

# UTILIZACION DE HEMATIES DE PRIMATES SUDAMERICANOS EN LA PRUEBA INHIBICION DE HEMAGLUTINACION PARA EL DIAGNOSTICO DEL VIRUS DEL SARAMPION

Palacios, Rosa<sup>1</sup>; Montoya, Enrique<sup>2</sup>; Torres, Ivonne<sup>1</sup>; Ortiz, Ana Cecilia<sup>1</sup>

## RESUMEN

La utilidad del empleo de hematíes de especies sudamericanas de primates no humanos durante pruebas de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación con virus sarampión ha sido evaluada. El estudio se llevó a cabo en 18 meses, habiéndose iniciado a fines de 1995 y terminado a comienzos de 1997.

Se obtuvo muestras de sangre de primates en solución citratada, en la sede del Instituto de Investigaciones Tropicales y de Altura en Iquitos (IVITA) y en el Parque de las Leyendas en Lima; el procesamiento se realizó en el Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud. Se analizaron muestras de 22 primates de 8 especies de la Amazonía peruana, probándolos en paralelo con hematíes patrón de monos *Rhesus* y *Cercopithecus*, por hemaglutinación con antígeno purificado de virus sarampión. Las especies *Saimiri boliviensis peruvianus* y *Sanguinus mystax* exhibieron afinidad hemaglutinante con el virus, siendo ésta parcial o incompleta y no persistente, con elusión espontánea a los 30 minutos. Se hizo ensayos de inhibición de hemaglutinación con sueros pareados de personas que estuvieron con infección sarampiónosa 10 a 15 días antes de obtener la segunda muestra. No se recomienda su empleo rutinario durante encuestas serológicas por IHA, dados los sesgos en lecturas e interpretación que podrían presentarse.

Palabras claves: Hematíes, primates, hemaglutinación, sarampión.

## ABSTRACT

The usefulness of red blood cells (rbc) of south-american non-human primates in hemagglutination and the hemagglutination inhibition with measles virus was evaluated in an 18 months study finished at the earlier's in 1997

Primate blood samples were obtained in a citrated solution at the Instituto de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA) in Iquitos, and at the Parque Las Leyendas Zoo in Lima. Samples obtained from 22 monkeys of 8 different species from the Peruvian Amazon Region were tested in parallel with standard rbc of *Rhesus* and *Cercopithecus* monkeys through hemagglutination with measles virus purified antigen. Rbc of the species *Saimiri boliviensis* and *Sanguinus mystax* showed hemagglutinant affinity with the virus, being this partial or incomplete and nonpersistent, with spontaneous elution after 30 minutes. Hemagglutination inhibition assays were performed with paired sera samples obtained from patients suffering measles infection with a 10 to 15 days interval. The utilization of Peruvian non-human primates rbc in IHA used for serological surveys is not recommended due to the possible biases in reading and interpretation of results.

Key words: Red blood cells, primates, hemagglutination, measles.

## INTRODUCCION

La necesidad de contar con una técnica simplificada para estudios de preva-

lencia de anticuerpos al sarampión, que pueda aplicarse en trabajos de campo y con reducidos costos impulsó la idea de utilizar hematíes de primates del Perú en pruebas de inhibición de la hemaglutinación para el diagnóstico de sarampión. Los propósitos generales de la investiga-

<sup>1</sup> Laboratorio de virus inmunoprevenibles. Centro Nacional de Laboratorios de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, A.P. 451, Lima, Perú

<sup>2</sup> IVITA - Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Iquitos - Perú.

gación han sido estudiar la factibilidad del empleo difundido de una técnica sencilla, de alta especificidad y bajo costo para el diagnóstico del sarampión, posibilitando el empleo de recursos naturales del país aplicados al área de la salud pública.

La hemaglutinación es una prueba biológica que aprovecha la característica estructural y fisiológica del virus sarampión para evidenciarlo e identificarlo preliminarmente en ensayos sencillos y prácticos de laboratorio y para cuantificarlo con el propósito de ser utilizado en pruebas rutinarias de laboratorio; para ello se requiere contar con los hematíes de los primates correspondientes<sup>1</sup>.

Las pruebas de hemaglutinación (HA) e inhibición de la hemaglutinación (IHA) utilizadas desde los comienzos de la moderna virología aprovechan la particular capacidad del virus de unirse a la membrana de los eritrocitos de ciertas especies de primates y su contraparte serológica lo utiliza como un índice de reactividad para la evaluación de niveles de anticuerpos<sup>2, 4, 5</sup>.

Aún cuando se considera de baja sensibilidad relativa en comparación a pruebas de inmunoensayo y neutralización, se le utiliza en valoraciones de tamizaje durante estudios epidemiológicos por su buen nivel de especificidad.

Los objetivos principales del estudio fueron:

- Validar el empleo de hematíes de especies de primates no humanos de la región amazónica peruana en pruebas de hemaglutinación para titulación de virus sarampión.

- Estandarizar las pruebas de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación para virus sarampión, empleando hematíes de especies de primates de la Amazonía peruana comparándolas con hematíes patrón.

- Validar el uso de hematíes de especies de primates no humanos durante encuestas serológicas por prueba IHA.

- Estudiar la caracterización de receptores presentes en la membrana de los hematíes utilizados.

## MATERIALES Y METODOS

Se preparó antígeno de virus sarampión a partir de una cepa vacunal Enders Lote 2, 1964, existente en el laboratorio propagada en cultivo celular VERO (riñón de mono verde *Cercophitecus aethiops*) con un título neutralizante de  $10^{3.2}$ . Se empleó el método por gradiente de densidad de sucrosa para la purificación y concentración de antígeno. También se utilizó antígeno crudo obtenido de lisado de cultivos celulares infectadas con virus vacunal.

Se utilizó hematíes de 22 individuos pertenecientes a 8 especies distintas: *Aotus sp.*, *Aotus nancymae*, *Lagotrix lagotrichia*, *Saimiri sciureus macrodon*, *Saimiri boliviensis peruvianus*, *Saimiri sp.*, *Saguinus mystax* y *Saguinus fuscicollis*.

Los hematíes patrón fueron obtenidos por gestiones ante el Patronato del Parque de Las leyendas, en donde se crían monos de las especies *Maccacus rhesus* y *Cercophitecus aethiops*, la obtención de sangre, estuvo a cargo de personal calificado de las respectivas instituciones. Se hizo por punción venosa, previa aplicación de Ketalar® como tranquilizante obteniéndose de 2 a 4 mL de sangre total en tubos con solución anticoagulante estéril.

El transporte se hizo en condiciones de frío moderado y protegidas de acción mecánica. Se realizó la prueba de hemaglutinación por micrométodo empleando volúmenes a la décima. Las lecturas a la hora de incubación a 37°C.

Para hematíes de referencia se observa estabilidad de la reacción a 4°C hasta por 12 hrs.

Se hizo la prueba de inhibición de hemaglutinación a 40 sueros previamente probados por ELISA con IgG comercial. 20 de ellos pareados. El procedimiento incluyó tratamiento para remoción de inhibidores no específicos y aglutininas no específicas.

## RESULTADOS

En las tablas 1 y 2, se presentan los resultados obtenidos en las pruebas realizadas. La concentración del antígeno con sucrosa incrementa en 35% el rendimiento con relación al antígeno crudo según se deduce de los títulos obtenidos.

Se encontró satisfactorio el manejo de las variables independientes: concentración del antígeno. Es necesario aún efectuar mayores ajustes para las variables suspensión de hemáties y temperatura de incubación.

En primera instancia se observó afinidad hemaglutinante diversificada para con hemáties de varias de las especies ensayadas: *Aotus nancymae*, *Saimiri boliviensis peruvianus* y *Saimiri sciureus macrodon*, y ligeramente para *Lagothrix*. En una segunda etapa, y en presencia de hemáties de referencia de *Maccacus rhesus* y *Cercopithecus aethiops*, se encontró reproducibilidad únicamente para *Saimiri*: además también la especie *Saguinus* exhibió afinidad; motivo por el que en un tercer ensayo se probaron las especies *Saimiri sciureus macrodon*, *Saimiri boliviensis peruvianus* y *Saguinus mystax*, observándose afinidad, con elusión espontánea prematura, lo cual sugiere que la cinética de hemaglutinación sigue otro.

## DISCUSION

Se ha reportado<sup>17</sup> que recientes aislamientos del virus sarampión no aglutinan hemáties de mono verde africano. Asimismo se ha observado disminución de la capacidad hemaglu-

tinante después de varios pasajes en células VERO. En un estudio<sup>22</sup> se hizo una prueba de inmunofluorescencia de la membrana de las células infectadas, revelando que la disminución de la actividad de unión a los hemáties del mono verde africano no se debía a variaciones en la expresión de la proteína hemaglutinina sobre la superficie celular, sino a la existencia de otra proteína viral diferente que contribuye a la unión del virus sarampión a los hemáties del mono verde africano y que probablemente funcione también para otras especies de hemáties. En el caso de nuestra cepa, la capacidad hemaglutinante del virus, exacerbada por procedimientos de purificación de antígeno<sup>19</sup>, es indudable.

La identificación para la unión hemaglutinina viral-receptor del hematíe se da a nivel de la molécula CD46 o proteína cofactor de membrana, ligada al complemento<sup>12</sup>, ausente en hemáties de humanos pero presente de manera análoga en los hemáties de primate, las variaciones en la glicosilación del carbohidrato de esta glicoproteína generará las diferencias en la afinidad para la unión reactiva. Para los primates peruanos ésta se ha presentado de manera diversificada e inestable, probablemente debido a las diferencias en la distribución de la molécula análoga al CD46 que se encuentra en las superficies celulares de las diversas especies de hemáties de primates<sup>5</sup>.

Las lecturas deben realizarse en un máximo de una hora a 37°C, observándose importantes cambios en los patrones de aglutinación a tiempos mayores de incubación a la misma temperatura, las pruebas de inhibición de la hemaglutinación (IHA) para sueros simples o pareados detectan anticuerpos totales y esencialmente indican infección pasada o contacto previo con virus vacunal o salvaje por parte de los individuos muestreados<sup>1</sup>.

El empleo de sueros pareados tiene significado diagnóstico para infecciones activas.

Habiéndose trabajado con un número escaso de muestras, cuarenta sueros comprobadamente positivos, negativos o con valores límite de anticuerpos a sarampión, mediante pruebas ELISA IgG, hallan su validez básicamente como instrumentos para evaluación de la utilidad de los hematíes durante pruebas IHA, en lugar de servir para estimaciones estadísticas.

Se han observado ciertas reacciones inespecíficas para algunos de los sueros ensayados con hematíes de *Saimiri* y *Sanguinus* posiblemente ocasionadas por pretratamiento insuficiente, evento que se presenta en muy pocos casos.

Los títulos IHA para los sueros probados fueron relativamente bajos, comparativamente con los resultados por ELISA, mas aún al emplear los hematíes de prueba, observándose reproducibilidad de los resultados en las lecturas IHA para casos de positivos fuertes y claramente negativos, lo cual verifica su buena

especificidad dentro de los valores límites, pero se encuentran faltas de sensibilidad.

### CONCLUSIONES

El presente estudio ha ratificado la utilidad de los hematíes de monos del viejo mundo, mantenidos en cautiverio, de las especies *Maccacus rhesus* y *Cercopithecus aethiops*, y ha despertado la expectativa para su utilización rutinaria. En cuanto a la utilización de los hematíes de las especies peruanas de primates de la Amazonía, se considera posible, ya que se ha observado afinidad, aunque inestable, predominando los patrones de hemaglutinación parcial o incompleta, lo cual puede ser debido a la escasa, desigual o limitada distribución de los receptores CD46 u otros análogos en las membranas celulares de estos eritrocitos. En condiciones controladas de tiempo de vida media de la unión hemaglutinante (según cinética) de hemaglutinación, pueden ser utilizadas en pruebas de titulación de antígeno sarampión, mas no en pruebas de inhibición de hemaglutinación porque cabe la posibilidad de captar falsos negativos en casos de valores límite.

Tabla 1. Cuadro resumen consolidado de resultados de la prueba IHA para 40 sueros en 4 ensayos

Hematíe de mono	Títulos de los sueros													
	< 1:10		< 1:20		< 1:40		< 1:80		< 1:160		< 1:320		< 1:640	
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
<i>C. aethiops</i>	19	47,5	0	-	5	12,5	5	12,5	6	12,5	6	15,0	0	-
<i>M. rhesus</i>	19	47,5	0	-	5	12,5	5	12,5	7	17,5	4	10,0	0	-
<i>S. boliviensis peruvianus</i>	20	50,0	1	2,50	11	27,5	6	15,0	2	6,0	0	-	0	-
<i>S. mistax</i>	19	47,5	3	7,50	16	37,5	3	7,5	0	-	0	-	0	-

**Tabla 2. Prueba de inhibición de Hemaglutinación para detección del virus del sarampión utilizando hemáties de mono: efecto de las diluciones del antígeno viral**

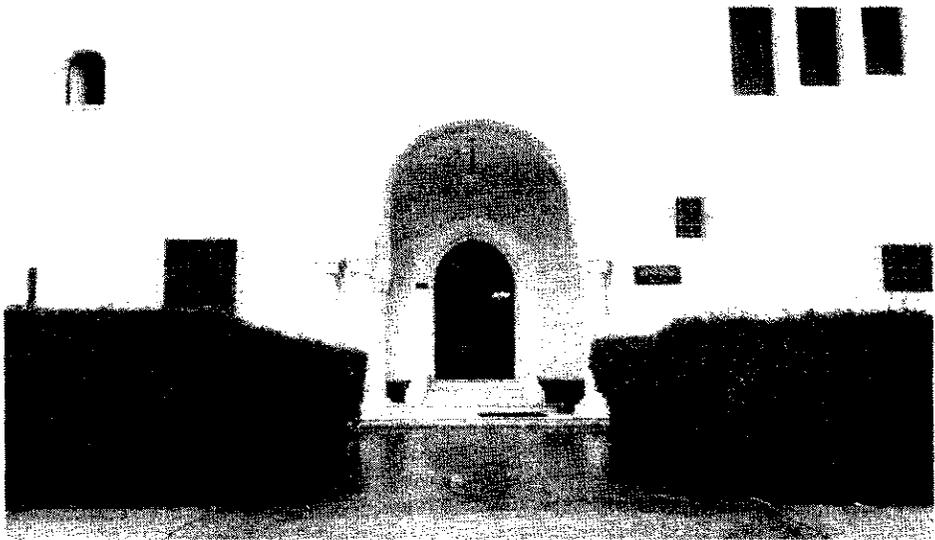
Hemáties de mono	Diluciones del Antígeno Sarampión purificado					
	S/D	1/2	1/4	1/8	1/16	CC
<i>C. aethiops</i>	+	+	+	(+)	(+)	0
<i>S. scireus macrodon hembra código 34</i>	(+)	0	0	0	0	0
<i>S. scireus macrodon hembra código 200</i>	(+)	0	0	0	0	0
<i>S. boliviensis peruvianus código 302</i>	+	(+)	(+)	(+)	0	0
<i>S. mystax macho código 159</i>	+	(+)	(+)	(+)	0	0
<i>S. boliviensis peruvianus hembra código 75</i>	(+)	0	0	0	0	0
<i>S. scireus macrodon hembra código 25</i>	(+)	0	0	0	0	0
<i>S. mystax hembra código 3906</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	0
<i>S. mystax macho código 3939</i>	+	(+)	(+)	0	0	0
<i>S. boliviensis peruvianus macho código 1491</i>	+	(+)	(+)	(+)	0	0
<i>S. boliviensis peruvianus hembra código 50</i>	+	(+)	(+)	(+)	(+)	0
<i>M. rhesus</i>	+	+	+	+	+	(+)
<i>S. scireus macrodon macho código 20</i>	(+)	(+)	0	0	0	0
<i>S. boliviensis peruvianus macho B253</i>	(+)	0	0	0	0	0

+ : Positivo para Hemaglutinación  
 0 : Negativo para hemaglutinación  
 (+) : Debilmente Positivo

### BIBLIOGRAFIA

- Black FL. Measles active and passive immunity in a worldwide perspective. Prog. Med. Virol. 1989; 36: 1-33
- Brunnel, Phillip A. Measles control en the 1990s: Measles serology. WHO/EPOI/GEN/90.4.
- Cutts Ft., Henderson RH, elements CJ, Chen RT. Principles of measles control. Bulletin WHO, 1991;
- Davis B. & Dulbecco R. Tratado de Microbiología. Cap. Virología, 3ra. ed. 1985.
- Dorig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Ed-monston strain). Cell 1993; 75:295-305.
- Evaluación del Proyecto Peruano de Primatología Manuel Moro Sommo, Iquitos-Perú, 1992.
- Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Virology, Cap. 43, 3ra Ed., Pha. New York, 1996.
- Gershon AA & Krugman S. Measles virus. In: Lennette EH & Schmidt NS. Editors. Diagnostic procedures for viral and rickettsial infections, 5th Ed. N. Y. APHA, 1979, p. 665-93.
- Hierholzer Jhon C. and Morris T. Suggs. Standardized viral hemagglutination and hemagglutination inhibition test. Applied Microbiology, Vol. 18, no. 5, 1969.
- Kalter SS, Heberling RL & Barry JD. Detection and titration of measles virus antibody by hemagglutination inhibition and by dot immunobinding. J Clin Microbiol 1991, 29: 202-204.

- 11 Krah DL. Receptors for binding measles virus on host cells and erythrocytes. *Microbiol Pathogenesis* 1991; 11: 221-228.
- 12 Liszewski MK, Atkinson JP. Membrane cofactor protein. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1992; 178:7-60.
- 13 Naniche D, Wild TF, Rabourdin-Combe C, Gerlier D. A monoclonal antibody recognizes a human cell surfac glycoprotein involved in virus binding. *J Gen Virol* 1992; 73: 2617-2624.
- 14 Nickells MW, Atkinson JP. Characterization of CR1-and membrane cofactor protein-like proteins of two primates. *J. Immunol* 1990; 144:4262-4268.
- 15 Norrby E. Hemagglutination by measles virus. *Arch Ges Virusforsch* 1962; 12:164-172.
- 16 Norrby E. Hemagglutination by measles virus. 4. A simple procedure for production of high potency antigen for hemagglutination inhibition test. *Proc Soc* 1962; 11:814-818.
- 17 Saito H, Sato H, Abe M. et al. Isolation and characterization of measles virus strains with low hemagglutination activity. *Intervirolgy* 1992; 33:57-60.
- 18 Schmidt NJ, Emmons RW. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. 6th ed. N.Y. APHA. 1989.
- 19 Shibahara K, Hotta H, Katayama Y, Homma M. Increased binding activity of measles virus to monkey red blood cells after long-term passage in Vero cell cultures. *J Gen Virol*. 1994, 75 (Pt 12):3511-6, England.
- 20 Sheshberadaran H, Chen S-N, Norrby E. Monoclonal antibodies against five structural components of measles virus. *Virology* 1983; 128:341-353.
- 21 Souza VAUF, Pannuti CS, Sumita LM & Albrecht P. ELISA for measles antibody. A comparison with hemagglutination inhibition, immuno-fluorescence and plaque neutralization test. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1991, 33(1):32-36.
- 22 Varsanyi TM, Utter G, Norrby E. Purification, morphology and antigenic characterization of measles virus envelope components. *J Gen* 1984; 65:355-366.



*Entrada principal de la sede central del Instituto Nacional de Salud, Lima -Perú*