

21
2oj.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

DESARROLLO Y ESTANDARIZACION DE LA
TECNICA DE ELISA Y COAGLUTINACION PARA
EL DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
MARIA TERESA HERRERA BARRIOS

DIRECTOR: DR. EDUARDO SADA DIAZ

COASESOR: M. EN C. CARLOS EDUARDO SALAS C.

FALLA DE ORIGEN

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO,

1989



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E.

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCION	2
2.1.TUBERCULOSIS.....	4
2.2.PROPIEDADES DE <u>M.tuberculosis</u> .	4
2.2.1.Estructura.	
2.2.2.Crecimiento.	
2.3.FACTORES DE VIRULENCIA.....	8
2.4.EPIDEMIOLOGIA.....	10
2.5.TRASMISION,PROFILAXIS Y CON- TROL.....	11
2.6.METODOS DE DIAGNOSTICO.....	12
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
4. OBJETIVOS.....	19
5. HIPOTESIS.....	20
6. MATERIAL.....	21
7. METODOLOGIA.....	26
8. RESULTADOS.....	45
9. DISCUSION.....	68
10. CONCLUSIONES.....	72
11. BIBLIOGRAFIA.....	73
12. APENDICE.....	78

1. RESUMEN.

Debido a que la Tuberculosis (Tb) constituye uno de los problemas de salud pública más importante en nuestro país; el presente trabajo tiene como objetivo fundamental el desarrollo y la estandarización de la técnica de ELISA y Coaglutinación para el diagnóstico de la enfermedad. Ambas técnicas se basan en la detección de antígenos (Ag's) proteicos de M.tuberculosis - en muestras de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR). En el suero de pacientes con Tb se ha demostrado la presencia de complejos inmunes circulantes (CIC), a los que se encuentran asociados Ag's proteicos de M.tuberculosis. Con la finalidad de detectar tanto Ag's libres como Ag's presentes en los CIC; las muestras de suero fueron tratadas con Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%.

Los resultados mostraron que la técnica de ELISA es más sensible que la técnica de Coaglutinación; ya que es capaz de detectar cantidades más pequeñas de Ag's proteicos. Lo que se concluye de este trabajo es que la técnica de ELISA aplicada a las muestras de suero no es de gran utilidad; sin embargo, la técnica de ELISA (Sistema II) aplicada a las muestras de LCR si es útil para establecer el diagnóstico de Tb meníngea.

2. INTRODUCCION.

Tradicionalmente el diagnóstico de las enfermedades infecciosas, se lleva a cabo, mediante el cultivo del agente infectante. Aunque los métodos de cultivo son de gran utilidad para el diagnóstico clínico, presentan una serie de desventajas. La más importante es el tiempo requerido para la detección e identificación del agente infectante. Este tiempo puede variar de uno a dos días en el caso de bacterias de rápido desarrollo; hasta algunas semanas en el caso de virus, hongos y bacterias de lento desarrollo.

Cuando los organismos son de lento desarrollo, el tiempo requerido es prolongado, y esto resulta de poca utilidad en el caso de pacientes con sospecha de infección. Por esta razón, existe un gran interés en el desarrollo de métodos rápidos para la identificación de patógenos o Ag's microbianos en los líquidos corporales.

La mayoría de los ensayos rápidos se basan en la reacción Ag-Ac; que generalmente involucra la unión de anticuerpos (Ac's) marcados con los Ag's presentes en la muestra clínica.

Existen numerosos marcadores que pueden ser utilizados para este tipo de ensayos; como es el caso de isótopos radioactivos para el Radioinmunoensayo (RIA). Sin embargo, existen una serie de desventajas asociadas a el uso de este tipo de marcadores. Algunas de ellas son: a) La vida media de los isótopos es rela-

tivamente corta, b) se requiere de equipo muy sofisticado, y -- además c) existe el riesgo que el personal de laboratorio sufra radiaciones.

Estas limitaciones han conducido a la búsqueda de otros sis temas que proporcionen buena sensibilidad y que no requieran - del uso de material radioactivo. Algunos de éstos sistemas son: Inmunodifusión, Inmunolectroforesis, Inmunofluorescencia y Aglu tinación que han sido utilizados para detectar directamente a los Ag's . Sin embargo, no son ampliamente utilizados debido a - que son sistemas menos sensibles y que además requieren una in terpretación subjetiva de la reacción Ag-Ac.

Otro tipo de marcadores útiles para indicar la reacción - - Ag-Ac son las enzimas que presentan las siguientes ventajas: - a) Ser estables, b) tener reacción específica sobre su sustrato, c) generar productos coloridos que pueden ser cuantificados, y d) presentar una reacción altamente sensible y específica.

Por esta razón, en las últimas décadas se han desarrollado - una gran diversidad de inmunoensayos (ELISA) utilizando a las enzimas como marcadores en la detección de un gran número de - Ag's en líquidos corporales.

Tal es el caso de la Tuberculosis, para la que se han desarro llado demasiados sistemas inmunoenzimáticos con el propósito de contar con una técnica rápida y confiable para el diagnóstico - de la enfermedad.

2.1. TUBERCULOSIS.

La Tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa que se presenta principalmente a nivel pulmonar y que además puede involucrar otros órganos y tejidos (4). El principal agente causante de la Tb humana es M.tuberculosis; aunque en raras ocasiones la enfermedad puede ser causada por M.bovis ó M.africanum - (1,7,8).

Estos microorganismos son parásitos intracelulares capaces de persistir dentro de los macrófagos haciendo uso de sus mecanismos de evasión como son: a) Inhibir la fusión fagosoma-lisosoma, b) adquirir resistencia a enzimas lisosomales y/o metabolitos oxigenados (2,3,10).

2.2. PROPIEDADES DE M.tuberculosis.

2.2.1. Estructura.

En los tejidos animales el bacilo tuberculosos se presenta en forma de bacilo recto y delgado midiendo aproximadamente de 2 a 4 μm de largo y de 0.2 a 0.5 μm de ancho. La pared del bacilo se encuentra constituida por lípidos, proteínas y polisacáridos (2,3,11,12).

A.-Lípidos.

La pared de esta bacteria se caracteriza por tener un alto contenido de lípidos que corresponden a un 60% del peso seco de la bacteria. Estos se encuentran unidos en gran proporción a proteínas y polisacáridos formando las lipoproteínas y los glicolípidos que se encuentran firmemente unidos a la parte externa de la pared bacteriana. Y es precisamente esta localización de los lípidos lo que le confiere a la bacteria las siguientes propiedades:

- Impermeabilidad a las tinciones.
- Resistencia a la destrucción por ácidos y álcalis.
- Carácter hidrófobo de la bacteria mostrado durante su crecimiento en medio líquido; por su tendencia a adherirse - unas a otras y a flotar en la superficie.
- La gran cantidad de lípidos en la pared contribuye al lento crecimiento; ya que dificultan el paso de los nutrientes al interior de la bacteria.
- Resistencia a la digestión intracelular por los macrófagos y a la actividad bactericida del complemento.
- Se ha determinado que posiblemente los lípidos sean los responsables de las reacciones celulares de los tejidos hacia el bacilo (2,3).

B.-Polisacáridos.

Son los componentes más abundantes en los filtrados y en los extractos de micobacterias. Gran parte de éstos (glucan, manan, -

arabinogalactan y arabinomanan) se encuentran unidos químicamente con lípidos presentes en la pared bacteriana; mientras que en la Cera D los polisacáridos forman un complejo ácido micólico-arabinogalactan (2).

Su función en la patogenia de la Tb es incierto; aunque puede inducir hipersensibilidad de tipo inmediato e interferir en algunas reacciones Ag-Ac in vitro (3).

C.-Fracción Proteica.

Las proteínas unidas a los lípidos tienen la capacidad de inducir la sensibilidad a la tuberculina; y además inducir la producción de diversos Ac's. Por lo que esta fracción es responsable de la respuesta inmune humoral durante la enfermedad.

D.-Ácidos Micólicos.

En la micobacteria se han encontrado una gran cantidad de diferentes ácidos grasos; y los ácidos micólicos parecen ser exclusivos de la pared de Mycobacterium, Nocardia y Corynebacterium.

Los ácidos micólicos son ácidos grasos grandes, saturados, ramificados α -alquil y β -hidroxil que se encuentran en la Cera D y en los glicolípidos. Una molécula de arabinogalactan se une covalentemente al péptidoglican y alrededor de 30 residuos de ácidos micólicos formando un puente entre la capa rígida y el exterior y capas lipofílicas de la pared bacteriana.

2.2.2. Crecimiento.

M.tuberculosis es un aerobio estricto que tiene la capacidad de desarrollarse en medio simple con glicerol como fuente de -- carbono y sales amónicas como fuente de nitrógeno.Usualmente al medio se le adiciona asparagina ó una mezcla de aminoácidos para estimular el crecimiento e incrementar su velocidad.

En medio líquido la bacteria crece en forma de agregados --- adherentes;formando una película sobre la superficie.La adición de detergentes no iónicos como el Tween 80,ocasiona que la bacteria se desarrolle en forma dispersa;probablemente,esto sucede debido a que el detergente se une a la superficie de la bacteria y de esta manera inhibe la unión entre ellas (2,10).

Esta bacteria muestra una extraordinaria preferencia nutricional por los lípidos,y su crecimiento es estimulado por bajas concentraciones de ácidos grasos de cadena larga;ya que altas - concentraciones de éstos inhiben su crecimiento.

M.tuberculosis se desarrolla óptimamente a 37°C;aunque en periodos muy largos formando colonias rugosas y sin pigmento (6). Esta bacteria puede sobrevivir en ambiente seco durante mucho tiempo;pero muere rápidamente cuando se expone directamente a - la luz ultravioleta,o bien,cuando se le somete a la ebullición y a la pasteurización (2).

2.3. FACTORES DE VIRULENCIA.

Estudios realizados han mostrado que M.tuberculosis posee - Factores de Virulencia que le confieren la capacidad de incrementar su infectividad, patogenicidad e inmunogenicidad (11).- Dentro de los Factores de Virulencia encontramos los siguientes:

Factor Cordón.

Este componente bacteriano fué extraído por Bloch de una cepa virulenta de M.tuberculosis con el propósito de indagar si este componente era el causante del crecimiento de la bacteria en forma de serpentinas en medio líquido; ya que este tipo de crecimiento se relacionaba con la virulencia. Posteriormente al estudiar la composición de éste factor, se ha determinado que se encuentra constituido por el micósido 6,6'-Dimicololtrehalosa - (2,11,12). Existen evidencias que relacionan a este Factor con la virulencia de la bacteria, algunas de ellas son las siguientes:

- Es abundante en las cepas virulentas.
- Es responsable del crecimiento en forma de serpentinas.
- Los ratones son protegidos de la infección mediante la inmunización con una mezcla de Factor Cordón y albúmina sérica bovina metilada ó por una transferencia pasiva de suero de conejo anti-Factor Cordón.
- La administración subcutánea de 10g de este factor es -

letal para los ratones. Su toxicidad se ha relacionado -- con alteraciones a nivel de las enzimas microsomales, mitocondrias y metabolismo de los lípidos en el hígado.

-Es un componente tóxico que inhibe la migración de los - polimorfonucleares normales in vitro; además estimula la formación de granulomas.

Cera D.

Es un micósido de elevado peso molecular, que no es una cera verdadera y que contiene ácidos micólicos y glucopéptidos. Ha sido extraída aparentemente de la capa basal de la pared ya que contiene aminoácidos característicos de esta capa unidos a polímeros de hexosa y hexosamina (2). Algunas de sus propiedades - mostradas son las siguientes:

- En emulsión con cualquier Ag, la Cera D incrementa la antigenicidad.
- Una mezcla de ésta cera con proteínas del bacilo; induce la hipersensibilidad retardada a la tuberculina.

Sulfátidos.

Son lisosomotrópicos para los macrófagos e inhiben la fusión del fagosoma con el lisosoma con la finalidad de prevenir la degradación del bacilo (12); además tiene la propiedad de incrementar la toxicidad del Factor Cordón. Este aumento en la toxicidad

dad de Factor Cordón y el impedimento de la formación del fagolisosoma son mecanismos de la bacteria que le permiten que la enfermedad progrese. La inhibición de la fusión fagolisosomal - ocasiona que la bacteria persista y se desarrolle; como consecuencia la población bacteriana se incrementa y se produce más Factor Cordón y sulfátidos que contribuyen a la destrucción celular.

2.4. EPIDEMIOLOGIA.

La Tuberculosis es un problema de enormes proporciones; ya - que se ha estimado que más del 50% de la población se encuentra infectada. En 1985 (11) la O.M.S. estimó que para 1986 habría de cuatro a cinco millones de nuevos casos tipo infeccioso, y - un número igual de casos no infecciosos. Además se ha reportado que las muertes ocasionadas por la Tb a nivel mundial alcanzan cifras entre tres y cuatro millones cada año (11).

La incidencia de la enfermedad es más elevada en grupos sociales menos favorecidos que viven en condiciones socioeconómicas muy bajas y con escasa atención médica. Otros factores que contribuyen a la infección son: la nutrición, el estado inmunológico, padecimientos coexistentes y factores de resistencia individual.

Hasta 1970 la mortalidad registrada en los países en vías de desarrollo fué tres veces mayor que en países desarrollados (7).

En México, la mortalidad por Tb ha disminuido gradualmente en los últimos 50 años; y hasta 1980 constituyó la causa número 11 de mortalidad (13).

2.5. TRANSMISION, PROFILAXIS Y CONTROL.

La transmisión se lleva a cabo principalmente por vía aérea; mediante la inhalación de la bacteria presente en el medio ambiente. La transmisión se efectúa cuando los bacilos presentes en los pulmones de personas con Tb pulmonar son eliminados hacia el exterior en forma de pequeñas gotitas, como consecuencia de la tos o el estornudo. Las gotitas se diseminan a corta distancia, y quizá constituyen el vehículo más eficaz para la difusión. Su tamaño es grande, lo que les impide penetrar hasta los pulmones; sin embargo cuando se secan en el aire, dejan el "núcleo de la gota" que mide de 1 a 5 μm , y puede estar suspendido en el aire durante largo tiempo. Estos núcleos son pequeños y pueden atravesar la barrera de los cilios bronquiales y alcanzar los alveolos pulmonares cuando son inhalados (2,7,11).

La probabilidad de adquirir la infección está determinada por la cantidad de bacilos en el medio ambiente; y esto se encuentra determinado por: a) Factores del paciente y b) Factores ambientales (7).

Otra forma de transmisión es a través de la ingestión de leche de vaca tuberculosa en lugares donde no es controlada la Tb

bovina (5).

Los métodos preventivos de la infección incluyen la identificación temprana de los focos de infección, su aislamiento y tratamiento hasta que pierdan su infectividad; la erradicación de la Tb bovina; la pasteurización de la leche; así como también tener un buen control del medio ambiente a través de una buena ventilación y el uso de luz ultravioleta para reducir la concentración de bacilos del medio ambiente.

El método preventivo que se ha utilizado en nuestro país es la administración de la vacuna BCG (Bacilo Calmette Guérin); que proporciona protección a la infección.

2.6. METODOS DE DIAGNOSTICO.

El método ideal para el diagnóstico de la Tb aún no ha sido descrito. Las formas tradicionales de diagnóstico incluyen métodos: a) Bacteriológicos, b) Radiológicos, c) Clínicos e d) Inmunológicos.

Los métodos bacteriológicos de diagnóstico existentes son poco satisfactorios; ya que presentan una baja sensibilidad y requieren largos periodos de tiempo (6,14).

Uno de los métodos bacteriológicos para el diagnóstico, lo constituye la búsqueda del bacilo ácido-alcohol-resistente (BAAR) utilizado comúnmente para el diagnóstico de Tb pulmonar, sin embargo; recientemente se ha demostrado que su sensibilidad es del

75% presentando un 25% de falsas negativas (14); la sensibilidad de la prueba es aún más baja en Tb pleural y meníngea (15, 16).

El otro método de diagnóstico bacteriológico, lo constituye el aislamiento y caracterización bioquímica de M. tuberculosis (9). Aunque éste es un método de diagnóstico seguro, presenta la desventaja de requerir de largos periodos de tiempo, debido, al crecimiento lento característico de la micobacteria. Esto lo hace poco práctico, ya que en algunos casos el diagnóstico tardío puede traer consigo consecuencias fatales.

En algunos países la prueba cutánea de tuberculina (PPD) constituye un método de diagnóstico de la enfermedad, sin embargo; en México pierde su utilidad, ya que como método preventivo se utiliza la vacuna BCG; y esto, ocasiona una alta prevalencia de PPD-positivo en la población general. Además en algunos casos de pacientes con infección activa, el resultado de la prueba puede ser negativo debido a factores inmunosupresores propios de la enfermedad (17).

Desde hace algunos años se han desarrollado pruebas serológicas para hacer el diagnóstico de la Tb; entre estas pruebas se han utilizado: ELISA y RIA que se caracterizan por ser métodos de alta sensibilidad (18-23).

Se han propuesto diversos sistemas de ELISA para la determinación de Ac's antimicobacteria (24-28); sin embargo, la utilidad clínica que proporcionan es cuestionable ya que se ha observado que individuos sanos pueden presentar una reacción posi-

de de Ac's a Ag's de M.tuberculosis. Esto sugiere que la presencia de Ac's no es indicativo de la enfermedad activa; sino que puede indicar una infección anterior con la micobacteria; o bien, una infección ocasionada por micobacterias atípicas (12).

También los resultados han mostrado que pacientes con Tb pueden tener bajos títulos de Ac's ó no presentarlos; ya que se encuentran implicados en la formación de CIC (38) que se han demostrado en este tipo de pacientes (29-31). Muchos investigadores han estudiado estos CIC y han demostrado que están formados por Ac's IgG, IgA e IgM (32,33) y Ag's micobacterianos (11,31).

Considerando las desventajas que se presentan al hacer la determinación de Ac's para el diagnóstico de la enfermedad; durante los últimos años se han desarrollado sistemas de ELISA para detectar los Ag's micobacterianos en las muestras clínicas. Cabe hacer notar que la técnica de ELISA ha sido ampliamente utilizada por su relativa simplicidad y su alta sensibilidad y especificidad (20-23).

En septiembre de 1983 Sada y cols. (34) publicaron un trabajo en el que mostraron la utilidad de la técnica de ELISA para detectar Ag's proteicos de M.tuberculosis en muestras de LCR de pacientes con Tb meníngea; la sensibilidad de su técnica fue de 81% y su especificidad de 95%.

En octubre del mismo año Bal y cols. (35) publicaron una técnica de inhibición de ELISA para detectar Ag's de la micobacteria en LCR. Los resultados obtenidos fueron semejantes al trabajo anterior (34); sin embargo, la técnica requiere de un mayor

tiempo y además el uso de la micobacteria completa para sensibilizar la placa, lo que la hace poco práctica para el uso rutinario.

Recientemente se ha desarrollado otros sistemas de ELISA para determinar los Ag's en esputo (36), LCR y suero (37,38).

En 1986 Krambovitis y cols. (38) reportaron dos sistemas de ELISA para el diagnóstico de Tb en muestras de suero; ellos propusieron un sistema para detectar Ac's antimicobacteria y otro para detectar Ag's de la micobacteria. Y observaron que la aplicación de ambos sistemas incrementaba la sensibilidad y la especificidad; y quizá, la aplicación de ambas pruebas pueda ser de utilidad en el diagnóstico.

Método de Coagulación para detectar antígenos en líquidos corporales.

Desde hace algunas décadas se han desarrollado pruebas de agregación, haciendo uso de partículas inertes como son: Látex y S. aureus cepa Cowan I (39).

Con el incremento de los conocimientos acerca de las condiciones óptimas para sensibilizar las partículas, se ha hecho posible la producción de reactivos estandarizados y precisos. Esta tecnología ha sido comercializada con partículas de látex (40) y más recientemente Pharmacia ha utilizado partículas de Staphylococcus como portadoras y ha aprovechado las propiedades mos --

tradas por la protefina de superficie de la bacteria (41).

Varias cepas de S.aureus, coagulasa positiva, entre ellas la cepa Cowan I; presentan en la pared una protefina que muestra una reacción de precipitación con las gama globulinas humanas normales y con el suero normal de cobayo; esta es la Protefina A.

Inicialmente se supuso que este constituyente bacteriano reaccionaba con Ac's producidos en respuesta a un estímulo con un antígeno específico, considerando este hecho como una reacción Ag-Ac. Sin embargo, Forsgren y Sjöquist encontraron que esta reacción era mediada por los fragmentos Fc de las inmunoglobulinas y por este motivo la denominaron "Pseudoreacción" (41).

Protefina A.

Esta protefina se localiza en la pared de S.aureus (Cowan I), estructuralmente consiste en una cadena polipeptídica simple -- con peso molecular de 42,000 que no contiene cantidades significativas de carbohidratos. El análisis de aminoácidos ha mostrado cuatro residuos de tirosina por molécula, los cuales, se encuentran involucrados en la unión de la protefina con la fracción Fc de las inmunoglobulinas.

Propiedades Biológicas.

Su propiedad biológica característica es la habilidad para interaccionar con la región constante de varias clases de inmunoglobulinas de mamíferos (42). Muestra cuatro sitios de unión para las fracciones Fc y el máximo número de moléculas IgG (co-

nejo y humano) que se unen a la proteína son dos formando el complejo IgG_2SpA_1 (45).

Durante la interacción de la proteína con la fracción Fc, se deja libre la fracción Fab implicada en el reconocimiento antigénico; de esta manera, no se interfiere en la reacción del Ac -- con su Ag (42). Esta interacción de la Proteína A con las inmunoglobulinas constituye la base de la técnica diagnóstica denominada: Coaglutinación; la cual, ha sido aplicada en algunos casos como método rápido de diagnóstico (46-48).

Esta técnica se basa en la característica particular de el S. aureus (Cowan I) de presentar en la superficie gran cantidad de Proteína A; la cual, muestra una alta afinidad por la fracción Fc de las inmunoglobulinas IgG subclases 1, 2 y 4. Cuando el Ac se une a la Proteína A de la bacteria se genera el reactivo de Coaglutinación que aglutina en presencia del Ag homólogo (9).

La posibilidad de detectar antígenos proteicos de la micobacteria en muestras clínicas, es de gran trascendencia ya que puede simplificar el diagnóstico de la enfermedad.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La Tuberculosis es una enfermedad infecciosa, que constituye un problema de salud pública a nivel mundial.

Tradicionalmente el diagnóstico se establece con el aislamiento y cultivo de M.tuberculosis; sin embargo, esto presenta una serie de desventajas, siendo la más importante el largo periodo que se requiere para el cultivo y su posterior identificación.

Tomando en cuenta que un diagnóstico tardío de la enfermedad puede traer consigo consecuencias fatales; se hace necesario el desarrollo de técnicas rápidas, específicas y sensibles.

4. O B J E T I V O S.

A) Desarrollar y estandarizar la técnica de ELISA y Coaglutinación para detectar antígenos proteicos de M.tuberculosis en muestras clínicas.

B) Analizar la sensibilidad, especificidad y eficiencia de las técnicas desarrolladas; así como también hacer una evaluación de su utilidad como métodos de diagnóstico.

5. H I P O T E S I S.

" Si las técnicas desarrolladas (ELISA y Coaglutina
ción) proporcionan alta sensibilidad y especificidad
para detectar antígenos proteicos de M.tuberculosis -
en las muestras clínicas;entonces van a constituir -
técnicas útiles en el diagnóstico rápido de la Tuber
culosis."

6. MATERIAL.

Material de Laboratorio.

El material de vidrio comúnmente utilizado en el laboratorio; así como también todo el equipo y reactivos necesarios para llevar a cabo el proyecto de tesis.

Material Biológico.

Se analizaron un total de 60 muestras de suero y 32 muestras de LCR.

i) Muestras de suero.

Grupos de Estudio.

Se seleccionaron un total de 60 personas; las cuales, fueron clasificadas en los siguientes grupos.

- I.- Grupo Control: Constituido por personas que no presentaban patología alguna y por pacientes con enfermedad infecciosa diferente a Tb.

- II.- Grupo de Tuberculosos: Constituido por pacientes con diagnóstico de Tb confirmado por cultivo.

I.-GRUPO CONTROL

Subgrupos	No. Muestras
IA.-Individuos clínicamente sanos.	11
IB.-Individuos con enfermedad infecciosa diferente a Tb.	6

II.-GRUPO DE TUBERCULOSOS

Subgrupos	No. Muestras
IIA.-Tb Miliar.	12
IIB.-Tb Pulmonar.	28
IIC.-Tb Ganglionar.	3

TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SUERO.

a) Tratamiento con SDS al 10%.

Este tratamiento tiene como finalidad, la liberación de Ag's proteicos de M.tuberculosis presentes en los CIC.

Se mezcló la muestra de suero en proporción 4:1 (v/v) con SDS al 10% y esta mezcla fue agitada e incubada durante 2hrs. a 37°C. Posteriormente se dializó contra PBS (0.01M, pH=7.2) durante 48hrs. a 4°C; haciendo varios cambios de PBS. Las muestras fueron conservadas en congelación hasta ser analizadas.

b) Sin tratamiento con SDS al 10%.

La finalidad es determinar los Ag's proteicos de M.tuberculosis presentes en forma libre y no asociados a CIC.

Al igual que en el tratamiento anterior la muestra de suero fue mezclada en proporción 4:1 (v/v), pero ahora con PBS (0.01M, pH=7.2). Se mezcló y se mantuvo en congelación hasta ser analizada.

Ambos tratamientos fueron aplicados a todas las muestras de suero, y después fueron analizadas por la técnica de ELISA (Sistema I) para la determinación de Ag's proteicos de M.tuberculosis; analizando cada una de las muestras por duplicado.

ii) Muestras de LCR.

Grupos de Estudio.

Se contó con un total de 32 muestras de pacientes; las cuales, fueron clasificadas en los siguientes grupos.

I.- Grupo Control: Constituido por muestras de pacientes con cultivo negativo y de pacientes con meningitis - ocasionada por agente diferente a M.tuberculosis.

II.- Grupo de Tuberculosos: Constituido por muestras de pacientes tuberculosos diagnosticados por cuadro clínico y por cultivo positivo.

Las muestras fueron analizadas por la técnica de ELISA (Sistema II) para determinar los Ag's proteicos de M.tuberculosis; analizando por duplicado cada una de las muestras.

Algunas de éstas muestras fueron además analizadas por la - técnica de Coagulación.

I.-GRUPO CONTROL

Subgrupos	No.Muestras
i)Cultivo Negativo.	15
ii)Meningitis de etiología diferente.	3

II.-GRUPO DE TUBERCULOSOS.

Subgrupos	No.Muestras
iii)Diagnóstico confirmado por cultivo.	8
iv)Diagnóstico confirmado por cuadro clínico.	6

7. METODOLOGIA.

OBTENCION DE ANTIGENOS PROTEICOS DE M.tuberculosis.

Se trabajó con la cepa virulenta de M.tuberculosis H_{37RV}; la cual, primeramente se hizo crecer en medio Lowenstein-Jensen y - posteriormente se le hizo un pase al medio líquido PBY (Poska-
wer-Beck-Youmans) sometiéndose a incubación durante seis semanas a 37°C, hasta la formación de una película bacteriana sobre la - superficie del medio.

El medio de cultivo fue filtrado con la finalidad de separar la masa bacteriana de las proteínas libres en el medio; para esto, se utilizó un equipo de filtración Millipore con membranas bacte-
riológicas de 0.8, 0.45 y 0.22 micras de diámetro del poro.

El filtrado proteico fue precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 42% -- que fue adicionado paulatinamente y con agitación lenta y constante a 4°C. El precipitado fue centrifugado durante 30min/10000 rpm/4°C; el sobrenadante fue desechado y el precipitado resuspen-
dido en PBS (0.01M, pH=7.2); adicionando además el inhibidor de pro-
teasas Floruro de Fenil-Metil-Sulfóxido (Sigma, Chemical Co.) a una concentración final de 0.02%.

Este precipitado fue dializado contra PBS (0.01M, pH=7.2) a -- 4°C haciendo varios cambios de PBS. Finalmente fue recentrifugado y conservado a -78°C en alícuotas de 1 ml.

A este extracto proteico se le determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry y se corrió en una electrofore-
sis en geles de poliacrilamida (PAGE) y condiciones desnaturali-
zantes.

OBTENCION DE ANTICUERPOS.

Animales.-Se utilizaron dos conejos adultos jóvenes de la raza Nueva Zelanda, aparentemente sanos, de aproximadamente 2Kg de peso.

Vía de inmunización.-Intramuscular (Distribuyendo el Ag en cuatro ó cinco sitios).

Protocolo de Inmunización.

Se obtuvo una muestra de suero previa a las inmunizaciones.

Tiempo (Semanas)	Dosis
Primera	5mg de <u>M.tuberculosis</u> H ₃₇ RV muerta por calor. 1mg de extracto proteico. 1ml de Al(OH) ₃
Segunda	1mg de extracto proteico y 1ml Al(OH) ₃
Tercera	1mg de extracto proteico y 1ml Al(OH) ₃
Cuarta	1mg de extracto proteico y 1ml Al(OH) ₃
Quinta	1mg de extracto proteico y 1ml Al(OH) ₃
Sexta	1mg de extracto proteico y 1ml Al(OH) ₃

A la séptima semana los conejos fueron sangrados de la oreja, y se procedió a evaluar la potencia del suero hiperinmune y el suero control por la técnica de ELISA. Cuando se registró un título de Ac's menor a 2000, éste suero fue considerado inadecuado y los animales fueron reinmunizados; mientras que títulos mayores ó iguales de 2000 indicaron que el suero hiperinmune era útil para los siguientes experimentos.

Nota: El extracto proteico corresponde a los Ag's proteicos de M. tuberculosis.

DETERMINACION DE ANTICUERPOS POR LA TECNICA DE ELISA.

La técnica se utilizó para valorar la potencia de sueros hiperinmunes y se fundamenta en la reacción de los Ac's presentes en el suero con los Ag's proteicos de M. tuberculosis adheridos a la fase sólida. Esta reacción Ag-Ac es evidenciada con un Ac marcado con peroxidasa. Los sueros control de conejo también fueron analizados, para saber si los anticuerpos normales de conejo presentan reacción con los Ag's proteicos.

La microplaca (Dynatech, Immunolon 2) fue sensibilizada con 100 µg/ml de Ag proteico de M. tuberculosis H₃₇RV, diluyendo en solución amortiguadora de carbonatos (0.05M, pH=9.6) y adicionando 100 µl/pozo e incubando toda la noche a 4°C. Al siguiente día

se lavó la placa con 200µl/pozo de PBS-T cuatro veces y posteriormente fue bloqueada con BSA 1%-PBS-T adicionando 100µl/pozo. Se incubó toda la noche a 4°C.

La placa fue nuevamente lavada y se le agregaron 100µl/pozo de cada dilución del suero (Hiperimmune y control a diluciones 1:500,1:1000,1:2000,1:4000,1:8000,1:16000) incubando durante 1hr a 37°C.

La placa fue lavada y se le agregó el Ac anti-IgG de conejo conjugado a Peroxidasa (Sigma, Chemical Co.) a dilución 1:500; adicionando 100µl/pozo. Se incubó durante 1hr a 37°C. Se lavó la placa y se adicionaron 100µl/pozo de O-Fenilendiamina (Sigma, Chemical Co.). Se dejó que se llevara a cabo la reacción enzimática y posteriormente se detuvo adicionando 50µl/pozo de H₂SO₄ 2.5M.

Finalmente la placa se leyó a 490nm en un lector de ELISA (Minireader II, Dynatech).

Nota: Las diluciones se hicieron en BSA 1%-PBS-T.

PURIFICACION DE ANTICUERPOS.

Los Ac's antimicobacteria presentes en el suero hiperimmune fueron purificados por dos tipos de columna:

- i) Columna de Sepharosa-Proteína A.
- ii) Columna de Afinidad.

i) Columna de Sepharosa 4B-Proteína A.

Esta columna nos permite separar Ac's de tipo IgG, debido a - la afinidad mostrada por la Proteína A. Por esta columna fueron purificados los Ac's antimicobacteria y Ac's normales de conejo.

Se utilizó una columna de Sepharosa 4B-Proteína A (Farmacia Fine Chemicals) de aproximadamente 6ml de volumen. Previamente la columna fue lavada con PBS (0.1M, pH=8.0) y posteriormente equilibrada con PBS (0.01M, pH=8.0), se aplicaron 2ml de suero de conejo (Hiperimmune y control) y se incubó durante 3hrs a 4°C.

La columna fue lavada exhaustivamente con PBS (0.01M, pH=8.0) para eliminar las proteínas séricas que no se pegan a la Proteína A, este lavado fue suspendido hasta que la lectura del eluado fue de 0.0 a 280nm.

Para eluar el Ac se utilizaron 6ml de solución amortiguadora de Glicina-HCl (0.1M, pH=2.8) y se colectaron fracciones de 1ml - neutralizando en cada una el pH con solución amortiguadora de Tris (1.5M, pH=8.0) con la finalidad de evitar la desnaturalización del Ac.

Todas las fracciones se leyeron a 280nm, se graficaron las - lecturas y se colectaron las fracciones que registraron lecturas altas. Después de eluar el Ac, la columna fue nuevamente equilibrada y se le adicionó Azida de Sodio al 0.05%.

Las fracciones de mayor lectura se dializaron contra PBS -- (0.01M, pH=7.2) a 4°C haciendo varios cambios de PBS. La IgG fue concentrada con Sephadex G-25 (Sigma, Chemical Co.) y posterior--

mente fue centrifugada por 20min/10,000rpm/4°C. Se hicieron alícuotas y se guardaron en congelación hasta ser utilizadas.

ii) Columna de Afinidad.

La purificación de Ac's por ésta columna se logra basándose en la reacción Ag-Ac que se lleva a cabo entre los Ag's proteicos de la columna y los Ac's antimicobacteria del suero hiperinmune.

Primero se conjugaron los Ag's proteicos de la micobacteria a la Sepharosa activada; se pesó 1g de Sepharosa 4B activada con CNBr (Pharmacia Fine Chemicals) y se suspendió en 10ml de HCl 1mM, este gel fue lavado durante 15min con 200ml de HCl 1mM. Después la Sepharosa fue resuspendida en 10ml de solución amortiguadora de NaHCO₃ 0.1M, NaCl 0.5M, pH=8.3 (Solución de acoplamiento) y se le adicionaron 10 mg de Ag proteico de M. tuberculosis.

La mezcla fue agitada suavemente durante 2hrs a temperatura ambiente y el exceso de Ag fue eliminado lavando la Sepharosa con solución de acoplamiento. Para bloquear los grupos activos libres de la Sepharosa, ésta fue incubada por 2hrs a temperatura ambiente con solución amortiguadora de Tris (0.1M, pH=8.0) con agitación suave y constante.

Después la Sepharosa fue lavada con tres ciclos de pH alterante, que consistió en solución amortiguadora de Acetatos (0.1M, NaCl 0.5M, pH=4.0) seguido de solución amortiguadora de Tris (0.1M, NaCl 0.5M, pH=8.0). Finalmente la Sepharosa fue resuspendida en PBS (0.01M, pH=7.2) y se empacó en la columna.

Primeramente la columna de aproximadamente 2.5ml de volúmen fue lavada de manera exhaustiva con PBS(0.01M,pH=7.2)y después se le agregaron 1.5ml de suero hiperimmune de conejo y se incubó durante 3hrs a 4°C.

Después la columna fue lavada con PBS(0.01M,pH=7.2) hasta que el eluado registrara una lectura de 0.0 a 280nm. Para eluar el-Ac de la columna se utilizaron 4.5ml de solución amortiguadora de Glicina-HCl(0.1M,pH=2.8); y fueron colectadas fracciones de 1ml, neutralizando el pH en cada una con solución amortiguadora de Tris(1.5M,pH=8.0).

Todas las fracciones colectadas fueron leídas a 280nm, se graficaron las lecturas y se colectaron las que registraron lecturas más altas. Estas fracciones fueron dializadas contra PBS --- (0.01M,pH=7.2) a 4°C haciendo varios cambios de PBS. El Ac fue -- concentrado y posteriormente centrifugado durante 10min/10000 rpm/4°C. Se hicieron alicuotas y se mantuvieron en congelación.

A los Ac's purificados se les determinó concentración de proteínas por el método de Lowry y para verificar su pureza se corrieron en una electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en condiciones desnaturalizantes.

CONJUGACION DE ANTICUERPOS A BIOTINA.

Una fracción de los Ac's antimicobacteria purificados por columna de Sepharosa 4B-Proteína A, fueron conjugados a Biotina con la finalidad de desarrollar un sistema de ELISA en el que se amplifica la señal de la reacción Ag-Ac.

La concentración de proteínas del Ac fue ajustada a 1mg/ml - con PBS (0.01M , $\text{pH}=7.2$) y se sometió a diálisis contra solución amortiguadora de NaHCO_3 (0.1M , $\text{pH}=8.0$) durante toda la noche a 4°C .

Se pesó 1mg de N-Hidroxisuccinimido Ester de Biotina (Sigma, Chemical Co.), el cual, fue disuelto en 1ml de Dimetil Sulfóxido (DMSO). Se adicionaron $200\mu\text{l}$ de la mezcla de Biotina-DMSO a cada 1ml de la solución proteica y se dejó reaccionar durante 4hrs a temperatura ambiente con agitación esporádica y suave.

La mezcla se dializó contra PBS (0.01M , $\text{pH}=7.2$) durante toda la noche haciendo varios cambios de PBS. El Ac conjugado fue congelado en alícuotas pequeñas hasta ser utilizado.

DETERMINACION DE PROTEINAS.

(Método de Lowry)

Este es un método colorimétrico que se basa en la interacción inicial de la proteína con los iones Cu^{++} en medio alcalino formando un complejo, y una posterior reducción de los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico a azul de tungsteno y azul de molibdeno.

respectivamente. Esta reducción se debe a la acción del complejo Proteína-Cu formado inicialmente.

Para llevar a cabo la determinación de proteínas se prepararon previamente las siguientes soluciones:

Solución A.-50ml de Na_2CO_3 en NaOH 0.1N.
 -0.5ml de Tartrato de Na y K al 2%.
 -0.5ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1%

Solución B.-Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:2

Estándar de Proteínas.
 Albúmina Sérica Bovina = 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

CURVA DE CALIBRACION.

No.de Tubo	1	2	3	4	5	6	7
Est.de protefinas (ml)	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	-
Agua destilada (ml)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.0	Dil.de muestra
Solución A (ml)	-----		3.0	-----			
Los tubos se mezclaron y se dejaron reaccionar durante 10min.							
Solución B (ml)	-----		0.3	-----			

Los tubos se agitaron y se dejaron reaccionar durante 1hr a temperatura ambiente y posteriormente se leyeron a 500nm.

Las lecturas fueron graficadas (Concentración VS. D.O.) y linearizadas. La lectura de las muestras se interpolaron y se determinó la concentración de proteínas.

DESARROLLO Y ESTANDARIZACION DE LOS SISTEMAS DE ELISA.

Fueron desarrollados dos sistemas de ELISA para la determinación de Ag's proteicos de la micobacteria en las muestras de -- suero y LCR.

El fundamento de ambos sistemas es que en la fase sólida se encuentra unido el Ac de conejo antimicobacteria que captará a los antígenos micobacterianos de la muestra; y esta reacción Ag-Ac será evidenciada a través de una reacción enzimática.

i) SISTEMA I.

Se desarrolló primeramente un sistema de ELISA, que utilizó como sistema indicador de la reacción Ag-Ac; un Ac de cabra anti-BCG y posteriormente un Ac anti-IgG de cabra conjugado a Peroxi dasa.

ii) SISTEMA II.

Este sistema utilizó como sistema indicador un Ac antimico - bacteria conjugado a Biotina y posteriormente la Estreptoavidin-Peroxi dasa (EAP).

En ambos sistemas para establecer las condiciones óptimas de trabajo se realizó una titulación de los Ac's antimicobacteria, Ac's de cabra anti-BCG y Ac's antimicobacteria conjugados a la Biotina.

Después de realizar varios ensayos se establecieron las condiciones óptimas para cada sistema; las que se muestran en la siguiente tabla.

CONDICIONES OPTIMAS.	
SISTEMA I DE ELISA	
Ac antimicobacteria.	1:500
Ac de cabra anti-BCG.	1:100
Ac anti IgG de cabra conjugado a Peroxidasa.	1:500
SISTEMA II DE ELISA	
Ac antimicobacteria.	1:100
Ac antimicobacteria conjugado a Biotina.	1:500
Estreptoavidin-Peroxidasa.	1:1000

DETERMINACION DE ANTIGENOS PROTEICOS DE M.tuberculosis
POR LA TECNICA DE ELISA.

(SISTEMA I)

Este fue aplicado a las muestras de suero (Tratadas y no tratadas con SDS al 10%).

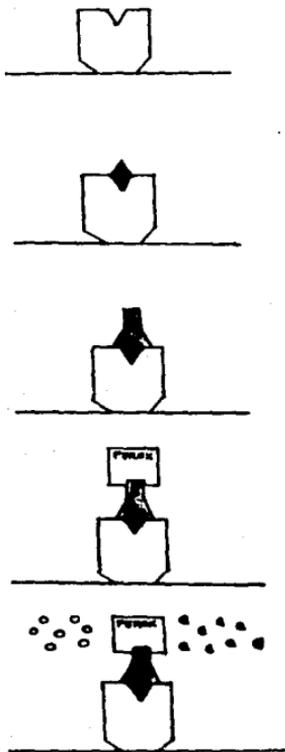
Primeramente la placa (Dynatech, Immunolon 2) fue sensibilizada con el Ac antimicobacteria a dilución 1:100; haciendo la dilución en solución amortiguadora de carbonatos (0.05M, pH=9.6) y agregando 100µl/pozo. La placa fue incubada toda la noche a 4°C y al siguiente día lavada cuatro veces con 200µl/pozo de PBS-T. Después fue bloqueada con 100µl/pozo de BSA 1%-PBS-T e incubada durante toda la noche a 4°C.

Se agregaron las muestras de suero y también cantidades conocidas de Ag's proteicos de M.tuberculosis (100, 50, 25, 10 y 5ng/ml) adicionando a todos los pozos 100µl. La placa se incubó por 1hr a 37°C. Se lavó la placa y el Ac de cabra anti-BCG fue diluido 1:100 agregando 100µl/pozo, posteriormente se incubó 1hr a 37°C.

La placa fue lavada y se hizo la dilución 1:500 del Ac anti-IgG de cabra conjugado a Peroxidasa (Sigma, Chemical Co.) agregando 100µl/pozo. Se incubó 1hr a 37°C.

Nuevamente la placa se lavó y se agregaron 100µl/pozo de O-Fenilendiamina (Sigma, Chemical Co.). Se dejó que se llevara la reacción enzimática y posteriormente fue detenida mediante la adición de 50µl/pozo de H₂SO₄ 2.5M. La placa fue leída a 490nm en un lector de ELISA (Minireader II, Dynatech).

Técnica de ELISA (Sistema I)



(SISTEMA II).

Este sistema fue aplicado a las muestras de LCR.

La placa (Dynatech, Immunolon 2) fue sensibilizada con Ac anti micobacteria a dilución 1:100, haciendo la dilución en solución amortiguadora de carbonatos (0.05M, pH=9.6) y agregando 100µl/pozo.

Se incubó toda la noche y al siguiente día se lavó cuatro veces con 200µl/pozo de PBS-T. Se agregaron 100µl/pozo de BSA 1%-PBS-T para bloquear y se incubó toda la noche a 4°C.

La placa fue lavada y se adicionaron 100µl/pozo de cada una de las muestras de LCR; así como también cantidades conocidas de Ag's proteicos de M. tuberculosis (100, 50, 25, 10, 5 y 1ng/ml). Se incubó la placa por 1hr a 37°C y posteriormente fue lavada.

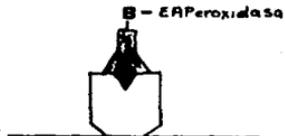
El Ac antimicobacteria-Biotina fue diluido 1:500 y se agregaron 100µl/pozo. La placa fue incubada por 1hr a 37°C y posteriormente fue lavada.

La EAP (Sigma, Chemical Co.) fue diluida 1:1000 y se agregaron 100µl/pozo. Nuevamente se incubó por 1hr a 37°C y se lavó.

Se agregaron 100µl/pozo de O-Fenilendiamina (Sigma, Chemical Co.). Se dejó que se llevara a cabo la reacción enzimática; la cual, fue finalmente detenida con 50µl/pozo de H₂SO₄ 2.5M. La placa fue leída a 490nm en un lector de ELISA (Minireader II, Dynatech).

Nota: Las diluciones se hicieron en BSA 1%-PBS-T.

Técnica de ELISA (Sistema II)



COAGLUTINACION.

PREPARACION DE LA SUSPENSION DE S.aureus al 10%.

La cepa Cowan I de S.aureus se hizo crecer en el medio de cultivo Mueller-Hinton y a partir de este cultivo se preparó una suspensión bacteriana en PBS(0.01M,pH=7.2)estéril.De ésta suspensión se agregaron 5ml a cada caja de medio de cultivo -- Mueller-Hinton y se incubaron durante 24hrs a 37°C.

A todas las cajas se les agregaron 5ml de PBS(0.01M,pH=7.2)-estéril y con la ayuda de una varilla de vidrio las bacterias fueron removidas de la superficie del medio de cultivo.Esta suspensión de bacterias fue colectada con la ayuda de una pipeta - Pasteur y enseguida la suspensión se calentó en baño maría a -- (100°C)durante 20min.Una vez finalizado este paso la suspensión fue sometida a enfriamiento y se centrifugó durante 15min/2500-rpm.El sobrenadante fue desechado y el paquete bacteriano fue lavado tres veces con PBS(0.01M,pH=7.2)estéril,centrifugando durante 15min/2500rpm en cada lavado.

El paquete bacteriano fue resuspendido en Formaldehído 1% - PBS estéril e incubado durante 1hr a temperatura ambiente;después se lavó nuevamente tres veces con PBS estéril.

Finalmente se determinó la cantidad de masa bacteriana obtenida,y en base a esto,se preparó la suspensión bacteriana al 10% con PBS(0.01M,pH=7.2)estéril.A ésta suspensión se le adicionó - Azida de Sodio al 1% y se mantuvo a 4°C hasta ser utilizada.

PREPARACION DEL REACTIVO DE COAGLUTINACION.

Para sensibilizar las células bacterianas de S.aureus cepa - Cowan I, se tomaron 2ml de la suspensión bacteriana y se lavaron tres veces con PBS(0.01M,pH=7.2);centrifugando en cada lavado - durante 10min/2500rpm.El paquete bacteriano fue resuspendido en 5ml de PBS(0.01M,pH=7.2)

Se mezcló 1ml de esta suspensión con 200µl de Ac antimicobacteria purificado por la columna de afinidad (Reactivo control positivo).

Por otra parte,el (Reactivo control negativo)se preparó de - igual manera,pero ahora se adicionaron 200µl de Ac normal de conejo purificado por columna de Sepharosa 4B-Proteína A.

Se agitaron los tubos y se incubaron durante 2hrs a temperatura ambiente;posteriormente las células bacterianas se lavaron tres veces con PBS y finalmente se resuspendieron en PBS a el - volúmen inicial (1ml).Este reactivo se conservó a 4°C hasta ser utilizado.

EVALUACION DEL REACTIVO.

Antes de que las muestras fueran analizadas;el reactivo de - coaglutinación fue previamente evaluado de la siguiente manera:

Se hicieron diluciones de los Ag's proteicos de M.tuberculosis en BSA 1%-PBS para tener las siguientes concentraciones:100, 80,60,50,40,20,10,5,1 y 0.1 µg/ml.

Para evaluar el reactivo control positivo y negativo se procedió de la siguiente manera:

Se colocó una gota del reactivo (control positivo ó negativo) sobre una placa de vidrio; posteriormente se agregó una gota de Ag's proteicos de M. tuberculosis (diferentes concentraciones) y PBS. Se mezcló con un hisopo y se sometió a agitación durante - 5min. Finalmente se hizo una evaluación del grado de aglutinación.

Nota: Se procedió de la misma manera al analizar las muestras.

ANALISIS ESTADISTICO.

El tratamiento estadístico aplicado a los resultados fue el Análisis de Varianza; utilizando para ello los siguientes estadígrafos:

Suma de cuadrados entre grupos. $\sum X_e^2 = \left(\frac{\sum X_1}{n_1} + \frac{\sum X_2}{n_2} \right) - \left(\frac{\sum X_1 + \sum X_2}{N} \right)^2$

Suma total de cuadrados. $\sum X_t^2 = \left(\sum X_1 + \sum X_2 \right) - \left(\frac{\sum X_1 + \sum X_2}{N} \right)^2$

Suma de cuadrados dentro de los grupos. $\sum X_d^2 = \sum X_t^2 - \sum X_e^2$

$F_{calculada} = \frac{\text{Cuadrados medios entre grupos}}{\text{Cuadrados medios dentro de grupos}}$

EVALUACION DE LAS TECNICAS.

El desarrollo de éstas técnicas, hace necesaria la evaluación de su utilidad como métodos de diagnóstico. Por este motivo, se hizo la medición de algunos parámetros de gran importancia: Sensibilidad, Especificidad y Eficiencia.

Sensibilidad: Definida como la habilidad de la prueba para identificar correctamente a todos los pacientes enfermos.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FN}} \times 100$$

Especificidad: Definida como la habilidad de la prueba para identificar correctamente a todos los pacientes no enfermos.

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{TN}}{\text{TN} + \text{FP}} \times 100$$

Eficiencia: Indica el porcentaje de pacientes correctamente clasificados por la prueba (enfermos y no enfermos).

$$\text{Eficiencia} = \frac{\text{TP} + \text{TN}}{(\text{TP} + \text{FP} + \text{FN} + \text{TN})} \times 100$$

Donde: TP = Verdadero positivo. FN = Falso negativo.
TN = Verdadero negativo. FP = Falso positivo.

8. RESULTADOS.

En la Figura 1 se muestra el corrimiento electroforético de los Ag's proteicos de M.tuberculosis cepa H₃₇RV obtenidos al filtrar el medio de cultivo. Esta gran variedad de proteínas de diferente peso molecular constituyeron nuestros Ag's durante el presente trabajo.

Para obtener los Ac's antimicobacteria, los conejos fueron inmunizados con éstos Ag's; y la potencia del suero fue evaluada con la técnica de ELISA.

En la siguiente Tabla se muestran los resultados obtenidos al evaluar la potencia de sueros hiperinmune y sueros control.

Tabla 1.-Evaluación de la potencia de los sueros control (a) e hiperinmune (b) por la técnica de ELISA.

	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000
(a)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.01	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
(b)	1.73	1.50	1.43	1.25	1.02	0.77
	1.73	1.57	1.50	1.41	1.15	0.81

*D.O. 490nm.

Como puede observarse los sueros control no presentan Ac's antimicobacteria; mientras que los sueros hiperinmunes mostraron títulos mayores a 1:2000, de manera que se procedió a purificarlos por columna de Sepharosa 4B-Proteína A y por columna de afinidad.

En las Gráficas 1, 2 y 3 se muestran las fracciones colectadas durante el proceso de purificación de los Ac's.

Posteriormente, para verificar su pureza, los Ac's fueron corridos en electroforesis en geles de poliacrilamida junto con marcadores de peso molecular.

En la Figura 2 se muestra el corrimiento electroforético de los Ac's, y como puede advertirse solamente se observan las cadenas pesadas y las cadenas ligeras; indicándonos esto que los Ac's se encuentran puros. Para verificar los pesos moleculares de ambas cadenas; con los marcadores de peso molecular se hizo una curva de calibración que se muestra en la Gráfica 4.

Al interpolar los valores de Rf de cada una de las cadenas, se determinó un peso molecular de 55,000 Kd para las cadenas pesadas y un peso de 25,000 Kd para las cadenas ligeras.

Ag's proteicos Marcadores de PM

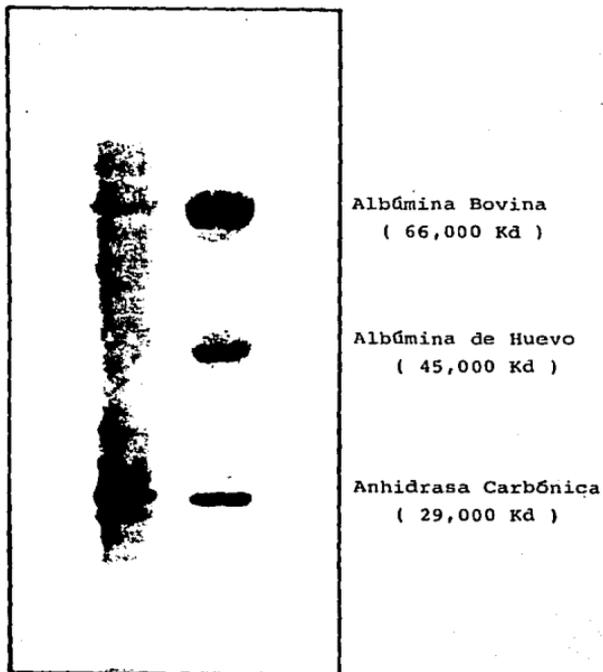
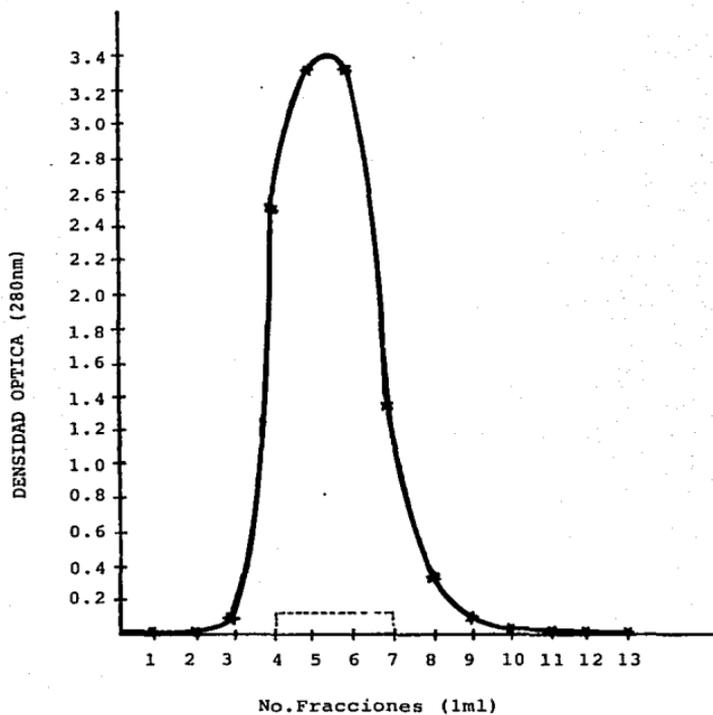
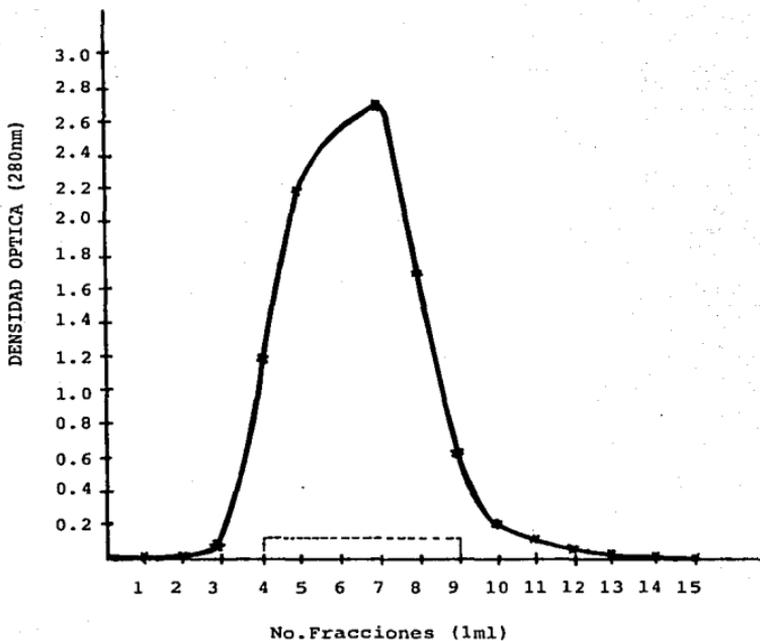


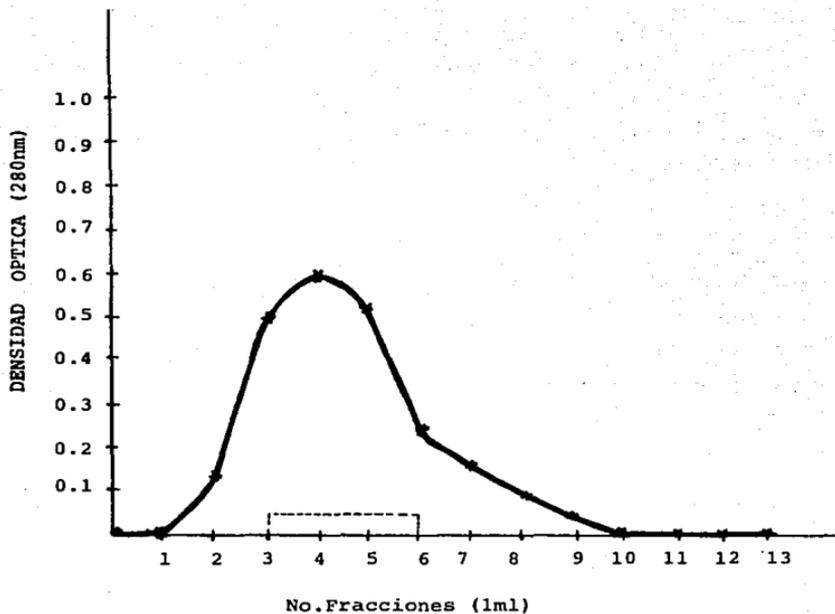
Figura 1.-Ag's proteicos de M.tuberculosis H₃₇RV
(Gel teñido con Azul de Coomassie).



Gráfica 1.-Fracciones colectadas durante la purificación de Ac's antimicobacteria por columna de Proteína A-Sepharosa.



Gráfica 2.-Fracciones colectadas durante la purificación de Ac's normales de conejo por columna de Sepharosa-Proteína A.



Gráfica 3.-Fracciones colectadas durante la purificación de Ac's antimicobacteria por columna de afinidad.

Anticuerpos

Marcadores de PM

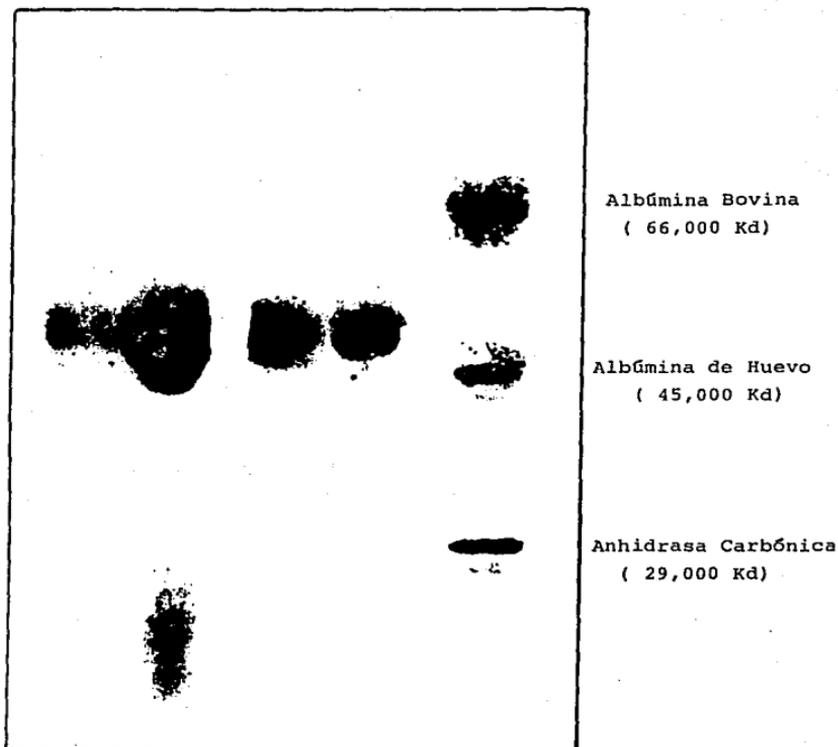
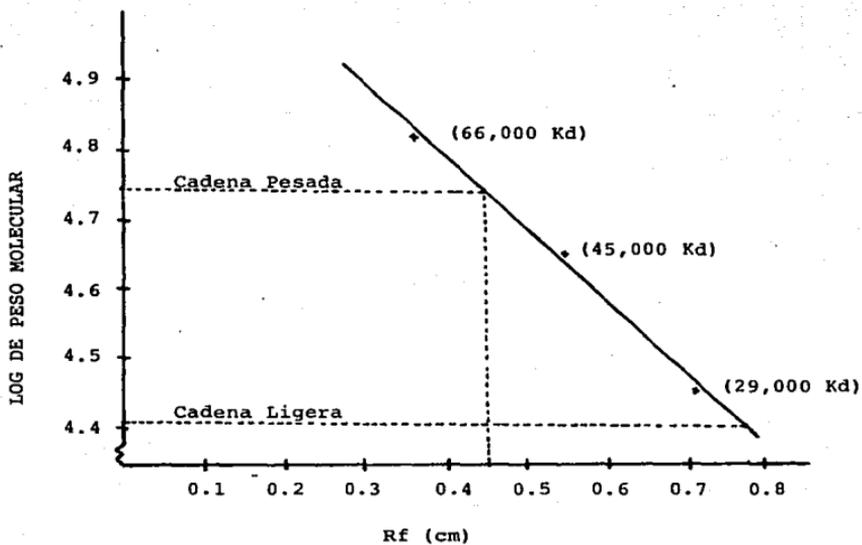


Figura 2.-Anticuerpos purificados y marcadores de peso molecular en electroforesis en gels de poliacrilamida.



Gráfica 4.-Determinación de pesos moleculares de las cadenas pesadas y ligeras.

Análisis de las Muestras.

Técnica de ELISA.

Previamente al análisis de la muestras; en ambos sistemas de ELISA (Sistema I y II) se trabajó con concentraciones conocidas de Ag's micobacterianos, con la finalidad de determinar las cantidades mínimas que cada uno de los sistemas era capaz de detectar. Las concentraciones variaron de 100 a 1 ng/ml. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente Tabla.

Tabla 2.-Comparación de los Sistemas I y II de ELISA para determinar la cantidad mínima de Ag's que detectan.

Ag's (ng/ml)	Sistema I	Sistema II
100	1.49	2.0
50	0.97	1.38
25	0.56	0.90
10	0.12	0.47
5	0.04	0.29
1	-	0.10
PBS-T	0.0	0.0

* D.O. a 490nm

El Sistema I de la técnica de ELISA fue aplicada a las muestras de suero y en la Tabla 3 se presentan los resultados de -- las muestras de suero cuando no fueron tratadas previamente con SDS al 10%; mientras que en la Tabla 4 se muestran los resultados de las mismas muestras cuando fueron tratadas con SDS al 10%.

En la Gráfica 5 se presentan los resultados cuando las muestras no recibieron tratamiento con SDS al 10%. En esta gráfica se estableció un valor de corte de 0.15 de D.O., establecido con la media del grupo control mas una desviación estándar. Los valores iguales ó mayores a 0.15 de D.O. fueron considerados positivos.

En la Gráfica 6 se presentan los resultados de las muestras cuando fueron tratadas con SDS al 10%. En esta gráfica el valor de corte establecido es de 0.30 de D.O.. Este valor fue establecido de la misma forma que en la gráfica anterior.

En las Gráficas 7 y 8 se muestran los resultados por subgrupos.

El Sistema II de la técnica de ELISA fue aplicado a las muestras de LCR y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5, en la Gráfica 9 se muestran nuevamente los resultados. El valor de corte es de 0.17 de D.O. establecido con la media del -- grupo control mas una desviación estándar.

Tabla 3.-Resultados obtenidos al analizar las muestras de suero sin ser previamente tratadas con SDS al 10%;por la técnica de ELISA.

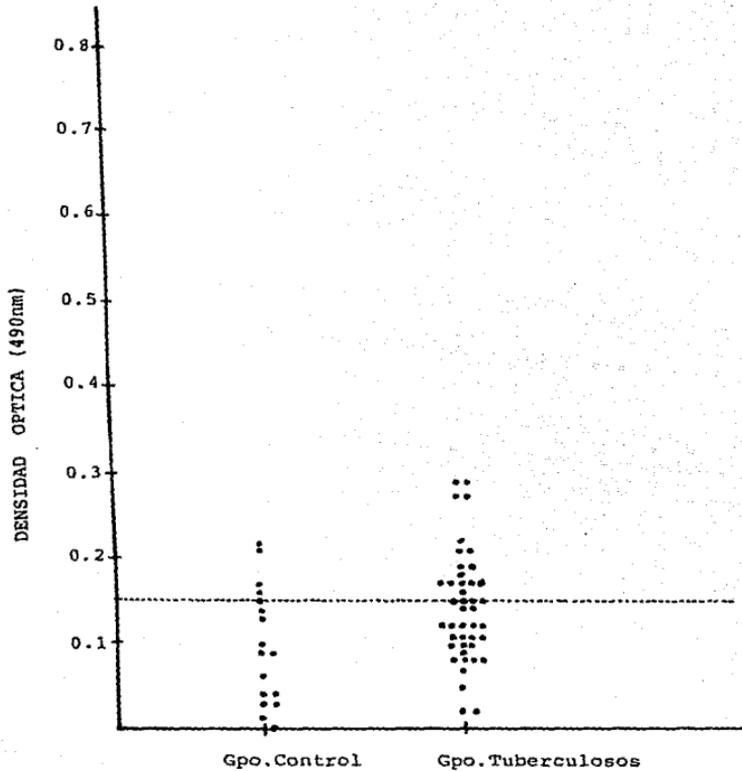
I.-Grupo Control. (n=17)	II.-Grupo de Tuberculosos. (n=43)		
Grupo IA(Sanos)	Grupo IIA(TBM)	Grupo IIB(TBP)	Grupo IIC(TBG)
0.04	0.08	0.12	0.21
0.04	0.15	0.11	0.10
0.03	0.17	0.14	0.17
0.21	0.11	0.02	
0.17	0.09	0.12	
0.13	0.07	0.14	
0.09	0.16	0.27	
0.14	0.12	0.10	
0.09	0.17	0.15	
0.16	0.08	0.21	
0.0	0.11	0.08	
	0.05	0.19	
		0.29	
		0.27	
Grupo IB(Enf.Dif.Tb)		0.15	
0.03		0.12	
0.06		0.15	
0.15		0.19	
0.01		0.11	
0.22		0.18	
0.10		0.17	
		0.17	
		0.08	
		0.12	
		0.02	
		0.29	
		0.22	
		0.10	
* D.O. 490nm.			

TBM=Tb Miliar;TBP=Tb Pulmonar;TBG=Tb Ganglionar.

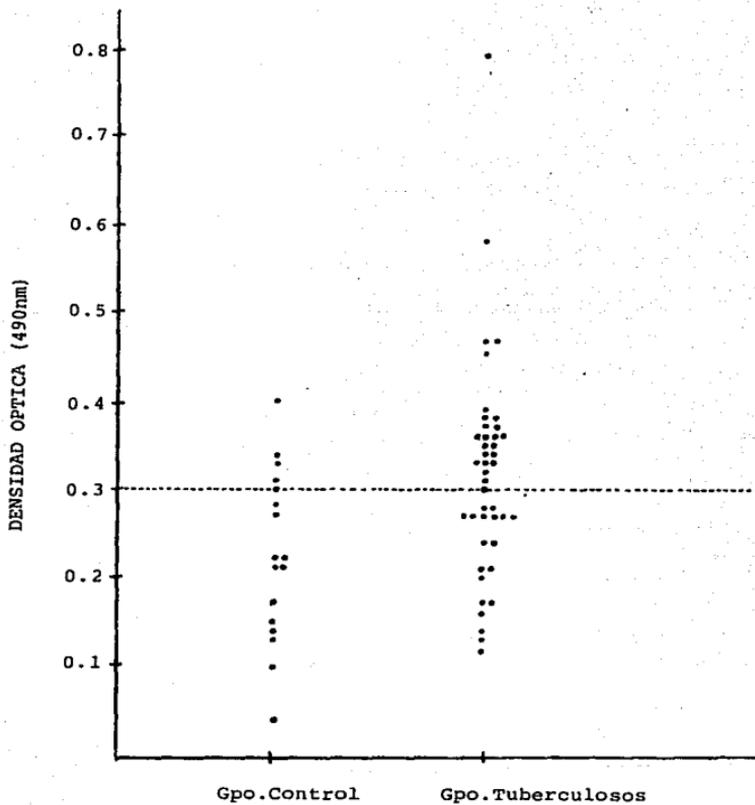
Tabla 4.-Resultados obtenidos al analizar las muestras de suero previamente tratadas con SDS al 10% por la técnica de ELISA.

I.-Grupo Control. (n=17)	II.-Grupo de Tuberculosos. (n=43)		
Grupo IA(Sanos)	Grupo IIA(TBM)	Grupo IIB(TBP)	Grupo IIC(TBG)
0.22	0.13	0.17	0.30
0.30	0.47	0.12	0.27
0.21	0.27	0.36	0.32
0.28	0.34	0.16	
0.31	0.14	0.21	
0.40	0.21	0.20	
0.10	0.33	0.38	
0.17	0.28	0.27	
0.27	0.38	0.24	
0.22	0.58	0.37	
0.15	0.47	0.39	
	0.11	0.27	
		0.34	
		0.35	
		0.79	
Grupo IB(Ent.Dif.Tb)		0.27	
0.14		0.28	
0.21		0.33	
0.33		0.27	
0.04		0.36	
0.34		0.22	
0.13		0.35	
		0.24	
		0.31	
		0.33	
		0.36	
		0.17	
		0.36	
*D.O. 490nm.			

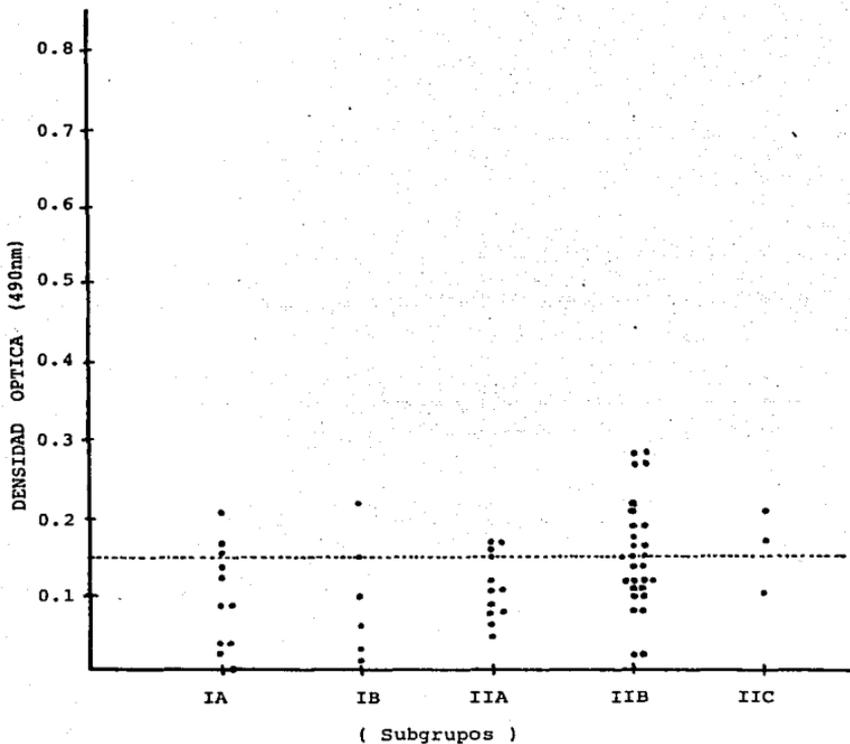
TBM=Tb Miliar;TBP=Tb Pulmonar;TBG=Tb Ganglionar.



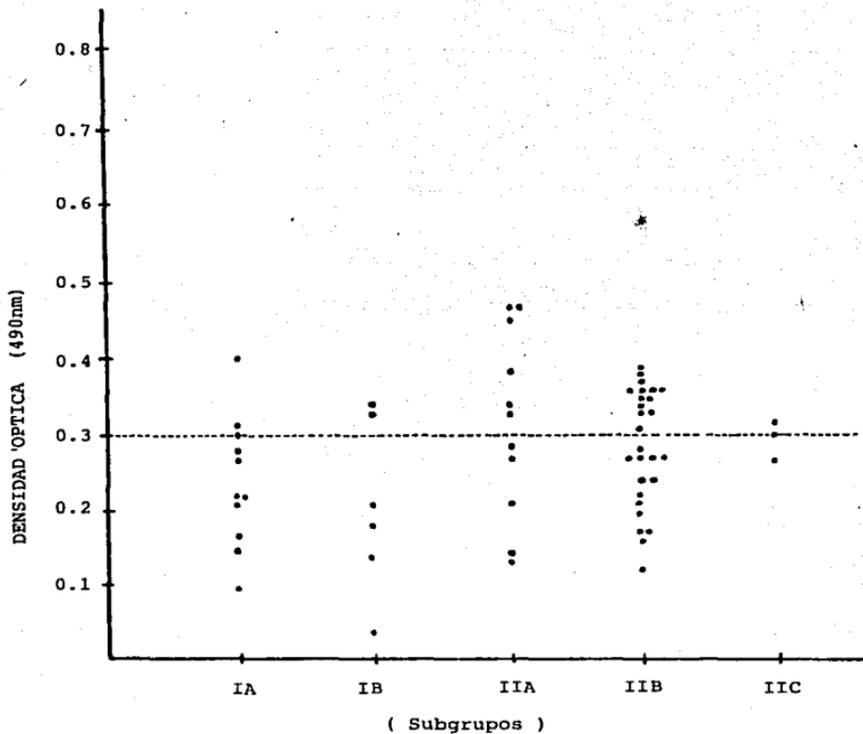
Gráfica 5.-Muestras de suero sin tratamiento con SDS al 10% (Valor de Corte=0.15)



Gráfica 6.-Muestras de suero previamente tratadas con SDS al 10%. (Valor de Corte=0.30)



Gráfica 7.-Análisis de las muestras de suero sin tratamiento con SDS al 10%.



Gráfica 8.-Análisis de las muestras de suero tratadas con SDS al 10%.

Tabla 5.-Análisis de la muestras de LCR por la técnica de ELISA.

Grupo Control. (n=18)	Grupo de Tuberculosos. (n=14)
<p>i) Cultivo negativo.</p> <p>0.19 0.0 0.06 0.0 0.02 0.0 0.0 0.12 0.04 0.0 0.0 0.13 0.06 0.0 0.0</p> <p>ii) Meningitis.</p> <p>0.19 0.0 0.40</p>	<p>iii) Diagnóstico confirmado por cultivo.</p> <p>0.09 0.03 0.81 0.49 0.52 0.0 0.28 0.40</p> <p>iv) Diagnóstico confirmado por cuadro clínico.</p> <p>0.50 0.33 0.61 1.14 0.26 0.92</p>

*D.O. 490nm.

Técnica de Coagulación.

Durante la valoración de los reactivos de Coagulación se obtuvieron los resultados que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 6.-Ag's proteicos sin temperatura.

Ag's ($\mu\text{g/ml}$)	R.C. (-)	R.C. (+)
100	-	+
80	-	+
60	-	+
50	-	+
40	-	+
20	-	+
10	-	+
5	-	+
1	-	-
0.5	-	-
PBS	-	-

R.C. (-)=Reactivo control negativo.

R.C. (+)=Reactivo control positivo.

Después de probar los reactivos, se procedió a analizar las muestras de LCR; utilizando como control positivo 100 $\mu\text{g/ml}$ de Ag's proteicos de M. tuberculosis y PBS como control negativo.

Se seleccionaron 20 muestras de LCR, incluyendo 10 del grupo control y 10 del grupo de tuberculosos. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente Tabla.

Tabla 7.-Análisis de las muestras de LCR
por Coaglutinación.

Grupo Control			Grupo de Tuberculosos.		
Mta.	R.C. (-)	R.C. (+)	Mta.	R.C. (-)	R.C. (+)
1	+	+	1	+	+
2	+	+	2	+	+
3	+	+	3	+	+
4	+	+	4	+	+
5	+	+	5	+	+
6	+	+	6	+	+
7	+	+	7	+	+
8	+	+	8	+	+
9	+	+	9	+	+
10	+	+	10	+	+

Para eliminar las reacciones inespecificas; las muestras y las diferentes concentraciones de Ag's proteicos de M.tubercu-
lois fueron sometidas a tratamiento con temperatura durante -
1hr a 60°C.

En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos para las diferentes concentraciones de Ag's proteicos. En cuanto a las -
muestras de LCR, todos los resultados fueron negativos después del tratamiento con temperatura.

Tabla 8.-Ag's tratados con
temperatura.

Antigenos ($\mu\text{g/ml}$)	R.C. (-)	R.C. (+)
100	-	+
80	-	+
60	-	+
50	-	+
40	-	+
20	-	+
10	-	+
5	-	+
1	-	-
0.5	-	-
PBS	-	-

Sensibilidad, Especificidad y Eficiencia.

Para evaluar los sistemas de ELISA y la técnica de Coagulación como métodos de diagnóstico se calcularon parámetros que en la siguiente tabla se muestran:

Tabla 10.-Evaluación de la técnica de ELISA y Coagulación.

	Sens. (%)	Esp. (%)	Ef. (%)
Suero sin tratar con SDS. (Sistema I)	46.5	70.6	53.3
Suero tratado con SDS. (Sistema I)	53.5	70.6	58.3
LCR. (Sistema II)	78.5	83.3	81.2
Coagulación (LCR)	0.0	100	50

Análisis Estadístico.

El análisis de Varianza fue aplicado a los resultados de la técnica de ELISA. las hipótesis consideradas fueron:

H_0 = No hay diferencia entre el Grupo Control y el Grupo de Tuberculosos.

H_a = Si hay diferencia entre ambos grupos.

Rechace H_0 si $F_{calculada} > F$ de tablas.

Tabla 9.-Comparación entre F calculada y F de tablas.

A) Suero sin tratar con SDS al 10%.

F calculada=5.38 $>$ F tablas=4.0

B) Suero tratado con SDS al 10%.

F calculada=6.9 $>$ F tablas=4.0

c) LCR.

F calculada=42 $>$ F tablas=4.0

Para los tres casos se rechaza H_0 y concluimos que si existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos a $p < 0.05$.

9. DISCUSION.

Los sistemas desarrollados para la técnica de ELISA mostraron la capacidad de detectar cantidades muy pequeñas de Ag's proteicos (5ng/ml), esto puede observarse en la Tabla 2; también puede advertirse que el Sistema II amplifica la señal de la -- reacción Ag-Ac ya que a las mismas concentraciones de Ag las lecturas obtenidas en este sistema son más altas en comparación con el Sistema I.

En los pacientes con Tb se ha demostrado la presencia de CIC, a los que se encuentran asociados Ac's de tipo IgG, IgA e IgM y Ag's micobacterianos (29-32). Estos CIC se forman con los productos de secreción eliminados por la bacteria hacia el exterior, entre los cuales, se encuentran las proteínas. Estos productos de desecho posteriormente llegan a los líquidos corporales, en donde pueden encontrarse en forma libre, o bien, reaccionar con los Ac's formando de esta manera los CIC.

Considerando lo anterior, nosotros analizamos las muestras de suero sin tratarlas previamente con SDS al 10% con la finalidad de detectar Ag's en su forma libre; y también analizamos las -- muestras de suero tratadas previamente con SDS. Este tratamiento tiene como finalidad liberar a los Ag's micobacterianos que se encuentran presentes en los CIC y poderlos determinar junto con los Ag's libres. (31).

Como puede observarse en las Gráficas 5 y 6 todos los valores al igual que el valor de corte se incrementaron con el tra-

tamiento con SDS;este comportamiento puede constituir una evidencia de que se están liberando los Ag's de los CIC y que se están detectando junto con los que se encuentran libres.

Cabe hacer énfasis en el comportamiento por subgrupos mostrados en las Gráficas 7 y 8. En lo que se refiere al grupo control (IA y IB) el tratamiento con SDS no genera diferencia en cuanto al número de negativos y falsos positivos; algo semejante se -- observa en los subgrupos IIB y IIC del grupo de tuberculosos; sin embargo, si se advierte una diferencia en el grupo IIA; ya que -- cuando se da el tratamiento con SDS se incrementa el número de positivos de 4 a 7, incrementándose además la lectura de los positivos. Esto nos hace pensar que en los subgrupos IIB y IIC los Ag's se encuentran predominantemente en forma libre; mientras -- que en el subgrupo IIA se encuentran predominantemente en forma de CIC.

El tratamiento con SDS además repercute en la sensibilidad y la eficiencia de ésta técnica; ya que la sensibilidad se incrementa de 46.5% a 53.5% y la eficiencia de 53.3% a 58.3%; y no se registra cambio en la especificidad que se mantiene en 70.6%.

El Sistema II de ELISA aplicado a las muestras de LCR fue -- desarrollado con la finalidad de contar con un sistema más espe cífico y que amplifique aún más la señal de la reacción Ag-Ac (Tabla2).

Como puede observarse en la Tabla 9, el Sistema II proporciona una sensibilidad de 78.5%; especificidad de 83.3% y eficiencia de 81.2% siendo mejor que el Sistema I; aunque también debe

considerarse que se están analizando muestras diferentes, y que quizá en esto radique la diferencia; ya que el suero presenta un mayor contenido de proteínas que pueden estar uniéndose de manera inespecífica con los Ac's antimicobacteria.

En lo que respecta a la técnica de Coagulación, ésta presenta algunos problemas; entre ellos se encuentra que debido a las propiedades mostradas por la Proteína A (39-42) se va a unir cualquier Ac IgG incrementando de esta manera reacciones falsas positivas. Pero con la finalidad de disminuir la posibilidad de las reacciones falsas positivas; el reactivo control positivo fue preparado con Ac's antimicobacteria purificados por columna de afinidad (Gráfica 3); de esta manera, nos aseguramos que al *Staphylococcus* se están pegando únicamente Ac's IgG dirigidos contra Ag's proteicos de M. tuberculosis.

Otro de los problemas suele presentarse cuando por condiciones patológicas en la muestra existe una gran cantidad de Ac's IgG, lo que ocasiona una agregación espontánea. Para eliminar este problema se recomienda: a) Hacer una pre-adsorción de la muestra con una suspensión de S. aureus, o bien, b) calentar la muestra durante 1hr a 60°C.

Para las muestras de LCR es poco accesible aplicar el primer método; ya que generalmente se cuenta con volúmenes pequeños de las muestras. Por este motivo para eliminar las reacciones inespecíficas observadas en nuestras muestras (Tabla 7), las muestras fueron tratadas con temperatura.

Sin embargo, también se cuestionó si este tratamiento podría desnaturizar ó no a los Ag's proteicos; y para averiguar esto, el mismo tratamiento fue aplicado a las diferentes concentraciones de Ag.

En la Tabla 8 podemos observar que después del tratamiento - los Ag's proteicos siguen siendo detectados y no hay variación alguna con los resultados anteriores (Tabla 6). En lo que respecta a las muestras todas se negativizaron, pero esto no se debe a la desnaturización de los Ag's proteicos, sino debido a que existen cantidades pequeñas en las muestras y la técnica de -- Coaglutinación está limitada; ya que tiene la capacidad de detectar hasta 5µg/ml; mientras que la técnica de ELISA detecta hasta 5ng/ml.

10. CONCLUSIONES.

- 1.- los sistemas de ELISA desarrollados tienen la capacidad de detectar hasta 5ng/ml de Ag's proteicos.
- 2.- El tratamiento de las muestras de suero con SDS al 10% incrementa la sensibilidad de la técnica de ELISA para detectar Ag's proteicos de la micobacteria de un 46.5% a 53.5%; la eficiencia de 53.3% a 58.3%, y no ocasiona modificación en la especificidad.
- 3.- En Tb miliar los Ag's se encuentran predominantemente en forma de CIC; mientras que en la Tb pulmonar y la Tb ganglionar se encuentran en forma libre.
- 4.- El Sistema II de ELISA aplicado a las muestras de LCR, proporciona una mejor sensibilidad, especificidad y eficiencia.
- 5.- La técnica de Coaglutinación detecta hasta 5µg/ml de Ag's, y esto la limita para el diagnóstico de la enfermedad.
- 6.- Los sueros del grupo control registran un 29.4% de reacciones falsas positivas, lo que nos sugiere una reacción cruzada de los Ac's antimicobacteria con las proteínas séricas.
- 7.- El Sistema I de ELISA aplicado a muestras de suero no es de gran utilidad; sin embargo, el Sistema II aplicado a muestras de LCR puede ser útil en el diagnóstico de la Tb meningea.

11. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Des Prez R., "Tuberculosis", Cecil L., Tratado de Medicina Interna, 14a edición, Edit. Interamericana, México, 1979, p.p. 458-481
- 2.- Wolinsky E., "Mycobacteria", Davis B., Dulbecco R., Microbiology, 3rd edition, Harper & Row, Publishers, U.S.A., 1980, p.p. 723-735
- 3.- Drutz J.D., Grybill J.R., "Enfermedades Infecciosas", Fudenberg H.H., Inmunología Básica y Clínica, 5a edición, Edit. El Manual Moderno, México, 1985, p.p. 632-635
- 4.- Torales T.A., González S., "Tuberculosis", González S., Torales T., Gómez B., Infectología Clínica, Edit. Trillas, México, 1984, p.p. 107-147
- 5.- Jawetz E., Tratado de Microbiología, 5a edición, Edit. El Manual Moderno, México, 1979, p.p. 107-147
- 6.- Koneman E., Allen S., "Micobacterias", Koneman E., Allen S., Diagnóstico microbiológico, Edit. Médica Panamericana, Argentina, -- 1983, p.p. 401-427
- 7.- Muñoz O., Gutiérrez G., "Tuberculosis e infecciones por micobacterias atípicas", Kumate J., Gutiérrez G., Manual de Infectología, 8va edición, Edit. Francisco Méndez Cervantes, México, 1981, p.p. 109-123
- 8.- Farer L., "Mycobacterium tuberculosis: Bacteriology, Epidemiology and Treatment", Mandel G., Douglas R., Bennette J., Principles and practice of infectious diseases, Medical Publication John Wiley & Sons, U.S.A., 1979, p.p. 1905-1943
- 9.- Kloos W.E., Smith P.B., "Staphylococci"; Runyon H., "Mycobacterium"; Farnar S.G., Tilton R.C., "Immunoserological and immunochemical detection of bacterial antigens and antibodies", -- Lennette H., Balows A., Manual of Clinical Microbiology, 3rd -- edition, American Society of Microbiology, U.S.A., 1980, p.p. 83-87, 150-179, 528-532

- 10.- Flesch I., Kaufman S.H.. (1987). Mycobacterial growth inhibition by Interferon - γ - activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strain of M.tuberculosis. J.Immunol., 138:12:4408-4413
- 11.- Anti-Tuberculosis Association. (1986). Supplement on Future-Research in Tuberculosis. Am.Rev.Respir.Dis., 134:401-423
- 12.- Edwardw D., Kirkpatrick C.H.. (1986). The immunology of mycobacterial diseases. Am.Rev.Respir.Dis., 134:1062-1071
- 13.- Pacheco C., Olvera R., Herrera M.. (1980). Panorama epidemiológico y control de la Tuberculosis. Sal.Pub.Mex., 23:251-259
- 14.- Kim T., Blackman R., Heatwolek M.. (1984). Acis fast in sputum - smears of pacientes with pulmonary tuberculosis. Am.Rev.Respir.Dis., 129:268-274
- 15.- Steibigrl R., "Mycobacterium tuberculosis", Mandel, Douglas, - Bennette, Principles and Practice of Infectious Diseases, Medical Publication John Wiley & Sons, U.S.A., 1979, p.p. 1905-1943
- 16.- Kennedy D., Fallon R.. (1979). Tuberculous meningitidis. J.A.M.A., 241:264-268
- 17.- Lenzini L., Roltoi P., Roltoi L.. (1977). The spectrum of human Tuberculosis. Clin.Exp.Immunol., 27:230
- 18.- Winters D., Cox R.. (1981). Serodiagnosis of Tuberculosis by - Radioimmunoassay. Am.Rev.Respir.Dis., 124:582-585
- 19.- Kadival G., Samuel A., Mazarelo T., Chaparas S.. (1987). Radio - immunoassay for detenting M.tuberculosis antigen in cerebrospinal fluids of patients with tuberculoos meningitidis. J.Inf.Dis., 155:4:608-611
- 20.- Yolken R.H.. (1982). Enzyme immunoassay for the detection of infectious in body fluids: Current limitations and future - prospects. Rev.Inf.Dis., 4:1:35-68
- 21.- Yolken R.H.. Enzyme analysis for the diagnosis of infectious diseases. Annals New York Academy of Sciences. p.p. 223-229

- 22.- Kenny G.E., Dunsmoor C.L.. (1983). Principles, problems and - strategies in the use of antigens mixtures for the Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay. J.Clin.Microbiol., 17:4:655-665
- 23.- Engval E.. (1980). Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT. Methods of Enzymology, 70:419-439
- 24.- Stroebel A., Daniel T., Lau H.. (1982). serologic diagnosis of bone and joint tuberculosis by an Enzyme-Linked-Immunosorbent assay. J.Inf.Dis., 146:2:280-283
- 25.- Jagannath C., Sengupta D.N.. (1985). Serology of Tuberculosis. Crossed immunoelectrophoretic analysis of sera from tuberculosis and leprosy patients with antigens from BCG. Tubercle, 66:277-287
- 26.- Daniel T.M., Benjamin M.D., Sebanne S.M.. (1985). ELISA of IgG antibody to M.tuberculosis antigen 5 for serodiagnosis of tuberculosis. Indian J.Pediatr., 52:349-355
- 27.- Gandhi B., Bhargava D., Irshad M.. (1986). Enzyme Protein A:An ELISA for detection of IgG antibodies against M.tuberculosis in intestinal tuberculosis. Tubercle, 67:219-224
- 28.- Daniel T., De Murillo G., Sawyer J.. (1986). Field evaluation of Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay for the serodiagnosis of tuberculosis. Am.Rev.Respir.Dis., 134:662-665
- 29.- Samuel A., Ashtekar M., Ganatra R.. (1984). Significance of - circulating immune complexes in pulmonary tuberculosis. Clin.Exp.Immunol., 58:317-324
- 30.- Bhattacharya A., Ranadive S., Kale M.. (1986). Antibody-Based Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay for determination of - Immune Complexes in clinical tuberculosis. Am.Rev.Respir.Dis., 134:205-209
- 31.- Patil S., Sinha S., Sengupta U.. (1986). Detection of mycobacterial antigens in leprosy serum immune complex. J.Clin.Microbiol., 24:1:169-171
- 32.- Johnson N., McNichol M.. (1981). Circulating Immune Complexes in Tuberculosis. Thorax, 36:610-617

- 33.- May J., Katilus J., Henson P.. (1983). The purification and -
identification of circulating immune complexes in Tubercu
losis. Am.Rev.Respir.Dis., 128:920-925
- 34.- Sada E., Ruiz-Palacios G.. (1983). Detection of mycobacterial
antigens in cerebrospinal fluid of patients with tubercu -
lous meningitidis by Enzyme-Linked-Immunsorbent Assay.
Lancet, 17:651-652
- 35.- Bal V., Kamat R., Kandoth P.. (1983). Enzyme-Linked-Immunsor
bent Assay for mycobacterial antigens.
Indian J.Med.Res., 78:477-483
- 36.- Yañes M., Coppola M. Russo D.. (1986). determination of myco-
bacterial antigens in sputum by Enzyme Assay.
J.Clin.Microbiol., 23:5:822-825
- 37.- Kadival G., Mazarelo T.. (1986). Sensibility and specificity of
Enzyme-Linked-Immunsorbent Assay in the detection of --
antigens in tuberculous meningitidis cerebrospinal fluids.
J.Clin.Micribiol., 23:5:901-904
- 38.- Krambovitis E., Harris M.. (1986). Improves serodiagnosis of
tuberculosis using two assay test.
J.Clin.pathol., 39:779-785
- 39.- Earl A.E.. The use of sensitized Protein A-containing sta-
phylococci to rapidly identify microbial antigens.
- 40.- Pharmacia Fine Chemicals. (1985). Protein A Sepharose CL-4B
for cell surface and immunoglobulin studies.
- 41.- Forsgren A., Sjöquist J.. (1966). "Protein A" from S.aureus.
Pseudoimmune reaction with human - γ - globulin.
J.Immunol., 97:1:822-827
- 42.- Boyle M.. (1984). Applications of bacterial Fc receptors in
immunotechnology. Biotechniques, 334-340
- 43.- Bywater R., Ericksoon G.. (1983). Desorption of immunoglobu-
lins from Protein A-Sepharose CL-4B under mild conditions.
J.Immunol.Methods, 64:1-6
- 44.- Sjöholm I., Bjerckén A.. (1973). Protein A from S.aureus. The
effect of nitration of Protein A with tetranitro methane
and subsequent reduction. J.Immunol., 110:6:1562-1568

- 45.- Dobre M., Mota G., Sjöquist J.. (1984). Selective affinity of Protein A containing staphylococci for monomeric and polymeric IgG. J.Immunol.Methods, 66:171-178
- 46.- Kronval G.. (1973). A slide agglutination method for typing pneumococci by means of specific antibody absorbed to Protein A containing staphylococci. J.Med.Microbiol., 6:187-190
- 47.- Leinonen M., Käyhty H.. (1978). Comparison of counter current immunoelectrophoresis, latex agglutination and radioimmunoassay in detection of soluble capsular polysaccharide antigens of H.influenzae type b and N.meningitidis of groups - A or C. J.Clin.Pathol., 31:1172-1176
- 48.- Olcén P., Danielsson D.. (1975). The use of Protein A containing staphylococci sensitized with anti-meningococcal antibodies for grouping N.meningitidis and demonstration of meningococcal antigen in cerebrospinal fluid. Act.Pathol.Microbiol.Scand.Sect., 83:387-396

12. A P E N D I C E.

1.- Solución Amortiguadora de Carbonatos (0.05M, pH=9.6)

Na_2CO_31.59g

NaHCO_32.93g

Disolver en agua destilada y ajustar el pH antes de aforar a 1l. Conservarla a 4°C.

2.- Solución Amortiguadora de Citratos (0.1M, pH=5.0)

Citrato de Sodio.....29.4g

Disolver en agua destilada y ajustar el pH con ácido fosforico antes de aforar a 1l. Conservarla a 4°C.

3.- Solución Amortiguadora de Fosfatos-Salina (0.1M, pH=7.2)

Solución A (0.2M)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$27.6g

Solución B (0.2M)

Na_2HPO_4 anhidro.....28.4g

Disolver cada una de las sales en agua destilada y aforar a 1l.

Mezclar: Solución A.....165ml

Solución B.....335ml

NaCl74g

Agregar agua destilada y ajustar el pH con NaOH concentrada antes de aforar a 1 l. Conservarla a temperatura ambiente.

- 4.- Solución Amortiguadora de Fosfatos-Salina (0.01M,pH=7.2)
Hacer una dilución 1:10 de la solución anterior (3) con agua destilada y ajustar el pH.Conservarla a 4°C.
- 5.- Solución Amortiguadora de Fosfatos-Salina con Tween 20 al 0.05%.
Tomar 100ml de la solución (3) y adicionar agua destilada; posteriormente agregar 500µl de Tween 20 y aforar a 1 l ajustando antes el pH a 7.2.Conservarla a 4°C.
- 6.- Acido Sulfúrico 2.5M.
Tomar 13.3ml de ácido sulfúrico concentrado y adicionarlo lentamente al agua destilada y aforar a 100ml.Conservarlo a 4°C.
- 7.- Solución Amortiguadora de Glicina-HCl (0.1M,pH=2.8)
Glicina.....7.5g
Disolverla en agua destilada y ajustar al pH con HCl antes - de aforar a 1l.Conservarlo a 4°C.
- 8.- Solución Amortiguadora de Tris (1.5M,pH=8.0)
Tris.....45.4g
Disolver en agua destilada y ajustar el pH antes de aforar - a 250ml.Conservarlo a 4°C.
- 9.- Solución Amortiguadora de Bicarbonatos (0.1M,pH=8.0)
NaHCO₃.....8.4g
Disolver en agua destilada y ajustar el pH antes de aforar a 1 l.Conservarla a 4°C.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 10.- Solución Amortiguadora NaHCO_3 0.1M; NaCl 0.5M, pH=8.3.
NaHCO₃.....2.1g
NaCl.....7.3g
Disolver en agua destilada y ajustar el pH antes de aforar a 250ml. Conservarla a 4°C.
- 11.- Solución Amortiguadora de Acetatos 0.1M; NaCl 0.5M, pH=4.0
Acido acético glacial.....1.4ml
NaCl.....7.3g
Disolver en agua destilada y ajustar el pH antes de aforar a 250ml. Mantenerla a 4°C.
- 12.- Solución Amortiguadora de Tris 0.1M; NaCl 0.5M, pH=8.0
Tris.....3.0g
NaCl.....7.3g
Disolver en agua destilada ajustando el pH antes de aforar a 250ml. Mantenerla a 4°C.
- 13.- Sustrato de Peroxidasa.
O-Fenilendiamina.....4mg
Peróxido de Hidrógeno...5µl
Solución Amortiguadora de Citratos...10ml