mas adelante, la mayor diferencia se da en el grupo de titulos protectores esto se debe a que existe solo una dilución de diferencia para seleccionar entre una infección activa o no, lo cual puede confirmarse según el cuadro clinico que presente el paciente.

En la tabla No. 5 se han colocado los datos obtenidos por ambas técnicas de una forma mas numerica , obteniendose la siguiente información : La zona sombreada corresponde al rango en que no existe una diferencia estadísticamente significativa, es decir el 95%, los cuales no rebasan los limites de la pruebas estadísticas aplicadas, se observan fuera de esta zona cinco determinaciones las cuales corresponden a 4 muestras que dan titulos mayores por la HP y 1 mas bajo, esto es debido a fallas en la lectura de las placas por una mala aglutinación en una reacción antígeno anticuerpo muy leve, una mayor especificidad de la HP o una hemaglutinación incompleta.

En el caso de la HP se obtuvieron 7 muestras con titulos menores de 8 de las cuales 4 dieron un titulo de 8 tambien por IHA y 3 un titulo de 16 , lo cual es una variación aceptable debido a errores inherentes a la técnica , ocasionados probablemente por una mala lectura de las placas , al criterio al realizar la lectura o bien al realizar las microdiluciones. Por el contrario 10 muestras que por IHA dieron un titulo de 8, 6 son razonablemente aceptables y cuatro de ellas dan un titulo.

dos diluciones más altas por HP, lo cual es estadística y clínicamente significativo en casos de rubéola congénita, dado que de un título no protector se diagnostica una infección reciente o activa lo cual sugiere que alguna aglutinación muy fina no estuvo siendo detectada en el 1% de las muestras realizadas por IHA. Por HP se observaron 7 pacientes no protegidos serológicamente y por la IHA se observaron 10, lo cual sugiere que ambas técnicas tienen una sensibilidad aceptable por comparación, como puede verse en la gráfica No. 6, se esperaba encontrar datos más deducibles en cuanto a sensibilidad por el dato teórico de una mayor detección de anticuerpos por la HP, al eliminar el problema de los inhibidores específicos. No obstante es recomendable diseñar un estudio más amplio de ambos métodos y corroborar los resultados obtenidos en este trabajo en cuanto a sensibilidad.

Al realizar el análisis estadístico usando la distribución F de Fisher para valorar el punto crítico al 5% se obtuvo que no existe diferencia significativa en cuanto a precisión por comparación de sus varianzas. El coeficiente de correlación encontrado para estas técnicas es de 0.7, esto significa que el 70% de el título encontrado para un suero por alguna de estas dos técnicas será justificado por la otra, esto es aceptable prácticamente dado que por estos métodos se aceptan resultados con variaciones de una dilución seriada al doble sin importancia diagnóstica. Lo anterior se demuestra al determinar los títulos

de anticuerpos HP a partir de los títulos IHA usando la ecuación obtenida para el sistema y observar la tabla de resultados No.5 que ilustra la recta que forman los resultados en un intervalo definido.

Es muy importante mencionar las diferencias en cuanto a ahorro de tiempo en la elaboración de las pruebas por la técnica de la HP, dando un diagnóstico confiable en menor tiempo sobre todo en casos tan importantes como el diagnóstico de rubéola congénita, lo cual es un objetivo fijo del equipo médico, esta ventaja es preferible ante cualquier otra técnica más tardada que implique un retraso en entregar los resultados. La técnica de la HP también dió un mayor número de muestras con títulos menores, lo cual indica que la técnica IHA posee mayor sensibilidad, debido a algunas interferencias en la detección lo cual se anula al poner en contacto el suero directamente con eritrocitos sensibilizados al antígeno específico.

Cabe recordar que la lectura de las placas de aglutinación se realiza por observación directa sin la ayuda de algún aparato detector que registre el grado de aglutinación dando una lectura más confiable y más reproducible al ejecutar las técnicas, por lo tanto las variaciones están directamente relacionadas con el químico que las lee cuyo adiestramiento debe ser refinado. Las diferencias entre lecturas por diferentes químicos no debe ser mayor de una dilución.

9. CONCLUSIONES

Aun cuando en nuestro país no han sido registradas epidemias de importancia, no es improbable que pueden ocurrir si llega a alcanzarse una acumulación crítica de individuos susceptibles. Se enfatiza la importancia de prevenir la infección por el virus de la rubéola en la mujer antes del embarazo ya sea por medio de la vacunación de todas las jóvenes o por la detección de susceptibles a través de un método serológico sencillo y barato como el de la hemaglutinación pasiva, seguida de la vacunación de mujeres seronegativas.

La prueba de la hemaglutinación pasiva reflejó resultados equiparables con la prueba de la inhibición de la hemaglutinación en cuanto a sensibilidad, especificidad, y precisión.

Las ventajas que presenta la prueba de la hemaglutinación pasiva son:

a. Ahorro significativo de tiempo lo cual implica que el médico pueda dar un diagnóstico confirmativo más rápido, que le permita tomar decisiones bien reforzadas en corto plazo.

b. Posibilidad de almacenar durante mayor tiempo los eritrocitos utilizados en esta prueba. Con ello se evita la

necesidad de conseguir sangre fresca continuamente implicando con ello todo el tratamiento previo para su uso.

c. Posee un patrón de lectura más claro. La aglutinación que se observa en la prueba de la inhibición de la hemaglutinación es muy fina lo cual requiere una mayor atención en la detección de la aglutinación.

d. La reacción inmunológica se lleva a cabo a temperatura ambiente, la aglutinación que se presenta es muy clara hasta la última dilución que se presenta, y casi tan rápido como se prepara sin tener que dar tiempos de refrigeración de 2 horas como en la inhibición de la hemaglutinación.

ANEXO A.

ABREVIATURAS.

TORCH.	Toxoplasma, Otros, Rubéola, Citomegalovirus, Herpes.
ECP	Efecto Citopático.
RNA	Acido Ribonucleico.
nm	Nanometro.
PM	Peso Molecular.
S	Unidad Sververg.
pH	Potencial de Hidrogeno.
IgM	Inmunoglobulina Clase M.
IgG	Inmunoglobulina Clase G.
HP	Hemaglutinación Pasiva.
IHA	Inhibición de la Hemaglutinación.
GR	Globo Rojo.
EEE	Encefalitis Equina del Este.
VEE	Encefalitis Equina
WEE	Encefalitis Equina del Oeste.
GCH	Gonadotropina Coriónica Humana.

ANEXO B. PREPARACION DE SOLUCIONES

Auletta (diluyente)

Formula:	NaCl	0.2g
	CaCl ₂ (anh.)	0.1g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1g
	H ₂ O (dest.)	cbp 100ml

CANH

Fórmula:	Albumina bovina	2.5g
	H ₂ O (dest.)	250ml
	Aforar con diluyente Auletta a 1L.	

Caclín: Suspensión al 25% en borato salina, ajustar el pH a 9.0

Acido tánico: Solución diluida 1:2000 (p/v) en SSI

SSI. Solución salina isotónica. Solución al 0.65% de cloruro de sodio en agua destilada.

PBS (solución amortiguadora de fosfatos)

Formula:	NaCl	8g
	KCl	0.2g
	Na ₂ HPO ₄	1.15g
	KH ₂ PO ₄	0.2g

Aforar con agua destilada a 1L. M=0.15

Ajustar el pH a 7.2

Alsever (anticoagulante)

Fórmula:	Dextrosa	20.5g
	NaCl	4.2g
	Ac. cítrico	0.55g
	Citrato de sodio	8.0g

Aforar con agua destilada a 1L

Esterilizar en autoclave a 15 Lb durante 20 min.

Antígeno: Preparación en células BHK-21. Titulación por hemaglutinación en placa.

ANEXO C

1. Pendiente de la Recta de Regresión (m)

$$m = \frac{N (\Sigma XY) - (\Sigma X)(\Sigma Y)}{N \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}$$

2. Intercepto (b)

$$b = \frac{(\Sigma Y)(\Sigma X^2) - (\Sigma X)(\Sigma XY)}{n \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}$$

3. Coeficiente de Correlacion (r)

$$r = \frac{\Sigma X_i Y_i - n \bar{X} \bar{Y}}{\sqrt{(\Sigma X_i^2 - n \bar{X}^2)(\Sigma Y_i^2 - n \bar{Y}^2)}}$$

4. Media \bar{X}

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

5. Desviación Estandar Muestral (S)

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

6.. Prueba de F para la comparación de la Precisión de dos Métodos

Prueba de Hipótesis:

$$H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

$$H_A : \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$$

Estadístico de Contraste

$$F_p = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

11. BIBLIOGRAFIA

1. Mendez Oteo Francisco; Microbiologia Medica Tomo I, Comité editorial Fco. Mendez Oteo, Mex. D.F. 1982, 188-230.
2. Kimbal P.C. Heinz-Fraenkel-Conrat; Virology 2da. edición . edit. Prentice Hall, New Jersey 1988, 96-101.
3. Ryle; W.M., Mogabgab J.W. Manual de enfermedades infecciosas. Edit. Interamericana; Mex. 1985, 225-257.
4. Sosa S.M., Magaña M.M. Encuesta de anticuerpos contra la rubéola en estudiantes universitarias. Bol. Med. Hosp. Infant. 1974; 31(6), 1165-1170.
5. Marquez A. T., Zapata M. Comportamiento Epidemiológico de la rubéola en la provincia de Cordoba, Argentina Bol. of Sanit. Panam. 1984, 97 (1); 14-21.
6. Kumate J., Guitierrez G. Manual de Infectología 10a. Ed. Edit. Fco. Mendez Cervantes. Mexico, 1984, 247-254.
7. Fenner F., White D. D. Virologia Médica 2da. Ed., Edit. La Prensa Médica Mexicana México 1981, 411-420; 253-263.

8. Rhodes A. J. Tratado de Virologia Ediciones Toray. Barcelona 1972, 775-787.
9. Davis, Dulbbeco Microbiologia 3ra. Ed., Edit. Salvat México 1982.
10. Torroella J. M. Rubéola Congénita Bol. Med. Hosp. Infant (Mex) 1969, 26 (1), 43-48
11. Paul C. R., Hobbs J. S. Evaluation of a New Test System for Rubella Haemagglutination Inhibiting Antibodies. J. Clin. Path. 1977, 30, 1011-1014.
12. Schmidt N. J., Dennis J. Modified Hemagglutination-Inhibition Test For Rubella Employing Human Group O Erythrocytes Appl Microbiol. 1972, 23 (3) 471-475.
13. Bowden D. S., Westaway E. G. Rubella Virus : Structural and Non-Structural Proteins J. Gen. Virol. 1984, 65, 933-943.
14. Kalkkinen N., Oker-Blom C. Three Genes Code for Rubella Virus Structural Proteins E-1, E-2a, E-2b and C. J. Gen. Virol. 1984, 65, 1549-1557.

15. Trudel M., Nadon F. et.al. E-1 Glycoprotein of Rubella virus carries an epitope That binds a neutralizing antibody J. Virol Methods 1985, 12 , 243-250.
16. Lennette H. E., Schmidt J. N. Diagnostic procedures for: viral Rickettsial and Chlamydial infections. 5a. Ed., Edit. American Public Health Association. Washington D.C. 1979.
17. Behrman R. E., Vaughan V. C. Tratado de pediatria Tomo I 12a. ed., Edit. Interamericana Mexico, 1988, 772-774.
18. Maas E. M., Ovseyevitz J., et.al. Anticuerpos IgM e IgG Antirubeola en Cardiopatía Congénita. Arch. Inst. Cardiol. Mex. 1985, 55; 129-132.
19. Aponte L. J. N., Mendoza E. J., et.al. Hallazgos Cardíacos en pacientes con embriopatía rubeólica. Arch. Dom. Ped. 1987, 23; 101-104.
20. Jaquez G. M., Acevedo R. M. et.al. Epidemiología y hallazgos clínicos en la madre y el niño afectados por rubeola. Arch. Dom. Ped. 1987, 23; 89-93.
21. Mendoza H., Koenig E. et.al. Prevalencia de anticuerpos para la rubeola en niños. Arch. Dom. Ped. 1987, 23; 99-100.

22. Morgan C. P., Hodgson J., et.al. Detection of rubella specific IgM in subclinical rubella reinfection in pregnancy. Lancet. 1985.
23. Terry G. M., Warren R. C., et.al. First Trimester prenatal diagnosis of congenital rubella: a laboratory investigation. British Medical Journal. 1986. 292: 930-933.
24. Rubella Prevention M M W R. JAMA. 1984. July 13. 252 (2): 192-195.
25. Craig C., White M. D., et.al. Benefits, Risks and costs of immunization for measles, Mumps and Rubella. AJPH. 1965. 75 (7): 739-744.
26. Pumarola A., Salieras L., et.al. Situacion inmunitaria de la situacion infantil de 1-2 años de edad vacunada con vacuna triple vírica (SRP en condiciones ordinarias de aplicacion. Arch. Pediat., 1986. 39. 217-222.
27. López J., Mendoza H. Síndrome rubeólico congénito. Arch. Dom. Pediat., 1987. 33 (3): 95-98.
28. Munre N. D., Smithells R. W., et.al. Temporal relations between maternal rubella an congenital defects Lancet. 1987

29. Leads from the M M W R Rubella and Congenital Rubella JAMA 1983. Oct. 28; 250 (16). 2104-2106
30. Lead from the M M W R. Rubella in Colleges. JAMA .1985 May 17; 253 (19); 2620-2627.
31. Stites P. D.; Stobo D.J.; Fudenberg H.H. Inmunología básica y clinica. 5a. Ed. Edit. El manual moderno, México 1985.
32. Youmans G. P.; Paterson P. Y.; Sommers H. M. Infectología clinica. 2a. Ed. Edit. Interamericana. México 1982.
33. Barret T. J. Inmunología . 4a Ed. Edit. Interamericana México, 1985.
34. Roitt I. M.; Male K. D.; Inmunología. Edit. Medsi. Barcelona España 1986.
35. Quirin E. P.; Nelson D. B. Use of Trypsin-Modified Human Erythrocytes in Rubella Haemagglutination-Inhibition Testing Applied Microbiology Sept. 1972. 24 (3); 353-357.
36. Rose N. P., Friedman H. El laboratorio de Inmunología Clínica. 2a Ed. Edit. Panamericana Mexico 1987.

37. Skendzel L. P.; Kenneth M. D. et.al. Evaluation of Assays for the detection of Antibodies to Rubella. A report based on data from the College of American Pathologists Surveys of 1982. A.J.C.P. Oct. 1983 (4); 594-598.
38. Wielaard A. D.; Elleswijk J. V. et. al. Clinical Validation of and Antibody-Capture Anti-Rubella IgM-Elisa. J. Virol. Methods 1985, 10, 349-354.
39. Kleeman K.T.; Kiefer D. J.et. al. Rubella Antibodies Detected by several commercial Immunoassays in Hemagglutination Inhibition Negative sera. J. Clin. Microbiol. 1983, 18 (5); 1131-1137.
40. Steece R. S., Talley S. M. et.al. Comparison of Enzyme Linked Immunosorbent Assay Hemagglutination Inhibition, and Passive Latex Agglutination for determination of Rubella Immune Status. J. Clin. Microbiol. 1985, 21 (1); 140-142
41. Aullea E. A., Gitnick G. L., et. l. An Improved Diluent for Rubella Hemagglutination and Hemagglutination-Inhibition Test J. Clin. Pathol. 1968, 16 (5); 691-694.
42. Cremer N. E., Haegens J. S. Improved serological Diagnosis of Rubella. 1983, 18 (3); 743-744.

43. Cubie H., Edmond E. Comparison of five Different Methods of Rubella IgM antibody Testing J. Clin Pathol. 1985, 38; 203-207.
44. Linde G. A. Subclass Distribution of Rubella Virus-Specific Immunoglobulin G. J. Clin. Microbiol. 1985, 21 (1); 117-121.
45. Murray H., Stanton J. et. al. Study of Discrepancies in Rubella Haemagglutinin Titrations and a Reappraisal of Diluents used in the Rubella Haemagglutination Inhibition Technique. J. Clin Pathol. 1985, 38 ; 198-202.
46. Schmidt N. J.; Dennis J. et. al. Rubella Virus Hemagglutination, with a wide variety of Erythrocyte Species. 1971, 22(3); 469-470.
47. Ankerst J., Kjellén L. et. al. A routine Diagnostic Test for IgA and IgM antibodies to Rubella Virus Absorption of IgA with *Staphylococcus aureus*. 1974, 133 (3); 258-273.
48. Madsen R. D., Coates S. R. Reactivity of Non Sensitized Control Erythrocytes in Rubella Passive Hemagglutination Assays. J. Clin. Microbiol. 1985, 18 (3); 749-750.

49. Maes R. K., Hayes M. M. et. al. Cryopreserved Erythrocytes in clinical Laboratory Hemagglutination and Hemagglutination Inhibition Test. J. Clin. Microbiol. 1985, 22 (4); 659-661.

50. Leads from the M M W R . Rubella and Congenital Rubella Syndrome. JAMA 1984, 252 (15); 1995-1996.

51. Banatvala J. E., Brown D. et. al. Coxsackie B. Mumps, Rubella, and Cytomegalovirus Specific IgM, Responses in Patients with Juvenile-onset insulin Dependent diabetes Mellitus in Britain, Austria and Australia. Lancet. 1985, Jun 22; 1409-1412.

FE DE ERRATAS

En el título de la portada dice:

Hemaglutinación Reversa Pasiva.

y debe decir:

Hemaglutinación Pasiva.