

7af



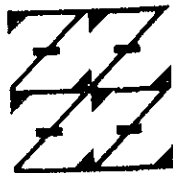
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

"Determinación de los títulos de anticuerpos
IgA, IgG e IgM anti S. pyogenes por la prueba ELISA
en saliva y su correlación con el estudio
microbiológico".

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
SILVERIA RAMIREZ MARCIAL

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXION

ASESOR: DR. RUBEN MARROQUIN SEGURA

MEXICO, D. F.

1998

258200

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La fuerza del conocimiento no reside en el grado de verdad que tenga, sino en su antigüedad, en su grado de asimilación, en su carácter de condición vital.

(Federico Nietzsche: "La Gaya Ciencia").

***¿Cómo oponer a la opulencia de la mentira, la verdad de la miseria?
(A. Montalbán en honor a los indígenas tzoltziles asesinados en Chiapas).***

DEDICATORIAS:

A mis padres, hermosos seres que cada día me brindan amor, comprensión y apoyo incomparables:

**Noé Ramírez Pérez
Altagracia Marcial Paz.**

A mi hermano, magnífico amigo, siempre dispuesto a ayudarme; sin sus acertados consejos no hubiera sido posible la culminación de éste trabajo:

Neptalí.

A mis hermanas, quienes han estado cerca para alentarme, mujeres con un espíritu combativo de lucha y superación incansable.

**Graciela
Evangelina
Silvia
Mirna Esperanza
Gabriela.**

A mi esposo, hombre generoso, compañero con gran fuerza de voluntad en situaciones difíciles, gracias por existir:

Fernando Castellanos Ramírez

A mis hijos, árboles de mi salud y mi mejor tierra, los amo:

Montserrat e Isaac Noé.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco sinceramente a mis maestros Sinodales, por su amable disponibilidad y colaboración para revisar y corregir éste trabajo, el cual se realizó en el Laboratorio L-313 de Inmunología, bajo la asesoría del Dr. Rubén Marroquín Segura.

PRESIDENTE:	Dr. Rubén Marroquín Segura
VOCAL:	Q.F.B. José Luis Mora Guevara
SECRETARIO:	M. en C. Catalina Machuca Rodríguez
SUPLENTE:	M. en C. Teresa Corona Ortega
SUPLENTE:	Q.F.B. Yolanda Flores Cabrera

CONTENIDO

INDICE DE CUADROS	ix
INDICE DE FIGURAS	xi
INDICE DE GRAFICAS	xii
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
I. MARCO TEORICO	3
1. GENERALIDADES	3
2. PATOGENIA Y DATOS CLINICOS	7
3. RESPUESTA INMUNE ORAL	11
4. FUNDAMENTO TEORICO DE TECNICAS Y METODOS	16
II. FUNDAMENTACION DEL TEMA	35
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
IV. OBJETIVOS	40
V. HIPOTESIS	41
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL	42
A. MATERIAL	42
B. METODOS	48
VII RESULTADOS	60
VIII. DISCUSION	78
IX. CONCLUSIONES	82
X. ANEXOS	83
XI. REFERENCIAS	94

FALTAN PAGINAS

De la: **I**

A la: **VIII**

INDICE DE CUADROS

ix

CUADRO	PAGINA
I	32
II	33
III	34
1	64
1A	64
2	65
2A	65
3	66
3A	66
4	76
5	77
6	77
7	77

FALTA PAGINA

No. **X**

INDICE DE FIGURAS
xi

FIGURA	PAGINA
1	4
2	10
3	13
4	17
5	21
6	22
7	24
7A	25
8	49

INDICE DE GRAFICAS

xii

GRAFICA	PAGINA
1	61
2	62
3	68
4	69
5	70
6	72
7	73
8	74

RESUMEN

En el presente trabajo, se llevó a cabo una evaluación de dos métodos para la identificación de *S.pyogenes*, el *microbiológico* o tradicional de cultivo en agar sangre de carnero al 5% y el *inmunoenzimático* ELISA. La identificación microbiológica, se realizó a partir de exudados faríngeos de pacientes con infección de la garganta, sintomáticos y asintomáticos. Así también, se obtuvo el carbohidrato C de Lancefield por el método Rantz y Randall; el cual, fué utilizado como antígeno en la determinación de anticuerpos en saliva de los mismos pacientes (IgA, IgG e IgM) por medio de la técnica ELISA.

El análisis de varianza mostró que existen diferencias estadísticamente significativas dentro y entre los grupos estudiados; considerando los títulos de anticuerpos IgA, IgG e IgM en relación a la condición del paciente (enfermos positivos con *S.pyogenes* o sanos negativos a *S.pyogenes*).

Se obtuvieron valores de Sensibilidad: 24.13% para IgA, 51.72% para IgM y 34.48% para IgG. Especificidades de: 96.96% para IgA y 95.45% para IgM e IgG. Valor predictivo positivo de 70%, 76.9% y 83.3% para IgA, IgG e IgM respectivamente. Valor predictivo Negativo de 74.11% para IgA, 76 82% para IgG y 72.41% para IgM.

De la correlación entre ambos métodos se concluye que la elevada especificidad del ensayo inmunoenzimático ELISA, implica menor tiempo de espera de resultados que por el ensayo microbiológico; y por lo tanto, el oportuno diagnóstico del paciente disminuirá considerablemente el desarrollo de fiebre reumática y glomerulonefritis aguda, tanto en niños como en adultos.

INTRODUCCION

Los estreptococos del grupo A, al cual pertenece *Streptococcus pyogenes* tienen gran importancia médica, no sólo por su papel en la Faringitis estreptocócica aguda y en otras enfermedades piogénicas; sino también por su asociación con las secuelas post-estreptocócicas: fiebre reumática y glomerulonefritis aguda, por lo que su detección inmunológica y/o microbiológica es imperativa para iniciar la terapia médica pertinente.¹⁻⁷

En 1966, Zabriskie y Freimer, inmunizaron conejos con membranas estreptocócicas. Los anticuerpos tenían reacción cruzada con tejido cardíaco humano, músculo esquelético de vasos sanguíneos; pero no con músculo liso uterino.⁸ Estos estudios confirman que los estreptococos grupo A en humanos, contienen antígeno que presenta reacción cruzada con tejido del corazón, articulaciones y piel. Los anticuerpos están presentes en el tiempo crítico de la enfermedad para desaparecer y reaparecer por períodos recurrentes.

Existen numerosas pruebas de laboratorio para la detección de estreptococos de los grupos A, B, C, F y G (Phadebact, Streptosec, Microstrep); basadas en la coagulación con látex.⁹ Así también, Ventrescreen (Ventrex), es una prueba rápida de inmunoensayo enzimático para detectar antígeno estreptocócico grupo A a partir de exudados faríngeos.¹⁰

En el presente trabajo, nos propusimos determinar los títulos de anticuerpos IgA, IgG e IgM en saliva de pacientes infectados y no infectados con *Streptococcus pyogenes*; utilizando la técnica ELISA para comparar la rapidez y eficacia del inmunoensayo enzimático con respecto al método microbiológico o cultivo tradicional en agar sangre de carnero al 5%.

I. MARCO TEORICO

1. GENERALIDADES.

Los estreptococos son bacterias en forma de cocos, esféricos ovoides o en forma de lanceta, son positivos a la tinción de Gram y se observan microscópicamente en pares o en cadenas.¹¹

Son anaerobios facultativos, algunas cepas necesitan bióxido de carbono al inicio de su aislamiento. Son oxidasa y catalasa negativos, no hidrolizan el hipurato, no crecen en NaCl al 6.5%, no hidrolizan la bilis esculina al 4%.⁹

En agar sangre de carnero al 5%, las colonias de estreptococos del grupo A son pequeñas, de 1mm de diámetro, son duras, de color blanco a gris opaco, desarrollando una beta hemólisis de aproximadamente 2 mm de ancho. Son sensibles a la Bacitracina (0.04 U), formando un halo de inhibición.¹²⁻¹⁵

Cuando se coloca directamente sobre la placa un disco de sulfametoxazol-trimetoprim, se facilita la identificación de las áreas de beta hemólisis.¹⁶

La máxima detección de estreptococos grupo A, de especímenes obtenidos de gargantas infectadas, principalmente de niños, se encuentra con la incubación anaeróbica.^{9,14}

1.1. ESTRUCTURAS ANTIGENICAS DE *Streptococcus pyogenes*.

Los estreptococos del grupo A, presentan diversas estructuras antigénicas en la pared celular (Fig.1).¹⁷

PARED CELULAR

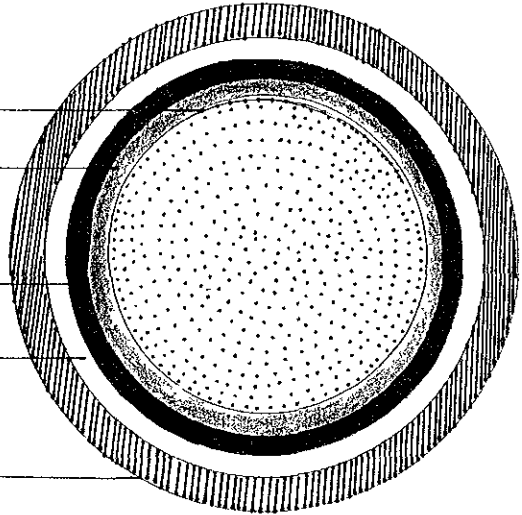
Membrana Celular

Mucopéptido: Peptidoglucana

Carbohidrato de grupo

Proteínas M, R y T

Acido hialurónico

Figura 1. Componentes de la pared celular de *Streptococcus pyogenes*¹⁷

1.1.a) Cápsula de Acido Hialurónico:

El estudio de la pared celular de *S. pyogenes*, es esencial para el entendimiento de los mecanismos de patogenicidad de este microorganismo. La capa más externa es la cápsula de ácido hialurónico, la cual le da su apariencia mucóide cuando crece en medios sólidos (Giono, 1974). Esta cápsula actúa como un factor de virulencia que lo protege de la fagocitosis.

1.1.b) Antígeno específico de grupo de la pared celular.

Los antígenos específicos de grupo, descritos por Lancefield (1930), son considerados como la característica más importante para la identificación de estreptococos beta hemolíticos. Mediante éste antígeno específico (un carbohidrato), éstos microorganismos se clasifican en los grupos A-U. Los grupos A, B, C y D, son los más importantes como causantes de enfermedades en humanos.

La especificidad serológica del carbohidrato específico de grupo está determinada por la presencia de un aminoazúcar. Para los estreptococos del grupo A, el carbohidrato es la ramnosa-N-acetilglucosamina.

McCarty y col. (1970), identificaron la estructura del carbohidrato del grupo A, como una cadena polisacárida constituida por nueve unidades de ramnosa cubiertas por una cadena de N-acetilglucosamina. Esta cadena es inmunodominante dando especificidad al grupo estreptocócico.

1.1.c) Proteína M.

La proteína M es una molécula dimérica que se extiende desde la superficie de la célula, como una fibra de dos cadenas superenrolladas. Hay dos clases estructurales de proteína M: I y II. Las moléculas del grupo I, comparten un dominio antigénico que está presente en muchos de los serotipos que causan fiebre reumática. El grupo II no tiene ésta secuencia, produce una enzima llamada "factor de opacidad" y no se ha asociado a casos de fiebre reumática.

La proteína M se relaciona estrechamente con la virulencia de los estreptococos del grupo A. Interfiere en la ingestión de estreptococos virulentos por células fagocitarias y determina la especificidad del tipo de los estreptococos grupo A; mediante pruebas de aglutinación y precipitación con sueros específicos.

M. Lancefield (1962), reveló por lo menos 80 proteínas M diferentes, con características de ser antifagocitos *in vitro*,⁸ debido a ésto, una persona puede tener infecciones repetidas por *S.pyogenes* con proteínas M diferentes.

1.1.d) Sustancia T.

Este antígeno no se relaciona con la virulencia de los estreptococos. A diferencia de la Proteína M, es termo y ácido lábil. Se obtiene de los estreptococos por digestión proteolítica, que destruye con rapidez las proteínas M.

La sustancia T permite diferenciar algunos tipos de estreptococos por aglutinación con antisueros específicos, en tanto que otros tipos de estreptococos comparten la misma sustancia T. Otro antígeno más de superficie se denomina **Proteína R**.

1.1.e) Nucleoproteínas.

La extracción de los estreptococos con álcalis diluídos, proporciona mezclas de proteínas y algunas otras sustancias de poca especificidad serológica, se les denomina **Sustancias P**, y quizás formen la mayor parte del cuerpo del estreptococo.

1.2. PRODUCTOS EXTRACELULARES (TOXINAS Y ENZIMAS).^{17, 19}

Los estreptococos grupo A, elaboran más de 20 productos extracelulares antigénicos; incluyendo los siguientes:

1.2 a) Estreptocinasa: Es producida por cepas beta hemolíticas y provoca la transformación de plasminógeno en plasmina en el suero humano. La estreptocinasa se ha administrado por vía intravenosa para el tratamiento de embolias pulmonares y trombosis venosas.

1.2 b) Estreptodornasa: Enzima despolimerizante del DNA. También se le conoce como desoxirribonucleasa estreptocócica. La estreptocinasa y estreptodornasa, ayudan a fluidificar y remover el pus de lesiones, por lo que, los antimicrobianos tienen mejor acceso, permitiendo la recuperación rápida de superficies infectadas.

1.2 c) Hialuronidasa: Enzima que desdobla el ácido hialurónico, constituyente importante de la sustancia intercelular y del tejido conjuntivo; favoreciendo la diseminación de microorganismos infectantes. Después de una infección debida a un organismo productor de hialuronidasa, se encuentran anticuerpos específicos en el suero del paciente

1.2 d) Toxina eritrógena: Es soluble y se destruye mediante ebullición durante una hora. Provoca el exantema de la Escarlatina.

1.2 e) Difosfopiridina-nucleotidasa: Enzima que se encuentra relacionada con la capacidad del microorganismo para matar a los leucocitos.

1.2 f) Estreptolisina O: Es una proteína de peso molecular de 60,000, con actividad hemolítica, solamente cuando está reducida y se inactiva con el oxígeno.

1.2 g) Estreptolisina S: Es el agente responsable de las áreas de beta hemólisis que se producen alrededor de las colonias de estreptococos en el agar sangre. Es termolábil y puede reactivarse a bajas temperaturas.

2. PATOGENIA Y DATOS CLINICOS.

En el cuadro clínico de la enfermedad estreptocócica, influyen las propiedades biológicas del microorganismo infectante, la naturaleza de respuesta del huésped; así como la puerta de entrada de la infección. Las infecciones estreptocócicas se dividen en varias categorías (A-E):

A) Enfermedades atribuibles a la invasión por estreptococos beta hemolíticos del grupo A (*S. pyogenes*).

En cada enfermedad de ésta categoría, hay una infección difusa que se disemina rápidamente a lo largo de las vías linfáticas y se extiende con rapidez a la circulación sanguínea:

a) Erisipela: Su puerta de entrada es la piel.

b) Fiebre puerperal: Los estreptococos entran al útero después del parto.

c) Infección generalizada: Contaminación de heridas traumáticas o quirúrgicas por estreptococos, generando septicemia estreptocócica.

B) Enfermedades atribuibles a la infección local por estreptococos beta hemolíticos del grupo A y a sus productos:

a) Faringitis estreptocócica: Es la infección más común debida a estreptococos β -hemolíticos. En niños mayores y adultos, se presenta como una enfermedad más aguda, caracterizada por nasofaringitis intensa, amigdalitis, enrojecimiento de mucosas, generalmente los ganglios linfáticos están aumentados y hay fiebre.

b) Pioderma estreptocócica: Infección de las capas superiores de la piel, especialmente en niños, se conoce también como impétigo. Si se disemina, es muy contagiosa, sobre todo en piel eczematosa o quemaduras; consiste en vesículas superficiales que se abren o de pústulas.

C) Endocarditis Infecciosa: Se divide en dos enfermedades:

a) Endocarditis aguda: Hay destrucción rápida de las válvulas, conduce a insuficiencia cardíaca mortal en días o en semanas; a menos que pueda insertarse una prótesis durante la terapia antimicrobiana.

b) Endocarditis subaguda: Afecta sólo a válvulas anormales (por deformaciones congénitas y lesiones reumáticas o ateroscleróticas). La endocarditis subaguda se caracteriza por fiebre, anemia, debilidad, soplo cardíaco, fenómenos de embolia, esplenomegalia y lesiones renales.

D) Otras Infecciones: Diversos estreptococos del grupo D o enterococos, provocan a menudo infecciones del aparato urinario. Algunos estreptococos anaerobios *Peptostreptococcus* y *Bacteroides* pueden provocar lesiones supurativas en heridas; infecciones en las mamas o en la endometritis posparto. Los estreptococos del grupo B, durante el primer mes de vida pueden provocar sepsis fulminante, meningitis o síndrome de insuficiencia respiratoria.

E) Enfermedades posestreptocócicas:

Consecutivamente a una infección aguda por estreptococos del grupo A, especialmente faringitis estreptocócica, hay un período de una a cuatro semanas, después del cual se presenta ocasionalmente, fiebre reumática o glomerulonefritis aguda: *a) Fiebre reumática:* Es la secuela más grave de las infecciones por estreptococos beta hemolíticos del grupo A, debido a que da como resultado, lesiones en válvulas y tejido cardíaco.

El inicio de fiebre reumática va precedido a menudo de infección post-estreptocócica del grupo A, una a cuatro semanas antes; aunque ésta enfermedad puede ser benigna y pasar inadvertida.

Los síntomas y signos característicos de la fiebre reumática son: fiebre, malestar, poliartritis migratoria no supurativa y señales de inflamación por todas las partes del corazón(endocardio, miocardio y pericardio).

Esta carditis conduce en forma característica, a un engrosamiento y deformación de las válvulas y a pequeños granulomas perivasculares en el miocardio (Nódulos de Aschoff), los cuales finalmente son sustituidos por tejido cicatrizal.

Por lo general, el primer ataque de fiebre reumática, provoca sólo pequeñas lesiones en el corazón, las cuales van aumentando con cada ataque subsecuente. Varios estudios revelan que los anticuerpos elevados en animales de experimentación contra varios antígenos celulares del estreptococo reaccionan con el tejido del corazón y otros tejidos del hombre que son afectados por el proceso inflamatorio de la fiebre reumática (Fig.2).²⁰

b) Glomerulonefritis aguda: Esta enfermedad se presenta en algunas personas, tres semanas después de la enfermedad estreptocócica. La glomerulonefritis puede iniciarse por complejos antígeno-anticuerpo, actuando sobre la membrana basal glomerular. Algunos pacientes fallecen, otros desarrollan glomerulonefritis crónica con insuficiencia renal final; la mayoría se recupera por completo.

Markowitz (1969), fue capaz de inducir la glomerulonefritis en monos, inmunizándolos con fracciones de membrana estreptocócica conocidas, para sufrir reacción cruzada con el glomérulo humano.

En la enfermedad humana, un número considerable de estudios tiene implicación de anticuerpos riñón específicos en la glomerulonefritis (Lange, 1958).

La importancia de las reacciones cruzadas para antígenos estreptocócicos y antígenos renales en la glomerulonefritis humana se reforzó por el hallazgo de que pacientes con glomerulonefritis progresiva tuvieron reactividad celular aumentada para antígenos estreptocócicos (Zabriskie, 1971).

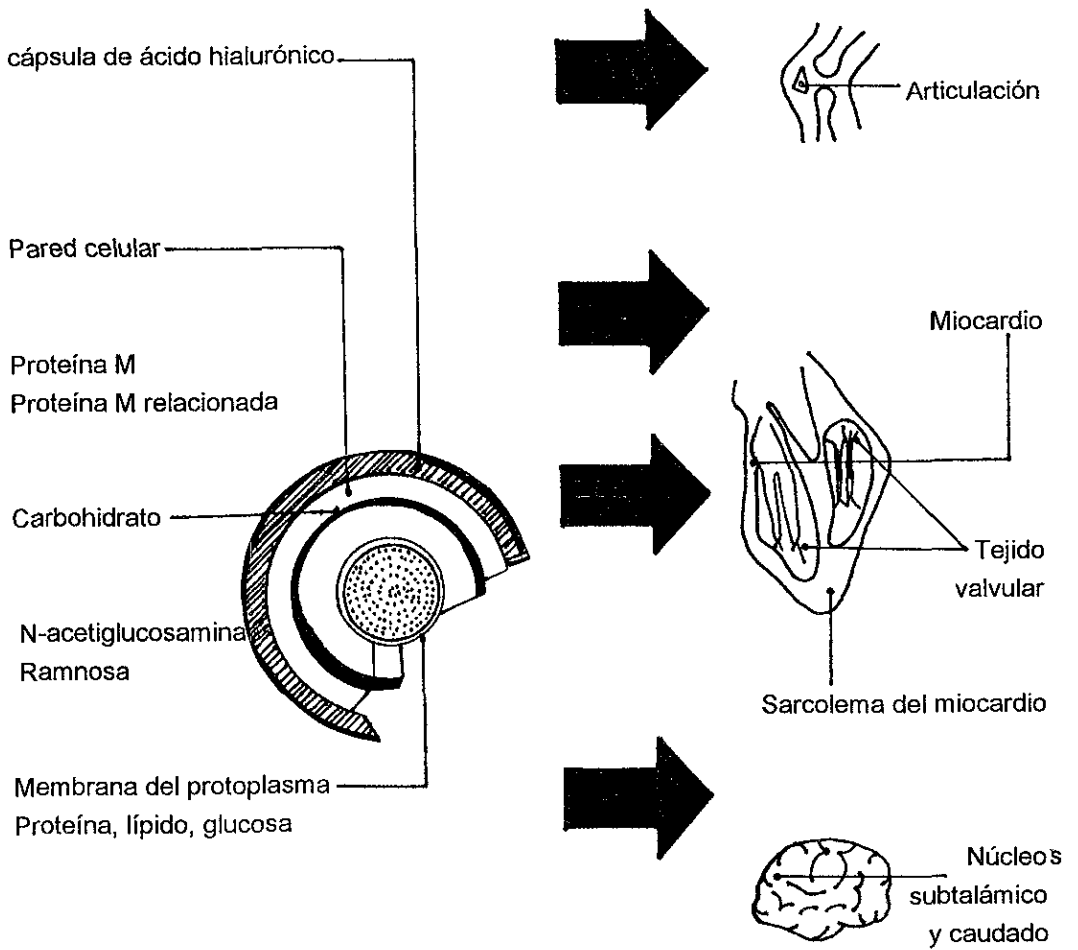


Figura 2. Componentes del estreptococo y tejidos del huésped con los que presentan reacciones cruzadas.²⁰

3. RESPUESTA INMUNE ORAL.

El sistema inmune, es el responsable de mantener la integridad de las estructuras orgánicas del individuo, ante la gran diversidad de agentes extraños agresores o mejor conocidos como *antígenos*.

El sistema inmune secretor de las mucosas tiene la función de impedir el ingreso de antígenos al organismo. Los antígenos ingeridos o inhalados penetran a través de células que recubren la mucosa oral, respiratoria y el tubo digestivo a nivel de los acúmulos linfáticos.

Esta estimulación antigénica, puede inducir la proliferación y diferenciación de células B y T, la migración de éstos linfocitos sensibilizados hacia los tejidos secretorios como las glándulas salivales, en donde las células B se diferencian, proliferan y maduran espontáneamente en células plasmáticas. Estos linfocitos B son grandes productores de anticuerpos. Si hay estimulación antigénica local continua, ocurre proliferación de las células y la respuesta de anticuerpos secretores es mayor y más persistente.

Un antígeno puede desencadenar la producción de *anticuerpos*, llamados también *inmunoglobulinas (Igs)* de diferentes tipos: IgA, IgG, IgM, IgD e IgE; los cuales, tienen propiedades biológicas e inmunológicas distintas:

3.1. *Propiedades biológicas e inmunológicas de las inmunoglobulinas.*^{21, 22}

Los antígenos provocan la producción de anticuerpos en el organismo. Los anticuerpos o inmunoglobulinas, son glucoproteínas compuestas de 82-96% de polipéptidos y de 4-18% de carbohidratos. El componente polipeptídico posee casi todas las propiedades biológicas asociadas con las moléculas de anticuerpos.

Porter, propuso la estructura básica de las inmunoglobulinas o anticuerpos, como un modelo simétrico de cuatro péptidos que consiste en dos cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H), unidas entre sí por puentes disulfuro covalentes, que forman una estructura simétrica bilateral. Cada cadena del anticuerpo, consta de una porción carboxilo terminal constante, que tiene la misma secuencia de aminoácidos (C) y de una porción amino terminal variable (V), donde la secuencia de aminoácidos es diferente para cada anticuerpo y constituye el lugar de reacción para el antígeno.²³

La zona de las cadenas H en la región C (CH1 y CH2), constituye la región de la bisagra. Es más flexible y está más expuesta a las enzimas y a las sustancias químicas. Por lo tanto, la papaína actúa produciendo fragmentos Fab y Fc.²⁰

Existe un tipo químicamente diferente de cada cadena pesada para cada una de las cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgM, IgG, IgD, IgE ($\alpha, \mu, \gamma, \delta, \epsilon$).

Se conocen cinco clases de cadenas pesadas en el humano, basadas en diferencias de estructura en las regiones constantes, IgD, IgE y particularmente de interés para nuestro estudio: IgA, IgM e IgG.

3.1.a) Inmunoglobulina D (IgD).

Es un monómero de peso molecular de aproximadamente 180,000 daltons (7-8S), es ligeramente más alto que IgG (150,000 daltons con 6-7S). Esta inmunoglobulina está presente de manera normal en el suero en cantidades mínimas, 0.2% del total de las inmunoglobulinas séricas.

Existen informes aislados de IgD con actividad de anticuerpo para ciertos antígenos incluyendo la insulina, la penicilina, las proteínas de la leche, el toxoide diftérico, los antígenos nucleares y los antígenos tiroideos.

3.1b) Inmunoglobulina E (IgE).

La IgE tiene un peso molecular de 190,000 daltons (8S). Comprende sólo un 0.004% del total de las inmunoglobulinas séricas. Al combinarse con ciertos antígenos específicos llamados alérgenos, los anticuerpos IgE desencadenan la liberación, a partir de las células cebadas, de los mediadores farmacológicos responsables de la roncha y de las reacciones de brote urticarial sobre la piel, evocadas por la exposición de la piel de los individuos alérgicos a los alérgenos.

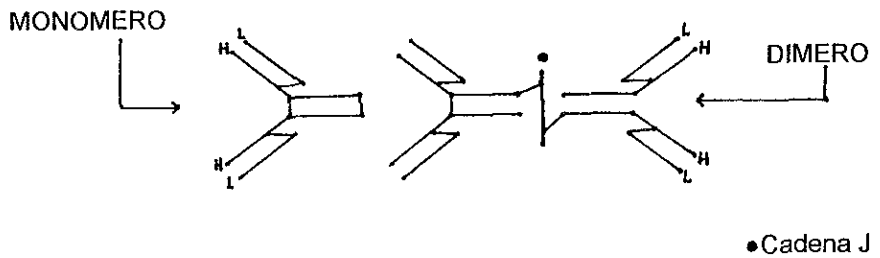
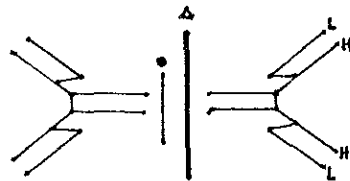
Los anticuerpos IgE fijan el alérgeno mediante la porción Fab, pero el enlace de los anticuerpos IgE con las células de los tejidos constituye una función de la porción Fc.

También se observa su participación en la defensa del organismo contra infecciones parasitarias.

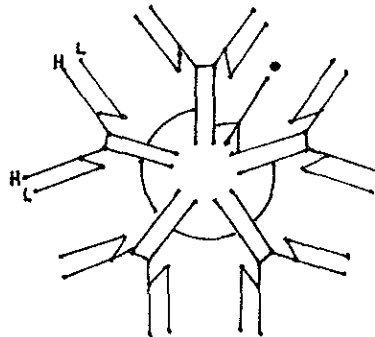
3.1.c) Inmunoglobulina A (IgA).

La IgA constituye la inmunoglobulina predominante en las secreciones externas del cuerpo de la mayoría de las especies. En suero, la IgA, tiene un peso molecular de 160,000 daltons (7S) La IgA de las secreciones se compone de dos monómeros o dos unidades unidos por la cadena J. Es un polímero constituido de 2-3 unidades (Figura 3).²⁰

IgA SERICA:

IgA SECRETORIA.
(DIMERO)

IgM (PENTAMERO):

Figura 3. Esquematización de inmunoglobulinas humanas poliméricas.²⁰

El componente secretorio puede existir en forma libre o ligado a las moléculas de IgA por fuertes acciones recíprocas no covalentes. Dicho componente es sintetizado por las células epiteliales inmóviles cercanas a la mucosa donde ocurre la secreción. Su función está relacionada con los anticuerpos IgA, para permitirles sean transportados a través de los tejidos de la mucosa hasta las secreciones. El componente secretorio es una sola cadena polipeptídica con un peso aproximado de 70,000 daltons.

Las mediciones cuantitativas indican que hay una sola cadena J en cada pentámero de IgM o molécula polimérica de IgA. La cadena J está ligada por covalencia al penúltimo residuo de cisteína de las cadenas μ y α .

La IgA está presente en las secreciones seromucosas, como en la saliva, sudor, lágrimas, líquido nasal, líquido prostático, calostro, secreciones pulmonares o bronquiales, vaginales y del intestino delgado. Su principal función puede no ser la destrucción de los antígenos; sino más bien la de impedir el acceso de esos agentes extraños al sistema inmune general. Además, resiste la proteólisis, limita la inflamación, se une a células T reguladoras y a leucocitos; puede participar en la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo. Actúa en las reacciones inmunológicas de aglutinación y precipitación.

3.1.d) Inmunoglobulina M (IgM).

La IgM constituye aproximadamente el 10% de las inmunoglobulinas normales, la IgM, es pentamérica (Fig.3); el pentámero tiene un peso molecular de 900,000 daltons (19 S). Estos anticuerpos son los que con mayor frecuencia, se forman durante la respuesta primaria ante un estímulo antigénico y predominan en ciertas respuestas de anticuerpos como los anticuerpos a los grupos sanguíneos. La IgM, junto con la IgD, es la mayor inmunoglobulina manifiesta sobre la superficie de las células B. En casos de bacteremia e infecciones virales, desarrolla un papel muy importante.

A diferencia de la IgG, no atraviesa barrera placentaria, fija el complemento eficientemente; pero no fija el factor reumatoide, la IgG, fija a ambos.

Los anticuerpos IgM, son los más aptos para las reacciones de aglutinación y algo menos para la reacción de precipitación.

3.1.e) Inmunoglobulina G (IgG).

En adultos normales, la IgG constituye el 75% del total de las inmunoglobulinas en el suero. Las concentraciones relativas de las cuatro subclases son: IgG1, 60-70%; IgG2, 14-20%; IgG3, 4-8%, IgG4, 2-6%, las cifras son variables de individuo a individuo y se correlacionan con ciertos marcadores alotípicos de la región constante(C) de la cadena H. Por lo tanto, la capacidad de un determinado individuo para producir anticuerpos de una u otra subclase a otra de IgG puede estar bajo control genético.

Es la primera inmunoglobulina sintetizada durante la respuesta secundaria o tardía ante un estímulo antigénico, es la única inmunoglobulina que puede atravesar membrana placentaria en el humano y es la responsable de la protección al recién nacido durante los primeros meses de su vida: ésta defensa proporcionada se reforza por la transferencia de IgG calostrala a través del tracto intestinal del niño.

La IgG es también capaz de fijar el complemento del suero: IgG3>IgG1>IgG2>IgG4. La IgG4 está incapacitada para fijación de complemento por la vía clásica; pero no por la vía alterna.

4. FUNDAMENTO TEORICO DE TECNICAS Y METODOS.

4.1. METODOS INMUNOENZIMATICOS.

Las técnicas que tienen más aplicación en la detección de antígenos y anticuerpos, son acertadamente, los inmunoensayos enzimáticos; los cuales combinan la especificidad de una reacción antígeno-anticuerpo con la sensibilidad que proporciona el sistema indicador.

El tipo de enzima seleccionada para un inmunoensayo, es fundamental, ya que la sensibilidad de dichos ensayos está directamente relacionada con las propiedades de la enzima utilizada y es lo que las define como técnicas cuantitativas.^{24,25}

La reacción del sistema indicador o del sustrato, se lleva a cabo para que la actividad enzimática ligada al complejo antígeno-anticuerpo pueda detectarse en el espectrofotómetro.

Existen a saber, dos tipos de inmunoensayos enzimáticos: homogéneo (*EMIT*= Enzyme-multiplied immunoassay technique) y heterogéneo (*ELISA*= Enzyme-linked immunosorbent assay).

4.1.A) La Técnica EMIT, consiste en una reacción inmunológica inicial antígeno-anticuerpo (medicamento libre ligado a los anticuerpos) y después de una reacción enzimática de competencia entre el medicamento marcado con la enzima y el medicamento libre, por ocupar los sitios de unión del anticuerpo. Al final del ensayo, a mayor actividad enzimática, se tendrá mayor concentración de medicamento en la muestra del paciente; ésto quiere decir, que la actividad enzimática residual es directamente proporcional a la concentración de medicamento o sustancia a analizar (Fig.4)²⁶.

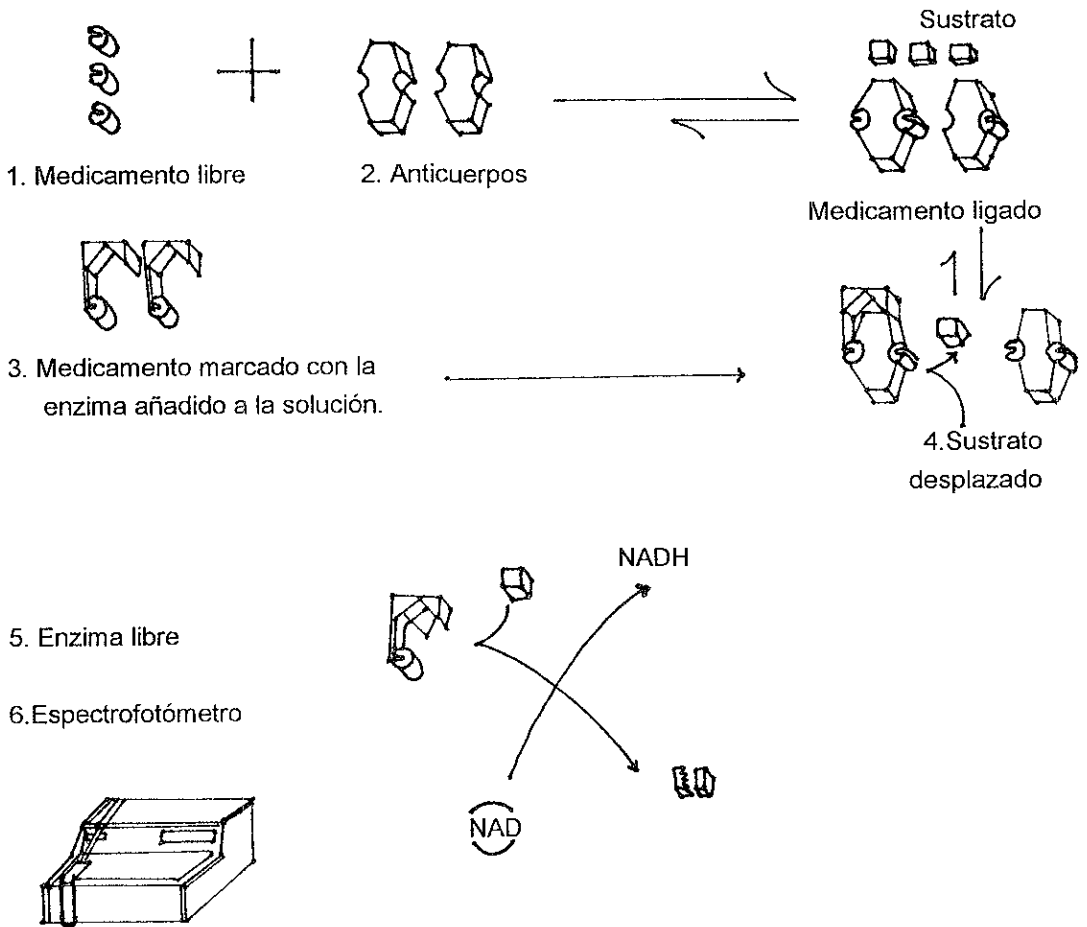


Figura 4. Esquemización de EMIT.²⁶

Interpretación de la técnica EMIT (Fig.4)

1. El medicamento está contenido en la muestra del paciente, suero o plasma.
2. Se añaden los anticuerpos al medicamento en solución, junto con el sustrato enzimático y el NAD.
3. Enseguida se añade el medicamento marcado con la enzima a la solución.
4. Se realiza una reacción de competencia por los sitios de unión del anticuerpo entre el medicamento marcado con la enzima y el antígeno libre.
5. La enzima libre actúa sobre el sustrato transformando el NAD en NADH.
6. El cambio de la absorbancia causado por la actividad enzimática se mide en un espectrofotómetro.

Una mayor concentración de medicamento en la muestra del paciente ocasiona que los sitios del del anticuerpo sean ocupados, quedando el medicamento y aumentando la actividad enzimática residual.

Por el contrario, una menor concentración del antígeno, ocasiona que la mayor parte del conjugado enzimático se una al anticuerpo, provocando la inactividad de éste.

EMIT presenta varias ventajas: los resultados se obtienen en un minuto sin requerir de fase sólida para la separación de los reactivos que no reaccionaron, no se necesita de personal altamente calificado. Por presentarse como liofilizados, es muy amplia su fecha de caducidad, una vez rehidratados, pueden usarse por tres meses.

Sin embargo, presenta la desventaja de funcionar sólo para sustancias de bajo peso molecular, se utiliza con frecuencia en la vigilancia de medicamentos terapéuticos, tales como antimicrobiales, antiasmáticos, cardiotónicos y antidepresivos tricíclicos.

4.1.B) Técnica ELISA.

La técnica *ELISA*, fué descrita casi al mismo tiempo en 1971, por dos equipos de trabajo diferentes, el de Engvall y Perlmann en Suecia y el de Weemen y Schuurs en Holanda, como segura y simple para cuantificar anticuerpos específicos.^{27, 28}

Esta técnica es un inmunoensayo que permite determinar la concentración de un antígeno o de un anticuerpo, mediante el uso de uno de ellos en fase sólida y el otro en solución, detectándose la formación del complejo antígeno-anticuerpo mediante un trazador enzimático.

La técnica de *ELISA*, tiene las ventajas de emplear un componente de fase sólida, el cual permite la realización de análisis simultáneos; debido a que los reactivos son

utilizados para microtitulaciones, son de bajo costo y estables; además es un ensayo adaptable a la automatización.

Entre las desventajas de *ELISA* está, lo complicado que resulta la preparación de marcadores enzimáticos; además que éstos pueden disminuir considerablemente la sensibilidad de la técnica, debido al impedimento estérico de la reacción antígeno-anticuerpo causado por la enzima.

En la fase sólida de *ELISA*, pueden ser utilizados varios materiales, especialmente plásticos, debido a su disponibilidad comercial.

Aunque las placas de microtitulación de poliestireno son las más comúnmente utilizadas, otros materiales son empleados: discos de celulosa, de isocianato, nylon, poliacrilamida y polivinilo. El control de calidad de los materiales es esencial, sobre todo, en la estandarización de ensayos reproducibles.²⁹

Una enzima será utilizada en los inmunoensayos, específicamente en la técnica *ELISA*, si puede ligarse fácilmente con los anticuerpos, antígenos o haptenos, sin pérdida de su actividad funcional.

Debe tener elevada especificidad, alto grado de pureza; en condiciones de almacenamiento, ser estable; tener resisitencia ante variaciones de pH y Temperatura; tener bajo costo para considerarse asequible. Las enzimas utilizadas en *ELISA* son: Peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-D-galactosidasa, glucosaoxidasa, glucoamilasa, anhidrasa carbónica, acetilcolinesterasa y malatodeshidrogenasa.

El cromógeno más comúnmente utilizado es el p-nitrofenil fosfato, que al ser hidrolizado, se convierte en un compuesto estable, soluble y amarillo; lo cual permite la fácil lectura de absorbancias por medio del espectrofotómetro. Para la fosfatasa alcalina, se utiliza el p-nitrofenilfosfato; para la peroxidasa, la o-fenil diamina(OPD), aunque algunos prefieren usar el ácido 5-amino salicílico, la o-toluidina y el 3,3', 5,5' tetrametil bencidina, en los cuales, la sensibilidad es mayor y no son fotosensibles.

De manera muy general, la técnica *ELISA*, es considerada como eficiente, y es una alternativa específica de métodos estándar para la detección de antígenos y también de anticuerpos.²⁷⁻³²

Las distintas modalidades de los métodos de *ELISA* se pueden dividir en dos grandes grupos. 1)No competitivo y 2)Competitivo, ambos pueden ser utilizados para medir niveles de anticuerpo o antígeno específico en una muestra.²⁸

4.1.1) ELISA NO COMPETITIVO.

Los ensayos no competitivos son también llamados métodos *Indirectos* y *ELISA "Sandwich"*:

a) METODO INDIRECTO: Es no competitivo para la detección de anticuerpos; el conjugado (anticuerpo unido a enzima), reconoce un gran número de anticuerpos dirigidos contra una gran cantidad de antígeno; por eso, se considera un sistema útil para la detección y cuantificación de anticuerpos presentes en una muestra. Se pega el antígeno a la placa de microtitulación, se agrega la muestra que contiene anticuerpos; éstos se unirán al antígeno, provocando una reacción antígeno-anticuerpo. Después se añade el anticuerpo unido a enzima y el sustrato, el cual, repercutirá en la intensidad de la reacción, manifiesta por un cambio de color. A mayor actividad enzimática, mayor concentración de anticuerpos en la muestra (Figura 5).²⁸

b) METODO DEL "SANDWICH": En ésta técnica, se pega un anticuerpo específico a la placa de microtitulación. El ligando reacciona con el anticuerpo que se ha inmovilizado en fase sólida; después se añade un segundo anticuerpo marcado con la enzima que reacciona con el ligando en otro determinante antigénico. Posterior a la adición de cromógeno o sustrato, se obtiene que la actividad enzimática al final del ensayo es mayor cuanto mayor es la concentración de antígeno presente (Figura 6).^{22,28}

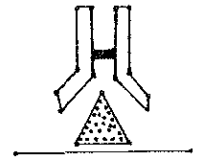
La técnica de Sandwich se utiliza también para la detección de anticuerpo, por ejemplo, IgE.³³

1. Se pega antígeno a la placa de microtitulación



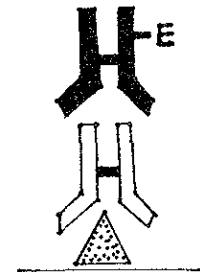
Lavado

2. Adición de la muestra que contiene anticuerpo específico.



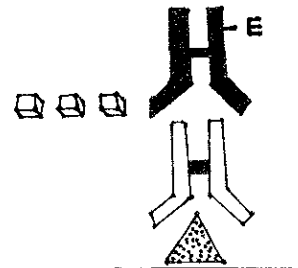
Lavado

3. Se agrega el anticuerpo ligado a enzima (conjugado); éste se dirige al anticuerpo por descubrir.



Lavado

4. Adición del Sustrato.



5. Lectura de la placa de microtitulación.

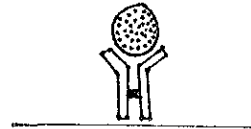
Figura 5. Método Indirecto de ELISA para la detección de anticuerpos.²⁸

1. Se pega anticuerpo a la placa.



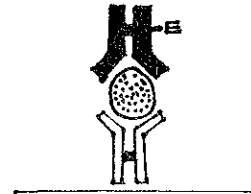
Lavado

2. Adición de la muestra que contiene antígeno.



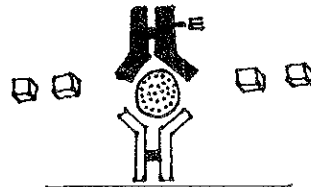
Lavado

3. Adición del conjugado enzimático.



Lavado

4. Adición del Sustrato



5. Lectura de la placa.

Figura 6. Método "Sandwich" de ELISA para la detección de antígeno.^{22, 28}

4.1.B) ELISA COMPETITIVO

Los ensayos competitivos se realizan para detectar concentraciones de anticuerpo o antígeno en una muestra biológica. Para determinar antígeno, se puede realizar de dos maneras; pegando anticuerpo a fase sólida y empleando antígeno unido a enzima; o bien, pegando antígeno a fase sólida y empleando anticuerpo unido a enzima. El método de Inhibición es competitivo.

a) METODO DE INHIBICION Para la detección y cuantificación de antígeno libre en la muestra, el método de inhibición se puede realizar de la siguiente manera: Primero, se hace reaccionar anticuerpo específico con la muestra que contiene antígeno; se adiciona la mezcla a la placa que contiene antígeno pegado. Después se adiciona anticuerpo unido a enzima y el sustrato. La competencia se da entre el antígeno de la muestra y el antígeno pegado a la placa por el anticuerpo ligado a enzima (Fig. 7).^{25,28}

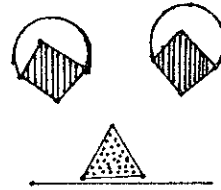
La alternativa es, en la que se pega anticuerpo a la placa de microtitulación. Aquí, el antígeno ligado a enzima compite con el antígeno libre de la muestra por el anticuerpo pegado a la placa. En ésta modalidad, entonces, se hacen reaccionar una cantidad fija de antígeno conjugado a enzima y cantidades variables de antígeno libre con alícuotas del anticuerpo en fase sólida (Fig 7A).^{25,27}

El antígeno libre inhibe la unión del antígeno conjugado, haciendo que la actividad enzimática unida en la fase sólida al final del ensayo, sea menor cuanto mayor la concentración del antígeno libre en el medio de reacción. Si se usa en un ensayo paralelo una serie de diluciones del antígeno libre de concentración conocida, se puede hacer una curva de inhibición de referencia e interpolar en ella los resultados obtenidos en muestras problemas de antígeno.

1. Se pega antígeno a la fase sólida

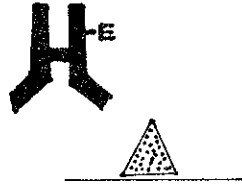


2. Se adiciona la muestra que posiblemente contiene antígeno, mezclada* con el anticuerpo específico o de referencia .



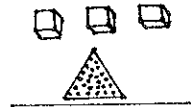
Lavado

3. Se adiciona el anticuerpo conjugado a enzima.



Lavado

4. Adición del Sustrato.



5 Lectura de la placa

Figura 7. Método de Inhibición de ELISA para la detección de antígeno, en la cual se emplea antígeno en fase sólida y anticuerpo-enzima ^{25,28}

* La mezcla se realiza en otra placa.

1. Se pega anticuerpo a la placa.

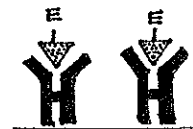


2. Se adiciona la muestra que contiene antígeno mezclada* con antígeno unido a enzima.



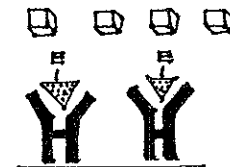
Lavado

3. Se agrega el antígeno ligado a enzima



Lavado

4 Adición de Sustrato.



5. Lectura de la placa

Fig.7A Método de Inhibición de ELISA para la detección de antígeno, en el cual se emplean anticuerpo en fase sólida y antígeno-enzima. ^{25, 27}

*La mezcla se efectúa en otra placa.

4.2. TINCIÓN DE GRAM. 14

Se cree que la causa de la diferencia de los dos tipos de tinción en las bacterias, se debe a la arquitectura molecular entre sus paredes celulares. Otros sugieren que el fundamento de la tinción estriba en una diferencia de permeabilidad de los tipos de bacterias.

En las bacterias gram positivas, parece que el complejo cristal-violeta queda retenido en la pared después del tratamiento con el alcohol-acetona, el cual probablemente determina una disminución del diámetro de los poros de peptidoglucana de la pared. Las paredes de las bacterias gram negativas, contienen una menor proporción de peptidoglucana y ésta tiene menos uniones transversales que las paredes gram positivas. Se piensa que los poros de la peptidoglucana de las paredes gram negativas quedan lo suficientemente amplios como para permitir la extracción del complejo cristal violeta, por lo que las bacterias gram positivas, se tiñen mejor que las negativas.

4.3. IDENTIFICACION DE LOS ESTREPTOCOCOS DEL GRUPO A.9

La mayoría de los laboratorios clínicos recurren a técnicas que demuestran diferentes características morfológicas y bioquímicas de los estreptococos a fin de lograr la identificación presuntiva. La identificación inicial, está orientada a evaluar el tamaño y aspecto de las colonias individuales en el medio de cultivo primario y el tipo de hemólisis producida en agar sangre (Brown, 1919) La identificación y diferenciación final, se logra por medio de tipificación de grupo antigénico (Lancefield, 1930), sensibilidad a la Bacitracina (Maxted, 1953), prueba de CAMP (Darling, 1975) o por pruebas bioquímicas (Sherman, 1937).

Es importante llevar a cabo la identificación y diferenciación precisa de los estreptococos β -hemolíticos del grupo A, generalmente se realiza: a) la susceptibilidad a la Bacitracina y b) las siguientes *pruebas bioquímicas*. 1) catalasa, 2) hidrólisis de hipurato, 3) prueba de bilis-esculina, 4) Prueba de CAMP. 5) También puede identificarse *S. pyogenes*, con la prueba comercial PYR.

4.3.a) SUSCEPTIBILIDAD A LA BACITRACINA

El uso de discos "A" con una baja concentración de bacitracina (0,02 a 0,04U) es el método más comúnmente empleado en los laboratorios clínicos para la identificación

presuntiva de estreptococos del grupo A. Si bien el empleo de discos "A" es bastante práctico para dicha identificación, una proporción estimada en 5 a 15% de los estreptococos susceptibles a la bacitracina aislados de fuentes clínicas, puede pertenecer a grupos distintos del grupo A. Un 6% de los estreptococos β hemolíticos del grupo B y un 7.5% de estreptococos de los grupos C y G son sensibles a la bacitracina. Esta proporción de resultados positivos falsos, se puede reducir, evaluando con cuidado el tipo de hemólisis producida en los aislamientos. Aproximadamente el 7,5% de los estreptococos α hemolíticos son sensibles a la bacitracina. Dado que muchas cepas de estreptococos sensibles a la bacitracina de grupos distintos al A exhiben zonas de inhibición de 10mm o menos, se ha sugerido que sólo una zona de desarrollo de más de 10mm identifica a los estreptococos del grupo A. Este criterio no es aceptado universalmente. La técnica del disco de bacitracina ha sido concebida para ser utilizada sólo en los cultivos puros y no en cultivos mixtos.

4.3.b) PRUEBAS BIOQUIMICAS:

1) PRUEBA DE LA CATALASA: La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno en Oxígeno y Agua. Excluyendo los estreptococos, la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen actividad de catalasa.

Fundamento: El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo aeróbico de los hidratos de carbono. Si se deja acumular el peróxido de hidrógeno, es letal para las células bacterianas. La catalasa transforma el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua

2) HIDROLISIS DE HIPURATO: Los estreptococos del grupo B contienen la enzima hipuricasa capaz de hidrolizar el ácido hipúrico. Otros estreptococos β hemolíticos carecen de esta enzima.

Fundamento: La hipuricasa, una enzima hidrolítica producida por los estreptococos del grupo B, provoca la hidrólisis del hipurato de sodio, con la formación de benzoato de sodio y glicina.

3) PRUEBA DE BILIS ESCULINA Esta prueba está basada en la capacidad de ciertas bacterias, particularmente los estreptococos del grupo D, de hidrolizar la esculina en presencia de bilis al 1% a 4%.

Fundamento: Las bacterias capaces de desarrollar en bilis y también de hidrolizar esculina, producen glucosa y aglucona esculetina (7, 7 dihidroxicumarina) en un medio adecuado. La esculetina reacciona con una sal de hierro, para formar un complejo marrón oscuro a negro, produciendo un ennegrecimiento difuso del medio bilis esculina, que contiene citrato férrico como fuente de iones férricos.

Esculina Agua → Glucosa + esculetina iones férricos → Complejo negro.

Algunos medios bilis-esculina incluyen azida sódica para inhibir el desarrollo de microorganismos gram negativos; transformándose en selectivos para los estreptococos.

4) PRUEBA CAMP: La prueba CAMP fué descrita por primera vez en 1944 por Christie, Atkins y Munch-Peterson, cuya contribución se reconoce en la sigla "CAMP".

Fundamento: La actividad hemolítica de la β lisina estafilocócica sobre los eritrocitos se ve intensificada por un factor extracelular producido por estreptococos del grupo B, llamado factor de CAMP. Por lo tanto, toda vez que dos reactantes se superponen en una placa de agar sangre ovina se advierte la intensificación de la reacción β hemolítica. La zona de intensificación de lisis asume la forma de una cabeza de flecha en la intersección de la estría estafilocócica y la estría estreptocócica.

5) PRUEBA PYR: Es una prueba comercial que pone de manifiesto la presencia de la enzima pirrolidonil-arilamidasa. Se puede usar caldo Todd-Hewitt con L-pirrolidonil- β -naftilamina al 0.01% y el reactivo PYR (N,N dimetilamino cinamaldehído). En una prueba positiva, se presenta un color rojo intenso a púrpura, debido a la reacción entre la β -naftilamina liberada con el reactivo PYR. ⁴

4.4. OBTENCION DEL CARBOHIDRATO C DE LANCEFIELD POR EL METODO RANTZ Y RANDALL. ^{3 4}

El antígeno específico de grupo, es un polisacárido integrante de la célula bacteriana, más que del material capsular; siendo tóxico en un nivel de dispersión.

El Carbohidrato C grupo específico puede ser extraído de células mediante el tratamiento con ácidos, autoclave o acción enzimática. El método Rantz-Randall, se basa en la extracción de la sustancia C, por medio de la destrucción de la pared celular de la bacteria al ser esterilizada a 121 °C, durante 15 minutos.

4.5. CUANTIFICACION DEL CARBOHIDRATO C DE LANCEFIELD POR EL METODO FENOL-SULFURICO.³⁵

Los azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados; incluyendo los metil éteres con grupos reductores, principalmente libres, dan un color amarillo-naranja cuando son tratados con fenol y ácido sulfúrico concentrado. La reacción es sensible y el color es estable. La reacción fenol-ácido sulfúrico, fué propuesta por Dubois, Gilles y col.; desarrollándose para determinar concentraciones de azúcares y sustancias relacionadas.

4.6. TECNICA DE PEGADO DE CARBOHIDRATO C DE LANCEFIELD A GLOBULOS ROJOS DE CARNERO.³⁶

La superficie de los glóbulos rojos o eritrocitos contiene gran número de determinantes antigénicos, llamados también, epítomos, que son la zona de un antígeno que determina la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo. La especificidad antigénica está en los azúcares terminales de un oligosacárido. Así pues, algunos carbohidratos, se unen a los lípidos de la membrana eritrocítica.

La técnica consiste en la unión del carbohidrato C de Lancefield con eritrocitos de carnero, incubando ambos a 37°C durante una hora. También pueden utilizarse glóbulos rojos de conejo para pegarlos al carbohidrato C de Lancefield.

4.7. PROTOCOLO DE INMUNIZACION PARA LA OBTENCION DE ANTICUERPO DE CONEJO (g -GLOBULINA).³⁶

El proceso de inmunización, es aquel que induce una respuesta inmune en un individuo competente; a consecuencia del contacto con un antígeno específico en forma natural o artificial. La resistencia natural de defensa contra la infección, se asocia con condiciones físicas y fisiológicas que caracterizan a un individuo. Es inespecífica, esto es, no está orientada en particular contra una sola enfermedad, y varía periódicamente en el mismo individuo y de un individuo a otro

Así, la respuesta inmune obtenida, puede ser humoral, celular o ambas, dependiendo de diversos factores; tales como: la dosis y vía de administración o el tipo de antígeno para ser inoculado. En el caso de la respuesta humoral, el suero con un alto contenido de

anticuerpos, se conoce como antisuero o suero hiperinmune y éste se puede obtener a partir de personas que han sido inmunizadas deliberadamente; o bien, que lo han sido en forma natural.

La aplicación práctica de los antisueros es muy diversa. En la clínica, se puede utilizar con fines terapéuticos o preventivos (inmunización pasiva), en diversos estados infecciosos o tóxicos (neumonía lobar, tétanos, etc.). También son útiles en la identificación de microorganismos aislados de procesos infecciosos y en la clasificación taxonómica de diversas especies. Finalmente, han servido como herramienta de trabajo para dilucidar mecanismos inmunológicos básicos: especificidad inmunológica, activación del complemento, fagocitosis, citotoxicidad; y en la determinación rápida de la naturaleza de diversas sustancias químicas, proteínas, carbohidratos, haptenos, etc.

En Inmunología, el proceso de inmunización se lleva a cabo en animales, por lo general, conejos. Para la inmunización, existen diversas vías de inoculación: intravenosa, intraperitoneal, intracardiaca, intradérmica y subcutánea. Para obtener mejores resultados, se recomienda la vía intravenosa. La vía de inoculación se elige en función de las características del antígeno, del animal a inmunizar; así como del propósito de la inmunización. Con antígenos solubles, frecuentemente se hace necesaria la utilización de adyuvantes (completo e incompleto de Freund), que se aplican por vía intramuscular o subcutánea, debido a que la mezcla antígeno-adyuvante es una emulsión aceitosa. Los adyuvantes mejoran considerablemente la respuesta inmune en el animal; ya que permiten aumentar el nivel de anticuerpos circulantes.

4.8. PURIFICACION DE γ -GLOBULINA POR PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO.²⁴

La purificación de gama globulina por precipitación con sulfato de amonio, se basa en el fenómeno del "salting-out" o Precipitación Salina; consiste en la competencia de los iones salinos con las moléculas proteicas por las moléculas del agua, esto ocasiona deshidratación de las proteínas y la disminución de la solubilidad.

Los agentes más eficaces, son el sulfato de amonio, el sulfato de sodio, sales de magnesio, fosfatos y citratos.

4.9. PRECIPITACION EN CAPILAR ¹⁹

Desde 1887, la reacción de precipitación, se ha utilizado ampliamente como una prueba semicuantitativa para demostrar la probable presencia de anticuerpos en el suero principalmente; aunque también puede aplicarse la técnica para otras proteínas, como en el caso de la γ -globulina de conejo.

Consiste en una reacción antígeno-anticuerpo desarrollada al disponer en la parte intermedia de los capilares, diluciones al doble del antígeno y el volumen de antisuero correspondiente. Los testigos son dos capilares; uno con el antígeno sin diluir y el otro sólo con el antisuero.

La precipitación en medio líquido, puede ser semicuantitativa o cuantitativa; en la primera, se mide el precipitado en mm y en la segunda, el precipitado formado en tubos cónicos, se determina la concentración de proteínas por el método de Kjeldahl.

4.10. DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY ³⁷

El Cobre en solución alcalina, forma un complejo de color azul con las proteínas. Este complejo es absorbido a una longitud de onda de 600nm. La intensidad del color azul, es directamente proporcional a la concentración de las proteínas presentes.

4.11. FUNDAMENTO DEL ANALISIS ESTADISTICO ³⁸⁻⁴⁰

4.11.A) ANALISIS DE VARIANZA(ANADEVA)

Es una técnica mediante la cual, la variación total presente en un conjunto de datos se divide en varias componentes, cada una de las cuales tiene asociada una fuente de variación específica, de manera que en el análisis es posible conocer la magnitud de las contribuciones de cada fuente de variación a la variación total.

CUADRO I. ANADEVIA PARA DISEÑO ALEATORIO

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados (SC)	Varianza o cuadrados medios (CM)	F calc	F teórica
entre tratamientos	K-1	$\sum x_j/n_j - x_{..}/n_j$	CMtrat= SCtrat/K-1	Fcalc= CMtrat/CMerror	Fteórica= F(1- α , K-1, N-K)
dentro tratamientos (error)	N-K	$\sum \sum x_{ij} - \sum x_j/n_j$	CMerror= SCerror/N-K	-----	-----
Total	N-1	$\sum \sum x_{ij} - x_{..}/N = SC_{total}$	-----	-----	-----

4.11.B) DISTRIBUCION JI-CUADRADA

La distribución Ji-cuadrada, se emplea para probar la hipótesis acerca de la varianza o desviación estándar de una población y además, para probar hipótesis acerca de los datos de frecuencia; es decir, para comparar resultados experimentales, obtenidos en forma de frecuencias o proporciones con frecuencias esperadas. Esto es, probar estadísticamente si la distribución de frecuencias observadas es compatible ("se ajusta a") con alguna distribución teórica conocida: Uniforme, multinomial, binomial, normal, etc. A éstas pruebas se les conoce como "pruebas de bondad de ajuste".

En resumen, una variable aleatoria χ^2 se genera por la suma de variables aleatorias independientes normal estándar elevadas al cuadrado. Al número de variables independientes en la suma se les llama los grados de libertad, y son el parámetro de la distribución.

Otro uso de la prueba ji-cuadrada, es la prueba de hipótesis de que dos criterios de clasificación, cuando son aplicados a las mismas unidades elementales, son independientes, se les conoce como pruebas de independencia, llamadas también "Tablas de contingencia".

En las tablas de contingencia las "f" filas representan los niveles de un criterio y las "c" columnas representan los niveles de otro criterio de clasificación. Dichas tablas se realizan para probar las hipótesis nula de que en la población, los dos criterios de

clasificación son independientes. Si se rechaza la hipótesis nula, se concluye que los dos criterios no son independientes.

Para una tabla de contingencia 2×2 ($c=2$) ($f=2$), los grados de libertad son $(2-1)(2-1)=1$ y se usa la fórmula corregida de Yates:

$$\chi^2 = n(ad-bc-n/2) / (a+b)(c+d)(a+c)(b+d) \quad \text{con 1 grado de libertad.}$$

CUADRO II. TABLA DE CONTINGENCIA 2×2

1er. Criterio de clasificación			
2do.criterio			
	1	2	Total
1	a	b	a+b
2	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	n

4.11C) EVALUACION ESTADISTICA DE LOS METODOS DE DIAGNOSTICO.

Las decisiones clínicas se basan en la información obtenida de la enfermedad, mediante procedimientos diagnósticos. Cualquier método utilizado para obtener información acerca de una enfermedad, se considera un método de diagnóstico. Así, para determinar la validez de una prueba, es necesario analizar sus dos componentes. sensibilidad y especificidad.

La **SENSIBILIDAD**, se refiere a la capacidad de la prueba para dar un resultado positivo cuando la persona analizada tiene la enfermedad.

La ESPECIFICIDAD de un método de diagnóstico se refiere a la capacidad de la prueba para dar un resultado negativo cuando la persona analizada no tiene la enfermedad.

Una vez calculados los valores de sensibilidad y especificidad, debe calcularse el VALOR PREDICTIVO, que indica el grado de confiabilidad de la positividad o negatividad de la prueba.

CUADRO III. DETERMINACION DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE UN METODO DIAGNOSTICO

Situación Confirmada			
Resultados de la prueba	ENFERMO	NO ENFERMO	Totales/Hilera
POSITIVOS	Positivos verdaderos(a)	Positivos Falsos(b)	Total de positivos
NEGATIVOS	Negativos falsos(c)	Negativos verdaderos(d)	Total de negativos
Totales/columna	a+c	b+d	a+b+c+d

$$\text{SENSIBILIDAD} = a / a+c$$

$$\text{ESPECIFICIDAD} = d / b+d$$

$$\text{VALOR PREDICTIVO POSITIVO} = a / a+b$$

$$\text{VALOR PREDICTIVO NEGATIVO} = d / c+d$$

II. FUNDAMENTACION DEL TEMA

Los estreptococos del grupo A β -hemolíticos, son microorganismos responsables de infecciones múltiples como faringitis, infecciones cutáneas, fiebre puerperal, endocarditis, glomerulonefritis y fiebre reumática. Dichos estreptococos grupo A, contienen antígenos que presentan reacción cruzada con tejidos del corazón, articulaciones y piel; así, los anticuerpos de reacción cruzada son detectados bajo el contexto de una amplia respuesta inmunológica.⁸

Por lo general, la identificación de estreptococos grupo A, se basa en la naturaleza de la hemólisis desarrollada de las colonias en cultivo de agar sangre y principalmente en la detección de los carbohidratos específicos de grupo presentes en la pared celular. La identificación de estreptococos se lleva a cabo también mediante pruebas rápidas o de *Kits*.

"Pastorex Streptogroupe", es una prueba que permite la identificación rápida de los estreptococos, mediante extracción de antígenos específicos de la pared celular, mismos que se ponen de manifiesto al entrar en contacto con el reactivo de partículas de látex recubiertas de anticuerpos dirigidos contra cada uno de los carbohidratos; observándose una aglutinación macroscópica. Esta prueba permite una identificación correcta en un mínimo de tiempo debido a su alta sensibilidad.²³

En un estudio comparativo de la prueba inmunoenzimática "Ventrescreen" (Ventrex) con cultivos de exudados faríngeos en agar sangre; se obtuvo con la prueba Ventrex; una sensibilidad del 82%, una especificidad de 50%, un valor predictivo positivo de 49% y un valor predictivo negativo de 82%.

Estos resultados, no fueron confiables para sustituir el cultivo de exudados faríngeos, porque un buen diagnóstico se realiza con un método que tenga una sensibilidad de por lo menos 95%. Sin embargo, el valor predictivo negativo apoyó el dictaminar rápidamente un resultado negativo, de tal manera que el paciente no tuvo que esperar terapia antibiótica por una semana.⁴¹

La prueba "Directigen Strep Grupo A" (DGAST), es un método inmunoenzimático rápido para detectar estreptococos beta hemolíticos del grupo A, directamente de exudados faríngeos; ésta fué comparada con una técnica tradicional de cultivo en agar sangre para la detección de estreptococos beta hemolíticos grupo A

Se cultivaron en agar sangre, quinientos (500) exudados faríngeos de pacientes pediátricos y adultos y luego se procesaron utilizando la prueba DGAST. De los 500 especímenes, por cultivo tradicional, 144 fueron positivos y 356 fueron negativos. De los 144 especímenes por cultivo, 131 fueron DGAST positivo (sensibilidad de 90%); de los 356 especímenes por cultivo, 353 fueron DGAST negativo (especificidad de 99.2%).

La prueba DGAST, es muy rápida de realizar, sensible y muy específica para la detección de estreptococos β -hemolíticos del grupo A directamente de exudados faríngeos y puede ser de gran utilidad principalmente en pacientes pediátricos.⁴²

Otro estudio comparativo entre una prueba inmunológica y un estudio microbiológico se realizó para evaluar la capacidad de los métodos para detectar estreptococos del grupo A, directamente de exudados faríngeos. El estudio comprendió una comparación entre una prueba de aglutinación en látex con el cultivo anaeróbico de estreptococos grupo A

La prueba "Aglutinación en látex-10 minutos", mostró una sensibilidad de 92.4% y una especificidad de 92.8%. Esto sugiere que es más rápida y fácil para ser usada en el diagnóstico de faringitis estreptocócicas del grupo A, directamente de exudados faríngeos, que el cultivo anaeróbico.⁴³

En éste trabajo, se pretendió que la identificación de *Streptococcus pyogenes* en el diagnóstico de las infecciones respiratorias de la parte superior, fuese más rápida y eficaz mediante la implementación de la técnica ELISA, ya que es una técnica útil para la detección de anticuerpos. Se determinaron títulos de anticuerpos del tipo IgA, IgG e IgM a partir de muestras de saliva de pacientes con características asintomáticas y potencialmente infectados; de edad variable (de 6-50 años) de la población mexicana. De ésta manera, se estableció la relación existente entre la condición de enfermedad del paciente y la cantidad de anticuerpos en su saliva y se les remitió en con el médico para que recibieran la terapia antibiótica en forma adecuada y oportuna.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En muchas zonas geográficas; entre ellas, México, *Streptococcus pyogenes* es considerado el principal patógeno de las enfermedades respiratorias e infecciones estreptocócicas. La incidencia de la Faringitis estreptocócica del grupo A en niños, tiene variaciones geográficas, estacionales y de edad; ésta varía entre 11-18.4% de acuerdo a varias fuentes⁴⁴⁻⁴⁷

Hay un incremento de la Faringitis estreptocócica desde el nacimiento hasta los 12 años de edad. La incidencia más grande (30.5%) se da entre los 5-12 años de edad. La menor incidencia en niños menores de 3 años es probablemente por la pobre adherencia de estreptococos grupo A a células epiteliales de la boca.

Cuando se sospecha clínicamente de estreptococos del grupo A, la incidencia en el Laboratorio es más alta, entre 43-44.7%. El cultivo en agar sangre de los especímenes de exudados faríngeos, es el método más común para detectar estreptococos del grupo A.

Se ha observado que en personas normales pueden obtenerse cultivos positivos de *S. pyogenes* hasta en un 60%, si se utilizan medios especiales, cultivos anaeróbicos u otros métodos sensibles, como lo son los inmunoensayos enzimáticos.⁴⁸

Son varios los componentes antigénicos intra y extracelulares de los estreptococos beta hemolíticos que inducen la producción de anticuerpos en el huésped.⁸

La mayoría de los pacientes con faringitis aguda sufren de infección viral más que de infección estreptocócica y es difícil diferenciar éstas enfermedades clínicas.

De lo anteriormente mencionado, se desprende la necesidad de implementar la técnica inmunoenzimática (*ELISA*) para la detección de anticuerpos estreptocócicos en saliva cuando exista infección de la garganta; debido a que, aún cuando el cultivo en agar sangre de carnero al 5% sirva como guía para detectar la presencia o ausencia de *S. pyogenes*, existen problemas asociados con el tiempo prolongado de entrega de los resultados (de 4-5 días), con el procedimiento complicado de identificación y con el alto costo que conlleva.

De ésta manera, el paciente puede recibir del médico la terapia antimicrobiana correcta; evitando la propagación de la enfermedad de la garganta; así como las secuelas características provocadas por *Streptococcus pyogenes*, como son: glomerulonefritis aguda,¹⁶ y fiebre reumática, la cual se presenta con frecuencia en países del tercer mundo, donde 25-40% de las enfermedades cardiovasculares se deben a la fiebre reumática y se estima que el 1% de los escolares entre 5-15 años padecen la enfermedad.^{49, 50}

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo General:

- Determinar los títulos de anticuerpos anti-Streptococcus pyogenes por la técnica ELISA y comparar los resultados con los del cultivo en agar sangre de carnero al 5%.

2. Objetivos Particulares:

1. Obtener el antígeno de Streptococcus pyogenes, Carbohidrato C a partir del cultivo de exudado faringeo en agar sangre de carnero al 5%; aplicando el método de Rantz-Randall y cuantificarlo por el método Fenol-Sulfúrico.^{19,35}
2. Obtener conjugado enzimático o anticuerpo de conejo(γ - globulina anti S. pyogenes)unido a peroxidasa de rábano y cuantificarlo por el método de Lowry.³⁷
3. Determinar los títulos de anticuerpos IgA, IgG e IgM en saliva de pacientes con infección de la garganta, sintomáticos o asintomáticos, mediante la técnica de ELISA.

V. HIPOTESIS

Si *Streptococcus pyogenes*, induce una respuesta inmune local, ésta puede ser detectada en la boca del paciente, al determinar la presencia de anticuerpos específicos en saliva. Dicha respuesta es evaluada más rápida y específicamente por la prueba **ELISA** que por el método microbiológico.

VI. DISEÑO EXPERIMENTAL

MATERIAL Y METODOS.

I. MATERIAL

A. MATERIAL BIOLÓGICO:

A.1. Población de estudio:

Se recolectaron 95 muestras de saliva y de exudados faríngeos de personas, de nivel socioeconómico medio, mexicanas, de ambos sexos, con 6-50 años de edad, que acudieron al módulo de toma de muestras de Microbiología del Hospital General de Zona No. 53 del IMSS.

Las personas tenían infección en la garganta con o sin sintomatología evidente

Criterios de Inclusión:

- No estar bajo tratamiento médico con antimicrobianos.
- Cursar con proceso inflamatorio y dolor de la garganta.
- Presentar tos seca o productiva.
- Pacientes con enrojecimiento de la garganta; pero sin presentar sintomatología de dolor, inflamación o tos.

Criterios de exclusión:

- Pacientes que estén bajo tratamiento con antimicrobianos.
- Pacientes que se rehusaron a participar en el estudio.

Criterios de eliminación:

- Pacientes con *Diabetes mellitus*.
- Mujeres embarazadas.
- Pacientes cuyas muestras fueron eliminadas por contaminación.

A.2. Glóbulos rojos de carnero y de conejo

A.3 Conejo Nueva Zelanda, adulto macho, de 3 Kg de peso.

B. MATERIAL:

Matraz aforado: 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 mL. PYREX*

Matraz Erlenmeyer: 125, 150, 250, 500, 1000, 2000 ml. PYREX*

Matraz Erlenmeyer: 250 ml con tapón de baquelita. PYREX*

Vaso de precipitados: 50, 100, 250, 600, 1000 mL. PYREX*

Probeta: 25, 50, 100, 250, 500 mL. PYREX*

Pipeta graduada: 0.1, 1, 2, 5, 10 mL. PYREX*

Cajas de Petri. PYREX*

Vidrio de reloj. PYREX*

Jeringa de vidrio de 50 mL. MAPAD*

Celdas para espectrofotómetro. B&L*

Tubos de ensaye 13X100. PYREX*

Tubos de ensaye 16X150 PYREX*

Tubos de ensaye con tapón de baquelita. PYREX*

Tubos de ensaye 18X150. PYREX*

Tubos de Khan estériles.

Termómetro -10° C a 110° C BRANNAN*

Placas de poliestireno. COOKE*

Pipeta automática. EPPENDORF*

Caja de portaobjetos. MADESA*

Pisetas de plástico de 500 mL.

Botellas estériles. LUX*

Micropipetas de 25 y 50 µL

Agitador magnético.

Pinzas, tijeras, ligas.

Mechero Fisher. SCIENTIFIC PRODUCTS*

Soporte universal.

Tripié.

Tela de asbesto.

Asas microbiológicas.

Membranas de diálisis. SPECTR.MED.IND*

Hisopos de algodón estériles.

Abatelenguas estériles.

Algodón y sanitas.

Marcador indeleble.

Masking-tape.

Papel parafilm.
Papel megapack.
Papel glacine.

C. REACTIVOS:

Acido Bórico. TECNICA QUIMICA
Acido Cítrico. MERCK*
Agua destilada y bidestilada.
Bicarbonato de Sodio J.T.BAKER*
Borohidruro de Sodio. SIGMA*
Carbohidrato C de *S. pyogenes*, obtenido en el Laboratorio L-311.
Carbonato de Sodio. J.T.BAKER*
Citrato de Sodio.J.T.BAKER*
Conjugados IgA-Peroxidasa. CAPPEL*
Conjugados IgG-Peroxidasa.CAPPEL*
Conjugados IgM-Peroxidasa.CAPPEL*
Cristal violeta. SIGMA*
Discos de Bacitracina 0.04 U. BIGAUX*
Fenol. J.T.BAKER*
Fosfato de Sodio dibásico.J.T.BAKER*
Fosfato de Sodio monobásico.J.T.BAKER*
Fosfato de Potasio monobásico.J.T BAKER*
Glucosa Anhidra. MERCK*
Iodo.J.T.BAKER*
Ioduro de Potasio.J.T.BAKER*
Orto-fenilendiamina. SIGMA*
Ovoalbúmina. SIGMA*
Peroxidasa de rábano. SIGMA*
Peróxido de Hidrógeno. MONTERREY*
Peryodato de Sodio MERCK*
Reactivo de Folin-Ciocalteu. SIGMA*
Safranina SIGMA*
Sulfato de Cobre. J.T.BAKER*
Sulfato de Amonio. J.T.BAKER
Tween 20. SIGMA

MEDIOS DE CULTIVO

Agar Base Sangre.BIOXON*

Caldo Tioglicolato.BIOXON*

Medio Bilis-esculina.DIFCO*

D. EQUIPO.

Agitador Vórtex.GENTE*

Autoclave.STEEL*

Balanza Analítica.METTLER H80*

Balanza Granataria.OHAUS*

Baño metabólico.PRECISSION*

Centrífuga.SOLBAT*

Equipo de destilación.PYREX*

Espectrofotómetro. B&L*

Espectrofotómetro de ELISA.Lector de placas.DYNATECH*

Estufa.MAPSA*

Incubadora.RIOSSA, EC.*

Microscopio.ZEIZZ*

Parrilla de agitación.ROCKER PLATFORM*

Potenciómetro.SARGEN WELCH PBL 400*

Refrigerador. PHILLIPS 127-VCA*

* *Marcas Registradas.*

DIAGRAMA DE FLUJO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

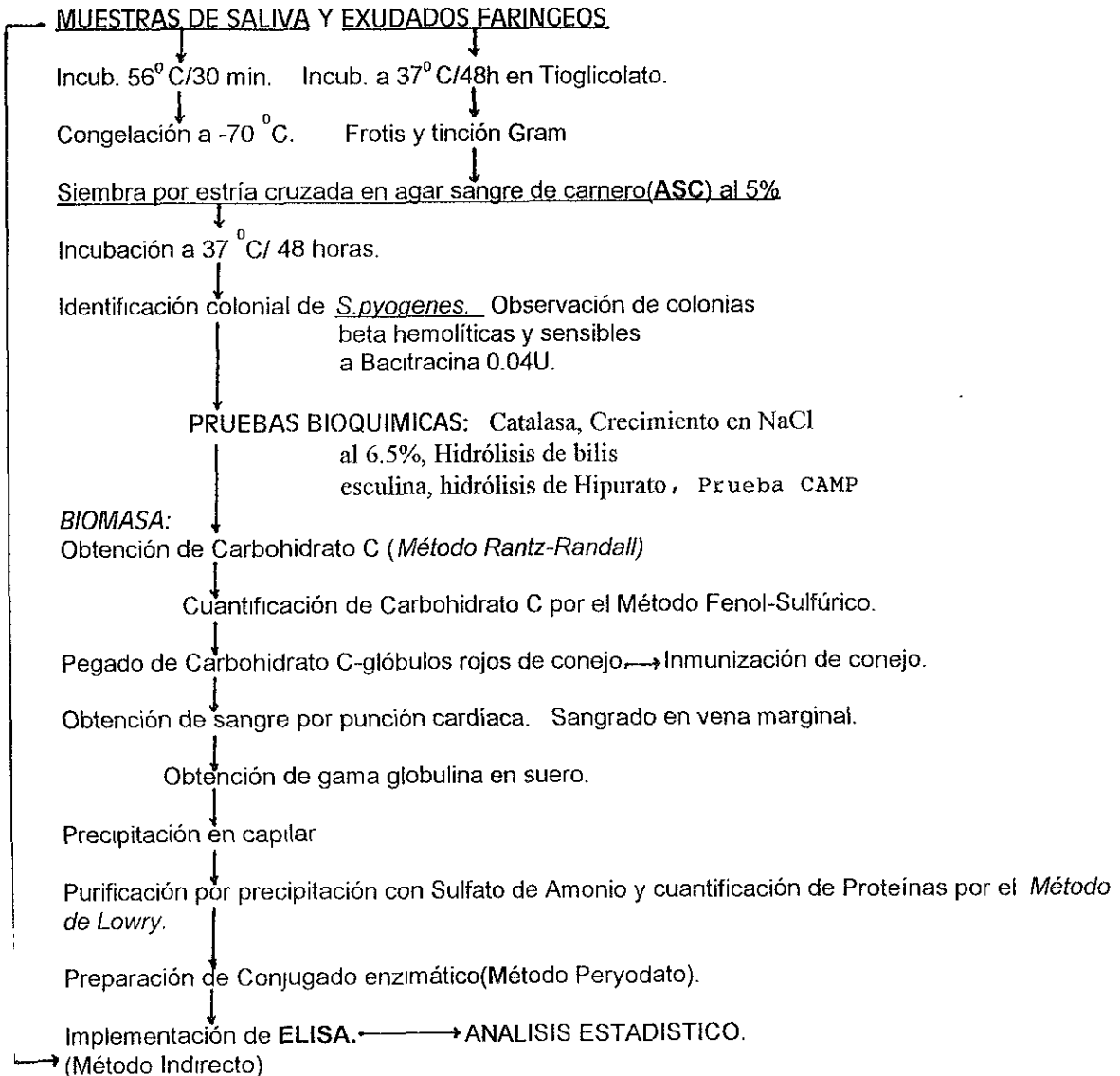
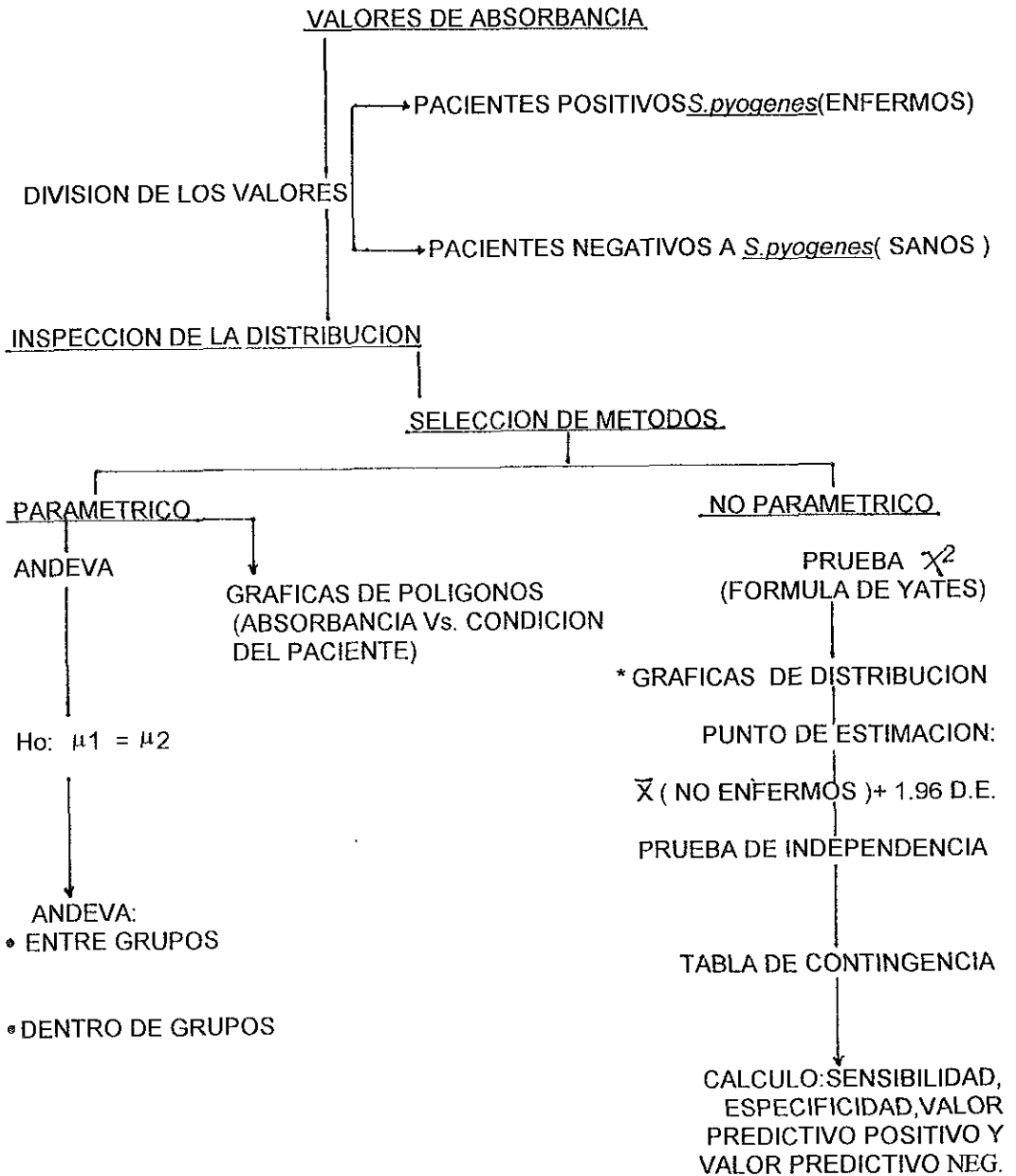


DIAGRAMA DE FLUJO DEL ANALISIS ESTADISTICO



II.METODOS

1. METODO DE RECOLECCION DE MUESTRAS.

a) MUESTRAS DE EXUDADOS FARINGEOS:

Con ayuda de un abatelenguas, se realizó un raspado con hisopo largo en la región orofaríngea del paciente, por detrás de la úvula y de las zonas tonsilares (Figura 9).⁹ Fué importante que el paciente mantuviera muy abierta la boca para no contaminar el hisopo con la lengua, dientes o con las amígdalas, ya que el aislamiento de los estreptococos no hubiera sido posible y en el medio de cultivo únicamente crecería flora microbiana normal de la boca. El hisopo del raspado se introdujo en un tubo que contenía caldo tioglicolato; otro hisopo con exudado del mismo individuo se colocó dentro de un tubo de ensayo conteniendo solución salina de fosfatos (PBS). El hisopo se agitó aproximadamente 20 veces, dejándolo en el tubo.

b) MUESTRAS DE SALIVA:

En tubos de vidrio 16X150.PYREX, se recolectaron 3 ml de saliva estimulada (se le dió al paciente un pedacito de papel parafilm para que lo masticara durante 1 minuto). La saliva se filtró a través de algodón en jeringas estériles, con el fin de eliminar restos de componentes celulares y mucina.

Finalmente, las muestras de saliva se calentaron a 56°C, durante 30 minutos, para evitar fijación del complemento. Tanto las muestras de exudados faríngeos, como las muestras de saliva, se etiquetaron perfectamente anotando el nombre del paciente, sexo, edad, número de muestra. Se guardaron en congelación a una temperatura de -70°C; o bien, a -20°C hasta el momento de su análisis.

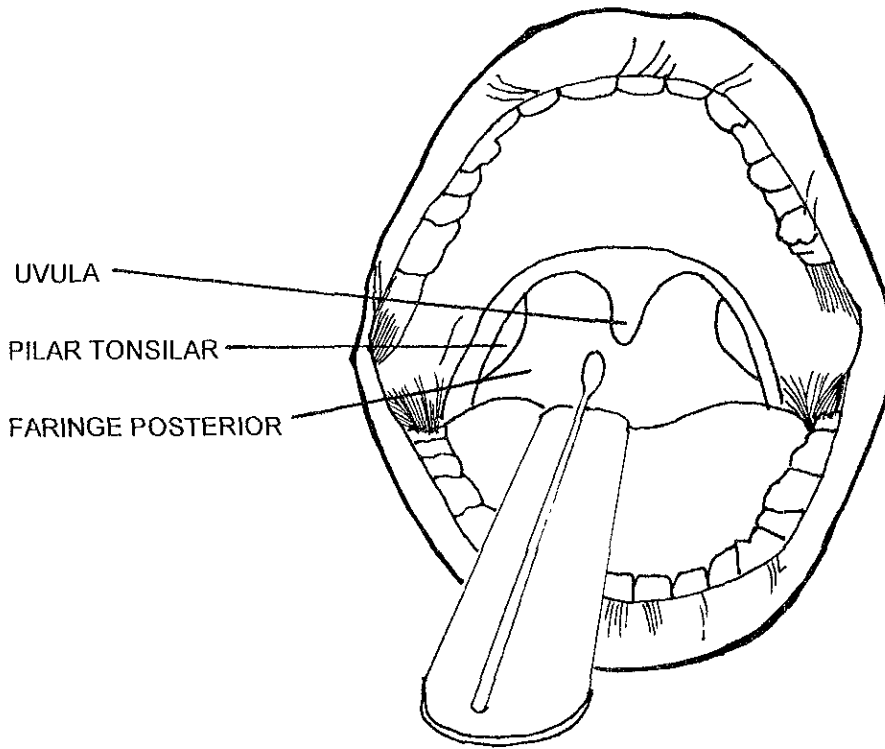


Figura 8 Ilustración de la técnica de hisopado de garganta 9

2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *S.pyogenes*.

El aislamiento de *S.pyogenes*, se llevó a cabo a partir de exudados faríngeos de pacientes con infección de la garganta. Primero, se realizó la toma de muestra del exudado y el hisopo se depositó dentro de un tubo con caldo tioglicolato, incubando a 37°C por 48 horas. Se observó crecimiento microbiano en el tubo por una turbidez en el caldo tioglicolato y algunas ocasiones, por la formación de un precipitado blanco en el fondo del tubo. A continuación, se sembró en una placa de agar sangre de carnero al 5% por estría cruzada, incubando la caja de petri a 37°C durante 48 horas. Después de éste tiempo, se realizaron frotis de las colonias beta hemolíticas aisladas en agar sangre, los frotis se fijaron con calor y tñieron, mediante la técnica de coloración de Gram; observando de esta manera, la morfología microscópica.

Conjuntamente, con el asa microbiológica, se tomaron dos de las colonias de estreptococos β -hemolíticos, previamente observadas con el microscopio, se sembraron por agitación del asa microbiológica en caldo tioglicolato, contenido en un tubo 16X150.PYREX con tapón de baquelita. Se incubó a 37°C de 2 a 3 días, observándose turbidez en el caldo. Se sembró por estría cruzada en agar sangre de carnero al 5%, incubando a 37°C por 48 horas. Se hicieron frotis; tñiéndolos por la técnica de Gram. Así también, con las colonias β -hemolíticas observadas con el microscopio, se llevaron a efecto, las pruebas bioquímicas siguientes: catalasa, crecimiento en NaCl al 6.5%, hidrólisis de hipurato, hidrólisis de bilis esculina al 4% y prueba de CAMP.

Posteriormente, se tomaron con el asa de 2 a 5 colonias aisladas, observadas microscópicamente y diferenciadas por medio de las pruebas bioquímicas (Ver Anexo III): catalasa(-), crecimiento en NaCl al 6.5%(-), hidrólisis de bilis esculina al 4%(-), hidrólisis de hipurato(-) y prueba de CAMP(-), y se sembró en forma masiva en una caja con agar sangre de carnero al 5%. Con unas pinzas esterilizadas a la flama del mechero, se colocaron dos discos de Bacitracina 0.04 U a distancias aproximadamente de 15 mm de los bordes de la caja. La placa se incubó a 37⁰ C durante 24 horas y se observó la inhibición del crecimiento de estreptococos β - hemolíticos alrededor de los discos de Bacitracina, se midió en mm el diámetro del anillo de inhibición.

El procedimiento se repitió, alternando el cultivo en caldo tioglicolato, la siembra por estría cruzada en agar sangre de carnero al 5%, tición de Gram, realización de las pruebas bioquímicas antes mencionadas y determinación de la sensibilidad a la Bacitracina; hasta obtener cepas identificadas en el grupo A como *Streptococcus pyogenes*.

3. TINCION DE GRAM (MODIFICACION DE HUCKER).¹⁴

PROCEDIMIENTO:

1. Se realizó un frotis de un colonia aislada en el agar sangre, se fijó con calor.
2. Se adicionaron dos gotas de cristal violeta, dejándolo actuar por 10 segundos. Inmediatamente después, se retiró el colorante con un poco de lugol.
3. Se agregó mordiente (Lugol), dejándolo en el frotis por 10 segundos, se lavó con poca agua.
4. Se decoloró rápidamente con una mezcla 1:1 de Alcohol-Acetona, de 10 a 20 segundos.
5. Se adicionaron dos gotas de safranina, se dejó el colorante por 10 segundos, se lavó, se secó y observó con el microscopio.

4. OBTENCION DEL CARBOHIDRATO C DE LANCEFIELD POR EL METODO DE RANTZ Y RANDALL.¹⁹

PROCEDIMIENTO.

1. En dos matraces Erlenmeyer de 500 ml PYREX, se esterilizaron 250 ml de caldo tioglicolato en cada uno.
2. Cada matraz se sembró por agitación del asa microbiológica con una colonia de *S.pyogenes*, aislada en agar sangre y diferenciada por medio de pruebas bioquímicas (Anexo III). Se incubó a 37° C durante 24 horas.
3. Se centrifugó el caldo con cultivo en tubos 13X100.PYREX a 3000 rpm durante 30 minutos. Se desechó el líquido sobrenadante de los tubos.
4. A cada tubo conteniendo sólo el precipitado, se adicionó aproximadamente 0.5 ml de solución salina 0.85%, los tubos se agitaron vigorosamente en el vórtex para resuspender las células.
5. En un matraz Erlenmeyer de 250 ml con tapón de baquelita.PYREX, se vertió el contenido de los tubos y se esterilizó 15 minutos (121° C, 15 lb)

6. Bajo condiciones de esterilidad, se transfirió el líquido a tubos de Khan. Se centrifugó a 3000 rpm durante 30 minutos. El líquido sobrenadante o carbohidrato C, se guardó en refrigeración para su posterior cuantificación y uso.

5. CUANTIFICACION DEL CARBOHIDRATO C DE LANCEFIELD POR EL METODO FENOL-SULFURICO.³⁵

PROCEDIMIENTO.

1. Se preparó una solución patrón de Glucosa 0.1 mg/ml.
2. En 10 tubos 18X150.PYREX, perfectamente limpios y secos, se adicionaron los siguientes volúmenes de la solución patrón de Glucosa y agua destilada:

No. DE TUBO	SOL. ESTANDAR DE GLUCOSA (ml)	AGUA DESTILADA (ml)	CONC. (mg/ml)
1	0.1	1.9	0.01
2	0.2	1.8	0.02
3	0.3	1.7	0.03
4	0.4	1.6	0.04
5	0.5	1.5	0.05
6	0.6	1.4	0.06
7	0.7	1.3	0.07
8	0.8	1.2	0.08
9	0.9	1.1	0.09
10	1.0	1.0	0.10

- 3.El blanco de reactivos se preparó con 2.0 ml de agua destilada, 0.1 ml de Fenol al 80% y 5.0 ml de ácido sulfúrico.
- 4.Se realizaron diluciones del Carbohidrato C (problema).
- 5.A cada tubo (de la curva patrón y de las diluciones de la muestra problema), se adicionó 0.1 ml de Fenol al 80% y 5.0 ml de ácido sulfúrico concentrado.
- 6.Se dejaron reposar todos los tubos durante 30 minutos.
- 7.Se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 390nm.

6. TECNICA DE PEGADO DE CARBOHIDRATO C A GLOBULOS ROJOS DE CARNERO.³⁶

PROCEDIMIENTO:

1. Se obtuvo sangre venosa de carnero y se vertió en un matraz estéril, conteniendo solución Alsever para estabilizar a los eritrocitos
2. Se lavó tres veces con solución salina isotónica y se centrifugó a 2000 rpm durante 5-10 minutos.
3. Se resuspendió 0.2 ml del paquete de eritrocitos lavado en 2 0 ml de la dilución del carbohidrato La concentración del Carbohidrato C se ajustó a 50 µg/ml.
- 4 Se incubó la mezcla de carbohidrato y eritrocitos a 37°C durante 1 hora.
5. Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos.
6. Se lavó tres veces con solución salina isotónica y centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos.
7. Se ajustó el paquete final con 20 ml de solución salina de fosfatos (PBS).
Se guardó en refrigeración hasta su uso.

7. PROTOCOLO DE INMUNIZACION PARA LA OBTENCION DE GAMA-GLOBULINA.³⁶

PROCEDIMIENTO:

1. Se ajustó el antígeno a una concentración de 1 mg/ml.
2. Se eligió un conejo Nueva Zelanda, adulto, macho de 3 Kg y se elaboró el esquema de inmunización; considerando la dosis (ml), la concentración del antígeno (mg/ml) y el día de la inoculación.

Se disolvió 1.0 mg del antígeno en 1.0 ml de adyuvante completo de Freund, se inculó por vía intravenosa y subcutánea en sitios múltiples.

DOSIS (ml)	DIA	CONC.(mg / ml)
0.1	2	0.1
0.2	4	0.2
0.2	6	0.2
0.2	8	0.2
0.3	10	0.3
0.3	12	0.3
0.4	14	0.4
0.4	16	0.4

* Se sangró al conejo el día 19.

8. SANGRIA DE CONEJOS.

a) MUESTRA DE VENA MARGINAL.

Se obtuvieron 3 ml de sangre de la vena marginal de la oreja del conejo en condiciones asépticas; recibéndola en un tubo de ensayo, se dejó retraer el coágulo y obtuvo el suero por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos. Se realizó la prueba de precipitación en capilar para verificar la producción de anticuerpos.

b) MUESTRA DE SANGRE CARDIACA.

Se sangró por punción cardíaca en condiciones asépticas. Se recibió la sangre en un vaso de precipitados seco y limpio. Se incubó a 37°C durante 1 hora, se dejó en refrigeración 24 horas. El coágulo se separó y se obtuvo el suero por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, se realizó la prueba de precipitación en capilar.

9. PURIFICACION DE LA γ -GLOBULINA POR PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO. ^{24, 26}

PRECIPITACION AL 50 %:

A un volúmen de suero de conejo, se añadió un volúmen igual de solución saturada de Sulfato de Amonio (1g/ml). La adición se hizo por goteo. El recipiente que contenía el suero, se agitó sobre una parrilla de agitación durante 15 minutos. Se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos.

El sobrenadante se desechó y el paquete se resuspendió con solución salina de fosfatos (PBS), en el mismo volúmen que se tenía inicialmente de suero.

PRECIPITACION AL 33%:

La mezcla se vertió en el vaso de precipitados y se añadió gota a gota 1/3 parte del volúmen inicial de suero y se agitó durante 15 minutos. Se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos. Se repitió la precipitación al 33% 3 veces.

El precipitado obtenido fué dializado contra una solución NaCl 0.15 M hasta la eliminación total del Sulfato de Amonio. La solución NaCl se cambió cada 24 horas durante 4 días y con agitación constante.

10. PRECIPITACION EN CAPILAR. ³⁶

PROCEDIMIENTO:

1. Se tomaron y marcaron 12 tubos capilares en 4 partes iguales con ayuda de un marcador indeleble.
2. En 12 tubos de ensayo etiquetados, se hicieron diluciones del antígeno al doble:
 - a. Se adicionaron 0.5 ml de solución salina en cada uno de los tubos de ensayo.
 - b. Al tubo 1 se le adicionaron 0.5 ml de antígeno. Se mezcló bien el tubo.
 - c. Con otra pipeta, se extrajeron 0.5 ml del tubo 1 y vertió en el tubo 2, con la misma pipeta se mezcló bien
 - d. El procedimiento anterior, se repitió con los tubos siguientes.
3. Se reabsorbió un volúmen de antisuero hasta la primera de las marcas del tubo capilar. La parte externa del tubo capilar se limpió con papel absorbente.
4. El tubo capilar se giró 180° y se hizo descender el volúmen de antisuero hasta el borde correspondiente.
5. Se absorbió un volúmen de antígeno hasta la segunda marca del capilar, en forma similar a la descrita para el antisuero
6. Se mezcló por inversión repetida.
7. Se tapó con el dedo índice uno de los extremos del tubo y se dejó que el contenido quedara en las marcas intermedias.
8. El capilar se introdujo en una gradilla fabricada con plastilina.
9. Se repitió el procedimiento señalado de los puntos 3 al 8 para cada una de las diluciones del antígeno.
10. Se llenó un capilar hasta la segunda marca con el antígeno sin diluir y otro sólo con el antisuero (Testigos)
11. Se dejó la gradilla unos 5 minutos a temperatura ambiente y se guardó en refrigeración de 24-48 horas.
12. La cantidad de precipitado formada en cada tubo, se midió en mm.

1.1. DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY. ³⁷

PROCEDIMIENTO:

1. Se preparó una solución patrón o estándar de Ovoalbúmina de 250 µg/ml.
2. En 10 tubos de ensayo 13X100.PYREX secos y limpios, se adicionaron los siguientes volúmenes de la solución patrón de Ovoalbúmina y de agua destilada:

No.DE TUBO	SOLUCION ESTANDAR (ml)	AGUA DESTILADA (ml)	CONC. (µg/ml)
1	0.1	0.9	25
2	0.2	0.8	50
3	0.3	0.7	75
4	0.4	0.6	100
5	0.5	0.5	125
6	0.6	0.4	150
7	0.7	0.3	175
8	0.8	0.2	200
9	0.9	0.1	225
10	1.0	0.0	250

3. Se adicionaron 3 ml de reactivo C de Lowry a todos los tubos.
4. Se dejaron reposar los tubos 10 minutos a temperatura ambiente.
5. A cada tubo se le adicionó 0.1 ml del reactivo de Folin-Cicocalteu.
6. Se agitó ocasionalmente y dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Se realizaron diluciones del problema.
8. El blanco de reactivos se preparó con 1.0 ml del reactivo de Folin-Cicocalteu
9. Todos los tubos (de la curva estándar y las diluciones del problema), se leyeron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm.

12. PREPARACION DE CONJUGADOS (γ -GLOBULINA DE CONEJO UNIDO A ENZIMA).²⁷

PROCEDIMIENTO. METODO DEL PERYODATO:

1. Se pesaron 4 mg de Peroxidasa de rábano y se mezclaron en 1.0 ml de agua bidestilada, se adicionaron 0.2 ml de Peryodato de Sodio 0.1 M (recién preparado). Se agitó suavemente durante 20 minutos. La mezcla cambió de color oro a verde.
2. La mezcla se colocó en una bolsa de diálisis y dentro de 4l de solución de Acetato de Sodio 1 mM pH= 4.4, a 4°C, durante toda la noche.
3. Al agregar 20 μ l de Buffer de Carbonatos 0.2 M, pH=9.5; el pH se elevó.
4. Inmediatamente después, se adicionó a la mezcla 8 mg de anticuerpo diluido en 1.0 ml de Buffer de Carbonatos 0.001 M, pH=9.5.
5. Con ayuda de una parrilla de agitación, se mezcló por dos horas a temperatura ambiente.
6. Luego, se adicionó 0.01 ml de Borohidruro de Sodio recién preparado (4 mg en 1.0 ml de agua bidestilada). Se guardó la mezcla a 4°C por sólo dos horas.
7. Se realizó la precipitación con Sulfato de Amonio y se dializó la mezcla contra 4l de solución salina de fosfatos (PBS) pH=7.2.
8. El contenido de la bolsa después de la diálisis, se centrifugó a 2500 rpm 5 minutos. El líquido sobrenadante se guardó en refrigeración con Glicerol al 60% y Albúmina de huevo al 1%

13. DETERMINACION DEL TITULO DEL CONJUGADO γ -GLOBULINA DE CONEJO-PEROXIDASA.^{26, 27}

PROCEDIMIENTO:

1. Se ajustó el antígeno (Carbohidrato C de *S. pyogenes*) a una concentración de 16 μ g/ml con solución PBS pH=7.2.
2. En una gradilla se colocaron 7 tubos perfectamente limpios y secos, etiquetados de la A a la G. En el tubo A se colocaron 3.0 ml de la dilución del antígeno (16 μ g/ml) y en los tubos B a la G, se realizaron diluciones al doble con volúmenes de 1.5 ml de Buffer de recubrimiento o de Carbonatos. Todos los tubos se agitaron perfectamente con ayuda del vórtex. Al final, los tubos tenían 1.5 ml; excepto el tubo G, que quedó con 3.0 ml.

3. En los pozos de una placa de microtitulación, se colocaron 100 μ l del tubo G en la fila G, 100 μ l de I tubo F en la fila F y así sucesivamente con el resto de los tubos hasta colocar 100 μ l del tubo A en la fila A. La fila H se llenó con 100 μ l de PBS pH=7.2 (testigo negativo del antígeno).
4. Se guardó la placa en cámara húmeda a 4°C durante 24 horas.
5. Se tiró el sobrenadante y se sacudió la placa sobre una sanita.
6. Se bloqueó con PBS-Ovoalbúmina al 1%. Se guardó en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 minutos.
7. Se tiró el sobrenadante, se sacudió la placa sobre una sanita y se lavó 4 veces con PBS-Tween 20, esperando un minuto entre lavado y lavado.
8. En una gradilla se colocaron 11 tubos perfectamente limpios y secos, etiquetados del 1 al 11, se hicieron diluciones al doble del conjugado γ -globulina de conejo-Peroxidasa (preparado en el Laboratorio L-311), utilizando volúmenes de 1.0 ml de PBS pH=7.2.
9. La hilera 12 de la placa, se llenó con PBS-Tween 20 (testigo negativo del anticuerpo), la hilera 11 se llenó con 100 μ l del tubo 11 y así sucesivamente hasta llenar la hilera 1 con 100 μ l del tubo 1. La placa se guardó en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 1 hora y media.
10. Se lavó igual que en el paso 7.
11. Se adicionaron 100 μ l de Sustrato Ortofenilendiamina (OPD). Se incubó la placa a 37°C durante 15 minutos.
12. La reacción se detuvo adicionando a cada pozo de la placa 100 μ l de Acido Sulfúrico 4N.
13. Los valores de absorbancia se leyeron con la ayuda del espectrofotómetro ELISA.DYNATECH a 490 nm.

14. DETERMINACION DE ANTICUERPOS EN SALIVA POR EL METODO INDIRECTO DE ELISA. 26-32

PROCEDIMIENTO:

1. Se radiaron 3 placas de microtitulación de poliestireno con luz Ultravioleta durante una hora.
2. En un matraz Erlenmeyer de 150 ml PYREX, se mezclaron 0.5 ml del Carbohidrato C de *S.pyogenes* y 62 ml de Buffer de recubrimiento o de Carbonatos (dilución 1:125)

3. SENSIBILIZACION DE LOS POZOS:

Se llenaron los pozos de la microplaca con volúmenes de 100 μ l de la dilución del antígeno. Los pozos No. 96 de las 3 placas se llenaron con 100 μ l del Buffer de recubrimiento. Se guardaron las placas en cámara húmeda a 4°C durante 24 horas.

Se tiró el sobrenadante, se sacudió la placa sobre una sanita, se lavó 4 veces con PBS-Tween 20 con volúmenes de 200 μ l por pozo; se esperó 1 minuto entre lavado y lavado.

4. BLOQUEO:

Se colocaron 200 μ l en cada pozo de PBS-Ovoalbúmina al 1% diluida en PBS-Tween. Se guardó en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 minutos.

5. LAVADO:

Se vertió el contenido de los pozos y se lavó 4 veces con PBS-Tween 20 con volúmenes de 200 μ l por pozo. Se esperó 1 minuto entre lavado y lavado.

6. MUESTRAS PROBLEMA:

Las muestras de saliva se diluyeron 1.5 con PBS-Tween 20. Se colocaron 100 μ l de saliva diluida en los pozos correspondientes de 3 placas de microtitulación sensibilizadas con el antígeno. Se guardaron las placas en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 1 hora y media.

Se lavó como en el paso 5.

7. CONJUGADOS:

En la placa 1 se colocaron 100 μ l /pozo de conjugado IgA-Peroxidasa.CAPPEL (dilución 1:1000).

En la placa 2 se colocaron 100 μ l /pozo del conjugado IgG-Peroxidasa.CAPPEL (dilución 1:1000)

En la placa 3 se colocaron 100 μ l /pozo del conjugado IgM-Peroxidasa:CAPPEL (dilución 1:1000).

Las 3 placas se guardaron en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 1 hora y media.

8. SUSTRATO:

Se lavaron las 3 placas como en el paso 5. Se colocaron 100 μ l del sustrato o-fenilendiamina (OPD). Se incubaron las placas a 37°C durante 15 minutos.

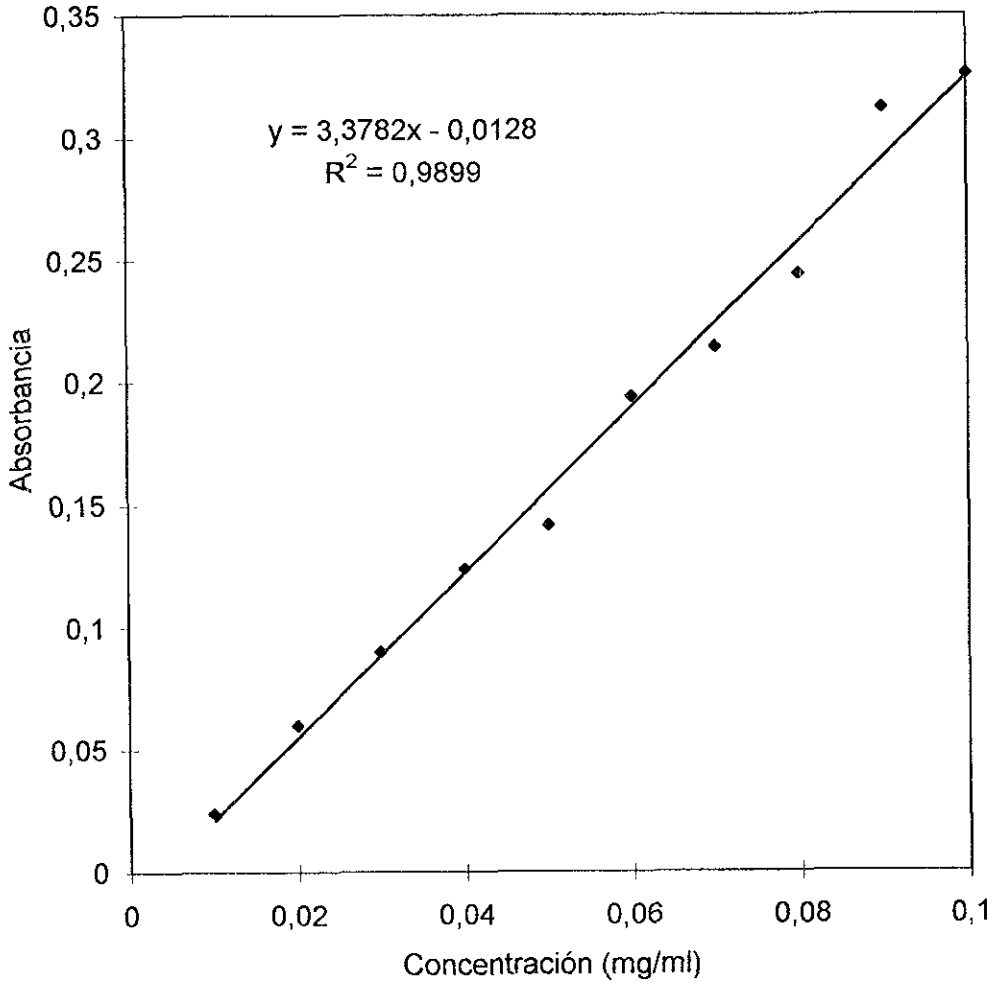
9. LECTURA: Se sacaron las placas de la estufa y se detuvo la reacción enzimática con Acido Sulfúrico 4N. Se leyeron las placas a 490 nm.

VII. RESULTADOS

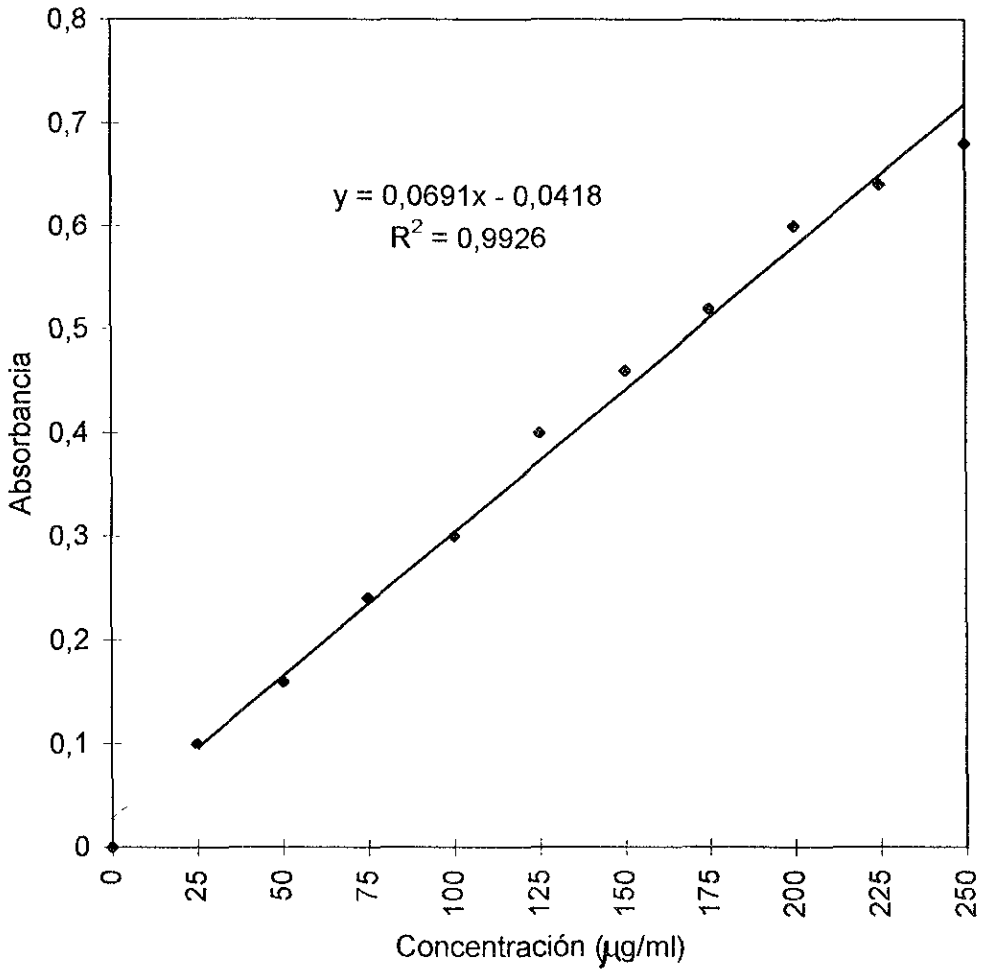
1. Con la finalidad de cuantificar el antígeno: Carbohidrato C de *S.pyogenes*, obtenido en el Laboratorio L-311, se realizó el Método Fenol-Sulfúrico.³⁵ Se trazó la curva estándar o curva de calibración de Carbohidratos. En la *Gráfica 1*, se muestran los datos de la ecuación lineal ($y=3.3782x-0.0128$, $r^2= 98.99\%$) de la curva de calibración. Se hizo una dilución 1:50 de la solución problema o Carbohidrato C de *S.pyogenes*. Al interpolar en la gráfica 1, con una Absorbancia de 0.124, da una concentración de 0.04 mg/ml, que al multiplicarla por el factor de dilución, resulta una concentración de 2 mg/ml.

2. El conjugado enzimático, el cual consiste en la γ -globulina de conejo anti-*S.pyogenes* unido a Peroxidasa, se obtuvo en el Laboratorio L-311 y se cuantificó mediante el Método de Lowry.³⁷ Al igual que en la cuantificación de Carbohidratos, se obtuvo la concentración del conjugado enzimático de 27.85 $\mu\text{g/ml}$ (dilución 1:100) a partir de la ecuación lineal de la curva estándar: $y=0.0691x-0.0418$, $r^2=99.26\%$ (*Gráfica 2*).

Gráfica 1. Curva estándar para la cuantificación de carbohidrato C de Lancefield, por el método Fenol-Sulfúrico.



Gráfica 2. Curva estándar para la determinación de proteínas por el método de Lowry



3. Los valores de Absorbancia (títulos de IgA, IgG e IgM), obtenidos después de la realización del ensayo ELISA, se dividieron específicamente en dos poblaciones: enfermos o positivos a *S.pyogenes* y sanos o negativos a *S.pyogenes*. En primer lugar, se calcularon los valores promedio de ambas poblaciones para IgA, IgG e IgM. Son valores de media (\bar{x}), desviación estándar (σ), varianza (σ^2) y error estándar. Así, éstos valores promedio se registraron en los Cuadros 1, 2 y 3.

4 En segundo lugar, para contrastar la Hipótesis Nula ($H_0: \mu_1 = \mu_2$), se realizó un Análisis de Varianza³⁸⁻⁴⁰ o ANADEVa al conjunto de datos de Absorbancia de los anticuerpos IgA, IgG e IgM, obtenidos del ensayo ELISA, en relación a la condición clínica del paciente, determinada por el seguimiento del estudio microbiológico.

De ésta manera, para comprobar que no hay diferencias entre las medias poblacionales de enfermos y sanos, se registraron los resultados del ANADEVa en los Cuadros 1A, 2A y 3A.

Cuadro 1. Valores promedio de IgA por condición del paciente.

Condición	Tamaño de muestra	Media	Desviación estándar	Varianza	Error estándar
Enfermos	29	0.51028	0.16942	0.02870	0.03146
Sanos	66	0.24221	0.18978	0.3602	0.02336
Total	95	0.3240421			0.0188662

Cuadro 1A. Análisis de Varianza.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrados medios	F-radio	Nivel de significancia
Entre grupos	1.4477530	1	1.4477530	42.816	.0000
Dentro de grupos	3.1446748	93	0.0338137		
Total (corregido)	4.5924278	94			

Cuadro 2. Valores promedio para IgG por condición del paciente.

Condición	Tamaño de muestra	Media	Desviación estándar	Varianza	Error estándar
Enfermos	29	0.34452	0.15403	0.02372	0.02860
Sanos	66	0.16692	0.11347	0.01287	0.01397
Total	95	0.2211368			0.0130348

Cuadro 2A. Análisis de Varianza.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados medios	F-radio	Nivel de significancia
Entre grupos	0.6354334	1	0.6354334	39.367	.0000
Dentro de grupos	1.5011259	93	0.0161411		
Total (corregido)	2.1365592	94			

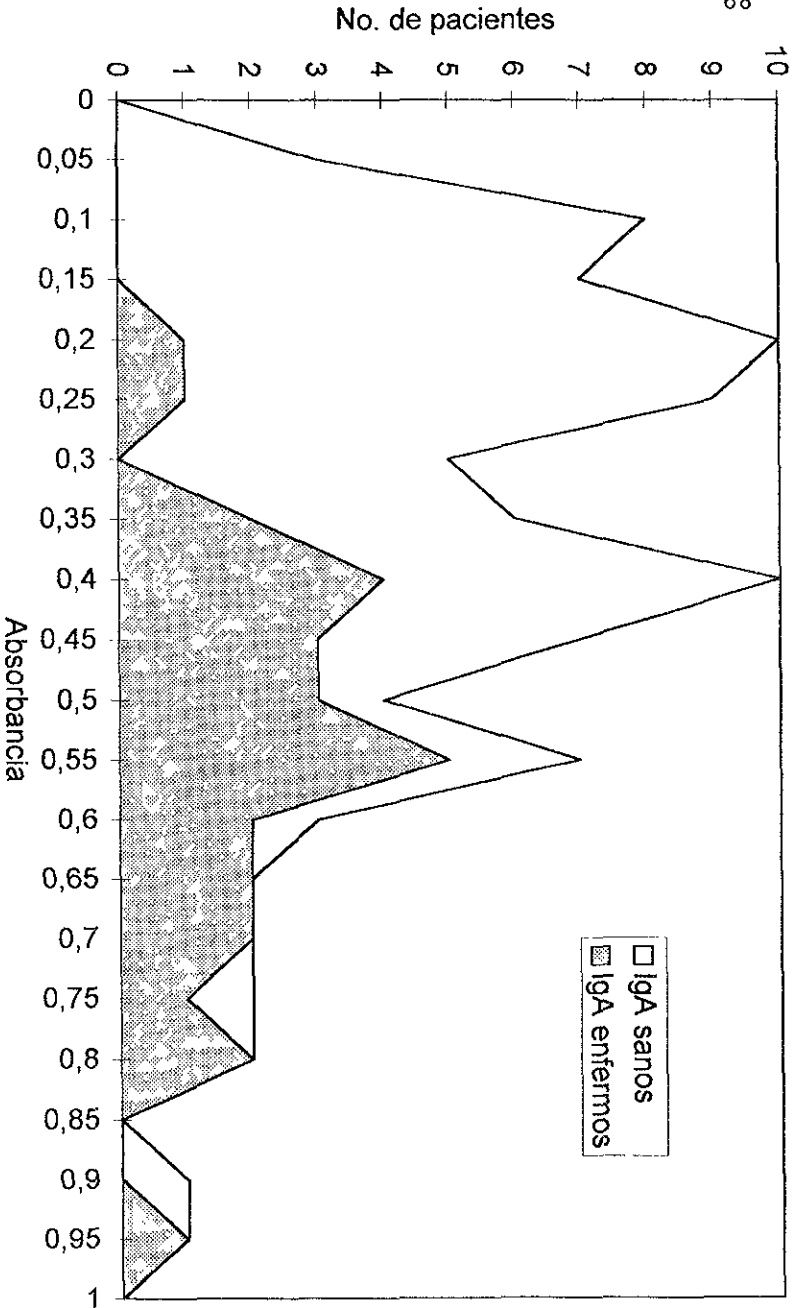
Cuadro 3. Valores promedio para IgM por condición del paciente.

Condición	Tamaño de muestra	Media	Desviación estándar	Varianza	Error estándar
Enfermos	29	0.30541	0.16423	0.02697	0.03050
Sanos	66	0.09770	0.08947	0.00800	0.01101
T o t a l	95	0.1611053			0.0120152

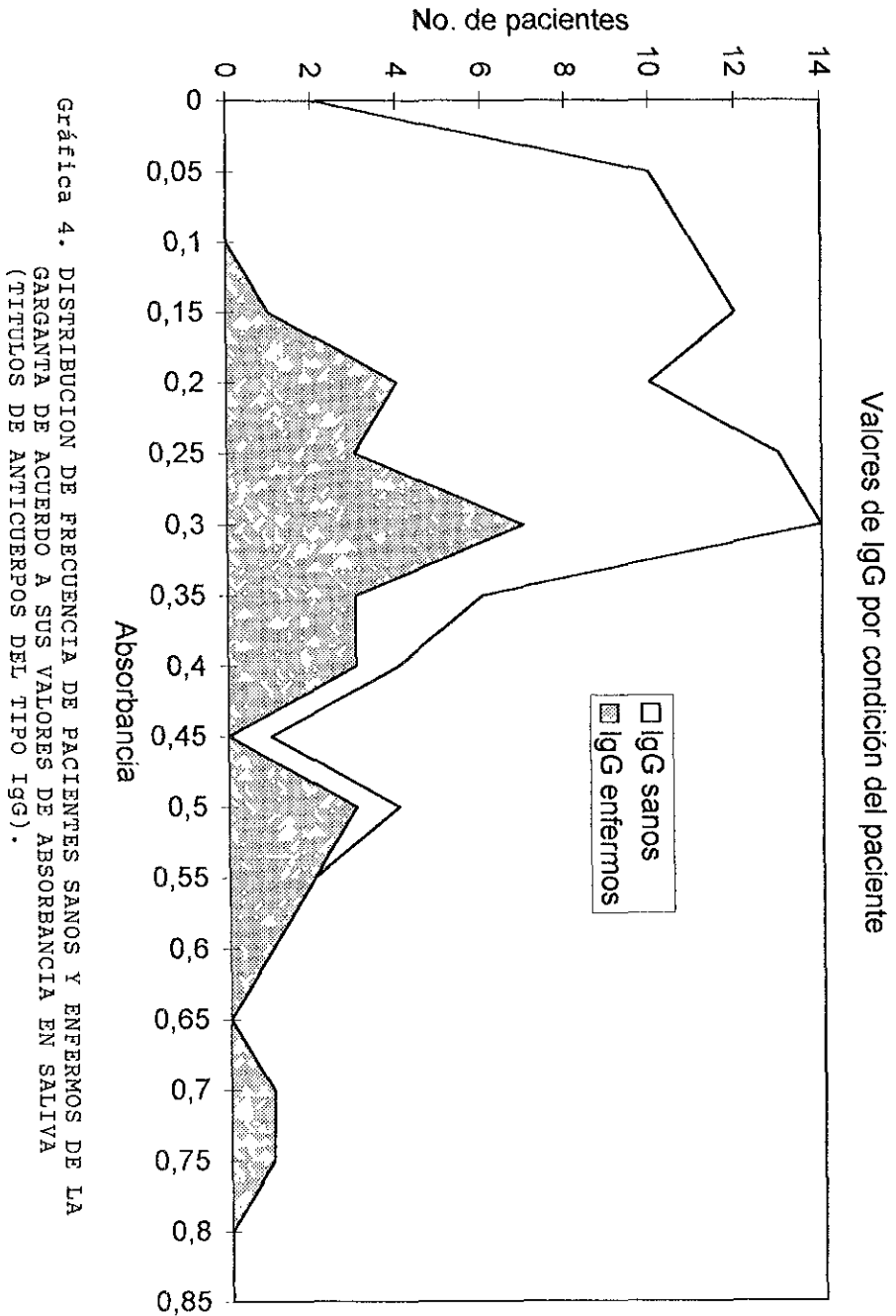
Cuadro 3A. Análisis de Varianza.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados medios	F-radio	Nivel de significancia
Entre grupos	0.8692840	1	0.8692840	63.383	.0000
Dentro de grupos	1.2754730	93	0.0137148		
Total(corregido)	2.1447569	94			

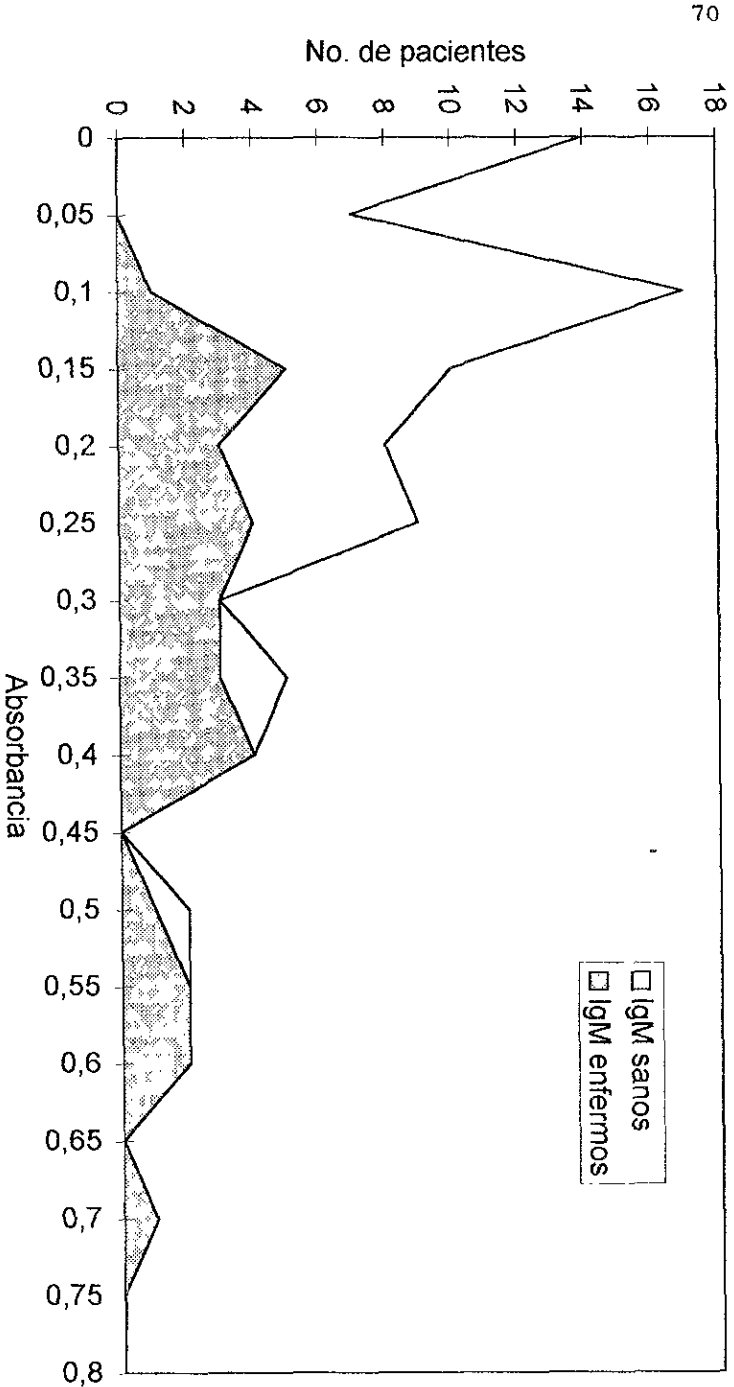
5. Además del análisis de varianza, se obtuvieron las distribuciones de frecuencia por condición del paciente para: IgA, IgG e IgM para contrastar la $H_0: \mu_1 = \mu_2$, de enfermos y sanos para cada tipo de inmunoglobulina. Esta distribución se registró en las gráficas de polígonos siguientes (*Gráficas 3-5*).



Gráfica 3. DISTRIBUCION DE FRECUENCIA DE PACIENTES SANOS Y ENFERMOS DE LA GARGANTA DE ACUERDO A SUS VALORES DE ABSORBANCIA EN SALIVA (TITULOS DE ANTICUERPOS DEL TIPO IgA).



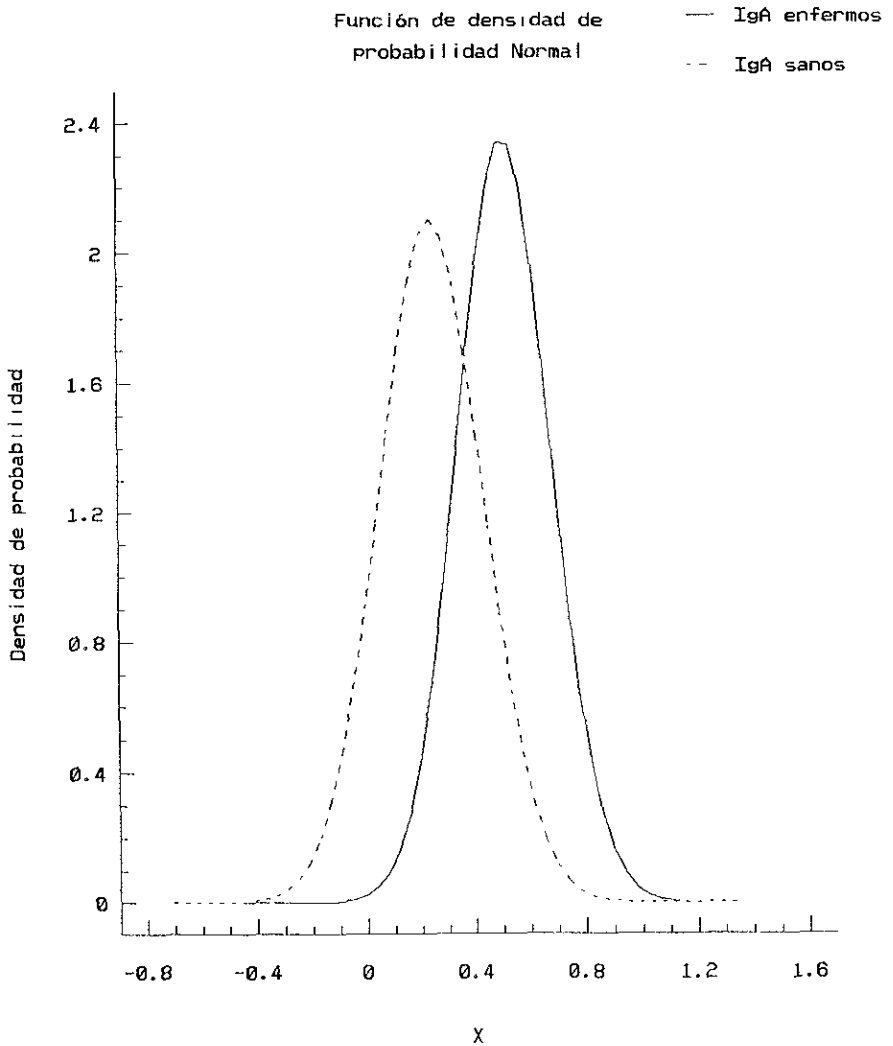
Valores de IgM por condición del paciente



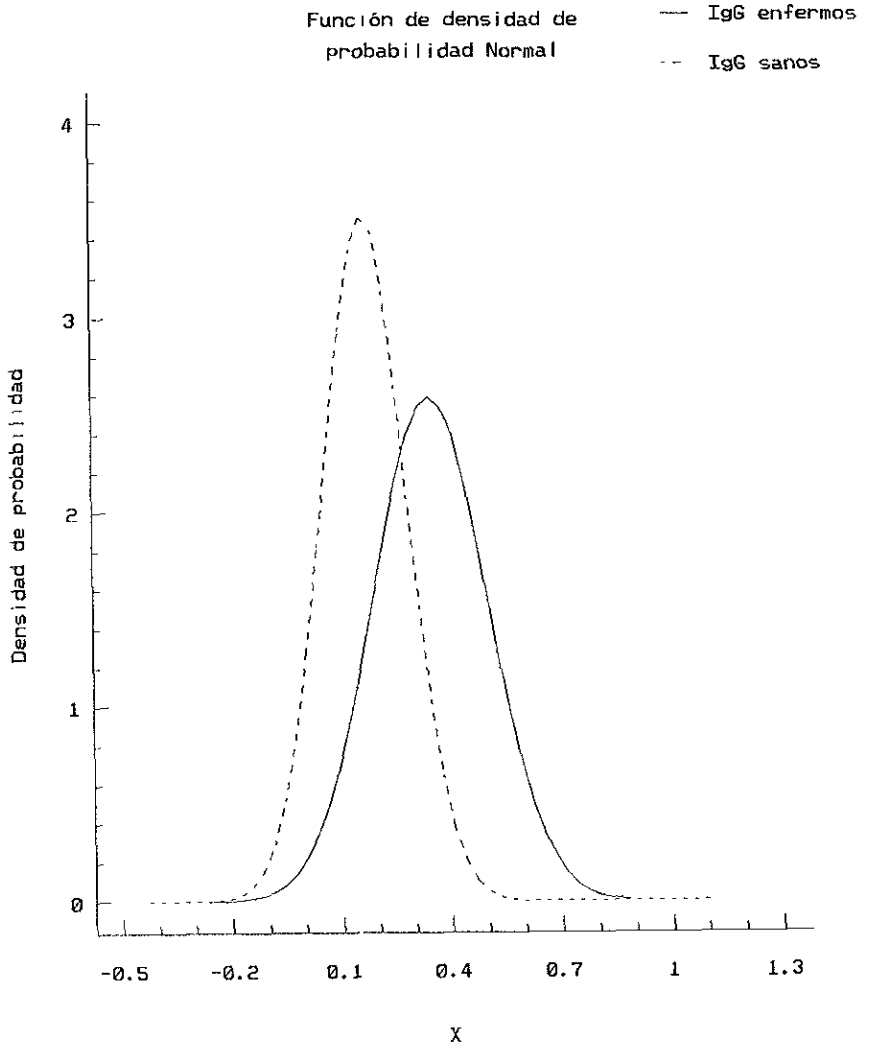
Gráfica 5. DISTRIBUCION DE FRECUENCIA DE PACIENTES SANOS Y ENFERMOS DE LA GARGANTA DE ACUERDO A SUS VALORES DE ABSORBANCIA EN SALIVA (TITULOS DE ANTICUERPOS DEL TIPO IgM).

6. A fin de establecer el comportamiento Normal de las distribuciones de las poblaciones de enfermos y sanos en los tres casos de inmunoglobulinas, se utilizó como punto de estimación paramétrica o punto de cohorte (\bar{x} de la población no enferma + 1.96σ), para un intervalo de confianza del 95%. Se obtuvieron los valores de puntos de estimación: 0.6124 para IgA; 0.3874 para IgG y 0.2714 para IgM. A partir de éstos datos, se trazaron las curvas de función de densidad de probabilidad Normal para ambas poblaciones y para cada una de las inmunoglobulinas (*Gráficas 6-8*).

De esta manera, se determinó que en los pacientes enfermos, los valores de Absorbancia mayores al punto de estimación fueron positivos verdaderos (PV) y los valores menores a dicho punto negativos falsos (NF). Por otro lado, en los pacientes sanos, los valores por arriba del punto de estimación, fueron positivos falsos (PF) y los valores por abajo del punto de estimación fueron negativos verdaderos (NV)



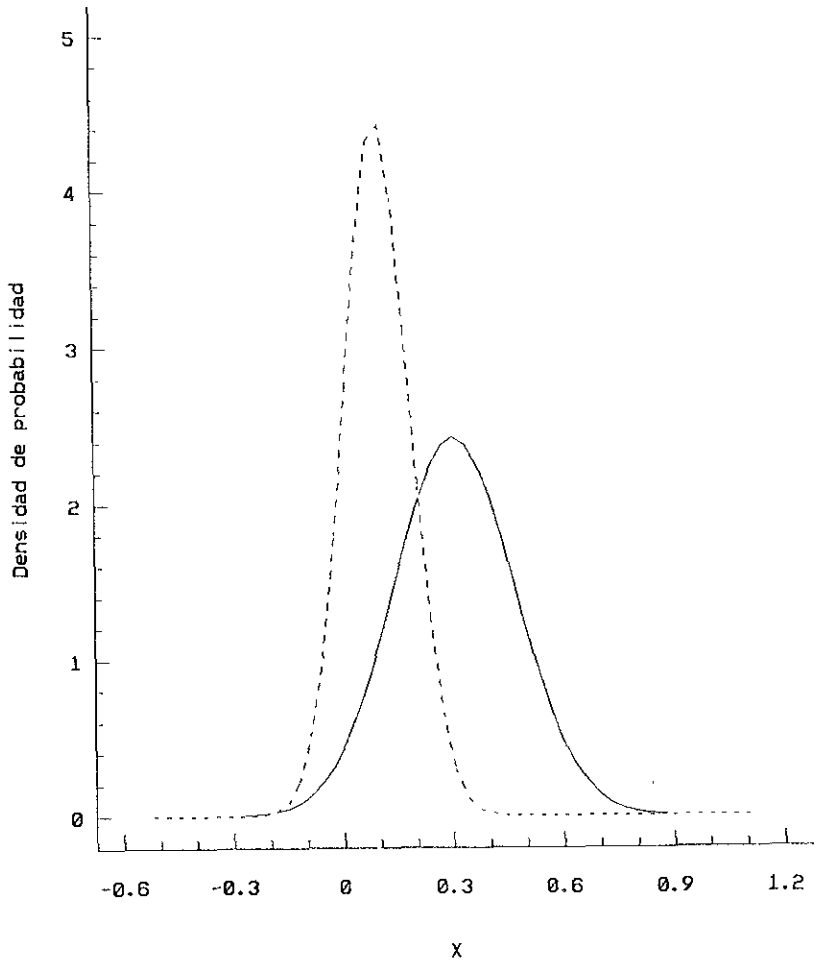
Gráfica 6. FUNCION DENSIDAD DE PROBABILIDAD NORMAL DE ANTICUERPOS IgA EN PACIENTES SANOS Y ENFERMOS DE LA GARGANTA, CON UN PUNTO DE ESTIMACION PARAMETRICA DE 0.6124.



Gráfica 7. FUNCION DENSIDAD DE PROBABILIDAD NORMAL DE ANTICUERPOS IgG EN PACIENTES SANOS Y ENFERMOS DE LA GARGANTA, CON UN PUNTO DE ESTIMACION PARAMETRICA DE 0.3874.

Función de densidad de
probabilidad Normal

— IgM enfermos
- - - IgM sanos



Gráfica 8. FUNCION DENSIDAD DE PROBABILIDAD NORMAL DE ANTICUERPOS IgM EN PACIENTES SANOS Y ENFERMOS DE LA GARGANTA, CON UN PUNTO DE ESTIMACION PARAMETRICA DE 0.2714.

7. Para contrastar la Hipótesis Nula (H_0 : los títulos de anticuerpos son independientes de la condición de enfermedad); así como para demostrar el comportamiento Normal de las poblaciones, se aplicó la prueba ji-cuadrada (χ^2), mediante la Fórmula corregida de Yates ($\chi^2 = n(ad-bc)^2 / (a+b)(c+d)(a+c)(b+d)$) a partir de la elaboración de tablas de contingencia con dos criterios de clasificación (2X2). Se obtuvieron así, los valores de $\chi^2 = 8.15$ para IgA; 12.85 para IgG y 23.19 para IgM, los cuales se presentan en los Cuadros 4-6.

8. Con el conocimiento de los puntos de estimación paramétrica en las poblaciones y la utilización de las tablas de contingencia, se calcularon los índices de Sensibilidad, Especificidad, Valor predictivo positivo y Valor predictivo negativo; para IgA, IgG e IgM, con el propósito de evaluar el método diagnóstico; en éste caso, la técnica ELISA (Cuadro 7).

TABLAS DE CONTINGENCIA Y EVALUACION DEL METODO DIAGNOSTICO.

* Punto de estimación: \bar{X} (población no enferma) + 1.96D.E.

* $\chi^2_{(Teórica)} = \chi^2_{(0.05, 1 g.l.)} = 3.84$

* Ho: Los títulos de anticuerpos son independientes de la condición de enfermedad

* Si $\chi^2_{(calculada)}$ es $> \chi^2_{(teórica)}$, Ho: se rechaza.

PV= Positivos verdaderos= Valores en la población enferma por arriba del punto de estimación.

NF= Negativos falsos= Valores en la población enferma por debajo del punto de estimación

NV= Negativos verdaderos= Valores en la población no enferma por debajo del punto de estimación.

PF= Positivos falsos= Valores en la población no enferma por arriba del punto de estimación.

Cuadro 4. Cálculo de χ^2 para IGA

Punto de estimación= 0.6124

	Enfermos	No enfermos	Totales/fila
Positivos	PV=7	PF=2	9
Negativos	NF=22	NV=64	86
Totales/columna	29	66	95

$\chi^2 = 8.15$

Cuadro 5. Cálculo de χ^2 para IgG.

Punto de estimación: 0.3874

	Enfermos	No enfermos	Totales/fila
Positivos	PV=10	PF=3	13
Negativos	NF=19	NV=63	82
Totales/columna	29	66	95

 $\chi^2 = 12.85$ **Cuadro 6. Cálculo de χ^2 para IgM.**

	Enfermos	No enfermos	Totales/fila
Positivos	PV=15	PF=3	18
Negativos	NF=14	NV=63	87
Totales/columna	29	66	95

 $\chi^2 = 23.19$

*Sensibilidad= PV/ Total de enfermos.

*Especificidad= NV/ Total de no enfermos.

*Valor predictivo positivo= PV/ Total de positivos.

*Valor predictivo negativo= NV/ Total de negativos.

Cuadro 7. Evaluación del método diagnóstico.

*	IgA	IgG	IgM
Sensibilidad	24.13%	34.48%	51.72%
Especificidad	96.96%	95.45%	95.45%
Valor pred.positivo	77.7%	76.92%	83.33%
Valor pred.negat.	74.41%	76.82%	72.41%

VIII. DISCUSION

En estudios previos realizados para la identificación de estreptococos β -hemolíticos del grupo A, se han comparado métodos; por ejemplo, entre el método de disco de Bacitracina (0.02 U) y la técnica de anticuerpo fluorescente, existió una concordancia de resultados de 98% de los 439 cultivos de estreptococos estudiados. La correlación indica que, tanto un método como el otro, son satisfactorios para el uso de rutina y la ocurrencia de resultados negativos falsos es rara⁵¹

Nosotros, realizamos una evaluación de dos métodos diagnósticos para estreptococos β -hemolíticos del grupo A, uno inmunológico (ELISA) y otro microbiológico (método tradicional de cultivo en agar sangre). El Análisis de varianza realizado al conjunto de datos de Absorbancia (títulos de los anticuerpos en saliva IgA, IgG e IgM), mostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias poblacionales: es significativamente más elevada para la población enferma (pacientes positivos a *S.pyogenes*), que para la población sana o de pacientes negativos a *S.pyogenes*, motivo por el cual, se rechazó la Hipótesis Nula que establecía la igualdad entre las dos poblaciones (Cuadros 1A, 2A y 3A). Esto significa que, cuando el paciente presente síntomas de infección en la garganta debido a la presencia de estreptococos β -hemolíticos del grupo A, se inducirá la respuesta inmune oral, de tal suerte que el título de anticuerpos detectados por medio del ensayo ELISA, será considerablemente más elevado que en los pacientes con cultivo de exudado faríngeo negativo a estreptococos β -hemolíticos pertenecientes al grupo A.

Así también, se ha evaluado el significado clínico de los cultivos de saliva positivos para estreptococos β -hemolíticos del grupo A. En 1944, Hamburger estudió clínicamente a pacientes hospitalizados con Faringitis y/o fiebre escarlatina con cultivo de exudado faríngeo positivo para estreptococos β -hemolíticos del grupo A. El encontró que en estados sintomáticos agudos de infección del tracto respiratorio, los cultivos de saliva fueron positivos para el 80%

de los pacientes. Sin embargo, la interpretación del significado clínico se dificulta porque sólo se estudió a pacientes sintomáticos y no se consideró a pacientes asintomáticos. De este estudio, se encontró que los pacientes con Faringitis, tienen una media geométrica más alta de colonias en cultivos de saliva que en pacientes clínicamente negativos. La significancia de éstos resultados que relacionan a individuos con infección auténtica de la garganta puede ser mejor determinada examinando la respuesta de anticuerpos de éstos pacientes.⁶

En nuestro estudio, se consideró en forma aleatoria a la población, de personas sintomáticas y asintomáticas, y con la técnica ELISA, se evaluó la respuesta de anticuerpos en saliva ante la presencia de S.pyogenes, se comparó con el cultivo de exudado faríngeo en agar sangre. Los resultados obtenidos de valores promedio (*Cuadros 1, 2, 3*), tales como la media, varían considerablemente entre las dos poblaciones: enfermos y sanos (*Gráficas 3-5*). El error estándar en los tres casos, fué menor a 0.05 ($p < 0.05$). Los valores de desviación estándar y varianza para IgA e IgM son muy homogéneos, en IgM no ocurre ésto y quizás se deba a que se registraron valores de Absorbancia muy bajos en ambas poblaciones. Se recomienda que para evitar títulos bajos de anticuerpos, el antígeno o carbohidrato C de Lancefield se cuantifique y utilice a la brevedad posible.

El antígeno C de Lancefield puede ser detectado directamente, mediante el uso de pruebas rápidas de diagnóstico basadas en pruebas de aglutinación en látex o coaglutinación,⁵¹⁻⁵⁵ o de ELISA⁵⁶⁻⁵⁸, ambas técnicas son fáciles de realizar y utilizan poco tiempo. Los resultados de negativos falsos en estas pruebas se han asociado frecuentemente con un número bajo de estreptococos en las muestras. La mayoría de los estudios reportan una sensibilidad de 68% a 87.8%^{53,56-58}. Algunos métodos incluyen un paso de enriquecimiento previo de la muestra, incubándola 2 horas en caldo Todd-Hewitt, reportan sensibilidades significativamente más altas del 88% al 90%^{59,60}. Para un ensayo que utiliza una

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

sonda de ácido nucleico se ha informado una sensibilidad del 95.6% y para un sistema de inmunoensayo óptico (IEO), de 97.2%-98.9%;⁶¹ debido a que éstos métodos determinan la presencia del carbohidrato C del grupo A, aún en ausencia de microorganismos viables, se sugiere que tienen el potencial para reemplazar el cultivo en el diagnóstico de la faringitis estreptocócica. La especificidad para cualquiera de estos métodos es muy buena, del 94.2% al 99.7%^{52, 58, 61-63}, lo cual da validez a los resultados positivos.

En éste trabajo, también se determinó la validez de la técnica ELISA, calculando los índices de sensibilidad y especificidad. Primero, se corroboró el comportamiento Normal de las poblaciones de enfermos y sanos, mediante la prueba ji-cuadrada, obteniendo valores de χ^2 más elevados que el valor teórico para IgA, IgG e IgM (*Cuadros 4-6*), por lo que la Hipótesis nula (H_0 : los títulos de anticuerpos son independientes de la condición de enfermedad), se rechazó; es decir, los niveles de anticuerpos en saliva dependerán de la condición de salud del paciente con infección en la garganta.

Así pues, se observó que los tres tipos de anticuerpos siguieron un comportamiento de modelo Normal (*Gráficas 6-8*).

Después, para un intervalo de confianza del 95%, se utilizaron como puntos de estimación paramétrica 0.6124 para IgA, 0.3874 en IgG y 0.2714 con IgM, con éstos valores se integró una tabla de contingencia 2X2 y se obtuvieron los valores de Sensibilidad, Especificidad, Valor predictivo negativo y positivo (*Cuadro 7*).

Con base en los resultados obtenidos, se observó que la IgM tuvo mayor Sensibilidad y valor predictivo positivo que IgA e IgG; el anticuerpo IgA presentó mayor especificidad que IgG e IgM, aunque también ambas fueron muy específicas. La IgG tuvo mayor valor predictivo negativo que IgA e IgM.

Ahora bien, si la IgM participa activamente en la respuesta inmune primaria local, la idea de entregar un resultado positivo al paciente cuando esté enfermo (positivo a *S.pyogenes*); es decir, un resultado con elevada sensibilidad, otorga al Médico la ventaja de poder prescribir al paciente, el tratamiento más adecuada y oportunamente. Del mismo modo, la alta probabilidad de entregar un resultado negativo cuando el paciente no tiene la enfermedad (negativo a *S.pyogenes*), demuestra que la técnica ELISA es rápida y eficiente si se compara con el estudio microbiológico, el cual resulta más tardado y complicado.

Por eso, se recomienda que siempre que un paciente acuda a la toma de muestra de exudado faríngeo, se recolecte su saliva para realizar la técnica ELISA, utilizando conjugados enzimáticos IgA, IgM e IgG unidos a peroxidasa. De ésta manera, se tendría la posibilidad de realizar el inmunoensayo enzimático con un número mayor de muestras positivas que el tratado en éste trabajo; además existe la ventaja de entregar un diagnóstico rápido de la enfermedad, lo que conllevará al pronto reestablecimiento de los pacientes y se impedirá el contagio a otras personas.

Se sugiere determinar antígenos bacterianos por medio de la técnica ELISA, en éste caso Carbohidrato C de Lancefield, ya que presenta la ventaja de comprobar si el paciente está o no enfermo.

En la parte microbiológica de nuestro estudio, se identificó *S. pyogenes* principalmente con el método de disco de Bacitracina y con pruebas bioquímicas; pero, existen *Kits* que son de gran utilidad en el Laboratorio, por ejemplo el Kit comercial de la prueba PYR, la cual pone de manifiesto la presencia de la enzima pirrolidonil-arilamidasa, la cual es específica de *S pyogenes*.⁶⁴

IX. CONCLUSIONES

1. Los títulos de anticuerpos IgA, IgG e IgM no son independientes de la condición de enfermedad.
2. La técnica ELISA es más sensible en la determinación de IgM en saliva y más específica para IgA.
3. Los elevados índices predictivos positivo y negativo en los tres casos, indican que la técnica ELISA es confiable para uso clínico e investigación y eficaz en el diagnóstico presuntivo de la enfermedad de la garganta
4. El estudio microbiológico de *Streptococcus pyogenes* a partir de exudados faríngeos es segura, sin embargo, la técnica ELISA es más rápida y menos complicada.

X. ANEXOS

I. GLOSARIO: ⁶⁵

Afinidad: Medida de la fuerza de unión de la reacción antígeno-anticuerpo.

Anticuerpos: Proteínas que se combinan específicamente con los antígenos.

Antígenos: Sustancias que inducen una respuesta inmune.

Cadena J: Porción de la molécula IgM que posiblemente mantiene la estructura, siendo por ende, la cadena de unión.

Cadena liviana: Porción de una molécula de inmunoglobulina compuesta por una cadena polipeptídica de aproximadamente 22, 000 daltons.

Cadena pesada: Porción de la molécula de inmunoglobulina formada por una cadena polipeptídica de aproximadamente 50, 000 daltons.

Células B: Linfocitos B que se transforman en células plasmáticas y producen anticuerpos.

Células plasmáticas: Células productoras de inmunoglobulinas

Determinante antigénico: Porción de un antígeno involucrada en una reacción antígeno-anticuerpo.

Fragmento Fab: Porción de la molécula de inmunoglobulina obtenida por degradación con papaína, que contiene la cadena liviana y parte de la cadena pesada.

Fragmento Fc: Porción de la molécula de inmunoglobulina que contiene la mayor parte de la cadena pesada tras su degradación con la papaína.

Haptenos: Sustancias de bajo peso molecular que pueden inducir una respuesta inmune sólo cuando están acopladas a moléculas inmunogénicas de elevado peso molecular.

Inmunoglobulinas (Ig): Proteínas con actividad de anticuerpo.

Pieza de secreción: Cadena polipeptídica unida a la IgA y necesaria para su secreción hacia los espacios mucosos

Precipitación: Reacción en la cual, el antígeno y el anticuerpo se encuentran en relación apropiada para formar una gran red o matriz al reaccionar. Dicha matriz se vuelve insoluble y precipita, formando una línea de precipitación.

Reactividad cruzada: Unión de un anticuerpo con un antígeno distinto del iniciador de la respuesta inmune.

Región constante: Región no combinante de las cadenas polipeptídicas de las inmunoglobulinas.

Región variable: Porción N-terminal de la cadena polipeptídica de la inmunoglobulina, cuya secuencia de aminoácidos puede cambiar, esta región incluye el sitio de combinación con el antígeno.

II. PREPARACION DE SOLUCIONES.

1. REACTIVO DE LOWRY.

Reactivo A:

Carbonato de Sodio al 2% y Tartrato de Sodio y Potasio al 0.02% en Hidróxido de Sodio al 0.1N

Reactivo B:

Sulfato de Cobre al 0.5%

Mezclar 50 ml del reactivo A con 1.0 ml del reactivo B. Los reactivos A y B deben conservarse a 4°C.

2. SOLUCION SALINA ISOTONICA (SSI):

Pesar 8.5g de Cloruro de Sodio. Disolver el Cloruro de Sodio en un litro de agua destilada

3. SOLUCION AMORTIGUADORA DE CARBONATOS (AMORTIGUADOR DE RECUBRIMIENTO):

Amortiguador de carbonato bicarbonato pH= 9.6.

Pesar 1.59g de Carbonato de Sodio, 2.93 g de Bicarbonato de Sodio y llevar a un litro con agua bidestilada. Se puede almacenar a 4°C por no más de dos semanas.

4. SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS:

Preparar las soluciones concentradas A y B.

Solución concentrada A Pesar 27.6g de Fosfato de Sodio monobásico monohidratado en un litro de agua destilada (0.2 m).

Solución concentrada B Pesar 28.39 g de Fosfato de Sodio dibásico anhidro o 53.62 g de Fosfato de Sodio heptahidratado en un litro de agua destilada.

Se mezclan los volúmenes (ml) de las soluciones concentradas como se indica a continuación y se afora a 200 ml para obtener los valores de pH correspondientes:

Solución A	Solución B	pH	Molaridad
73.5	26.5	6.4	0.1
13.0	87.0	7.6	0.01

5. SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS-TWEEN (PBS-TWEEN), pH=

7.4:

Pesar:

8g de Cloruro de Sodio

0.2g de Fosfato de Potasio monobásico

2.9g de Fosfato de Sodio dibásico dodecahidratado.

0.2g de Cloruro de Potasio.

0.5 ml de Tween-20

Disolverlos en agua bidestilada y aforar a un litro.

Almacenar en refrigeración.

6. SOLUCION AMORTIGUADORA DE SALINA FOSFATOS (PBS) pH= 7.2:

Pesar:

8g de Cloruro de Sodio

0.2g de Cloruro de Potasio

1.15g de Fosfato de Sodio dibásico

0.2g de Fosfato de Potasio monobásico

Disolverlos en agua bidestilada y aforar a un litro.

1. BASE DE AGAR SANGRE:

Suspender 40g de agar base en 1 litro de agua destilada, dejar reposar por 15 minutos y calentar a ebullición hasta disolver completamente. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos a 15 lb de presión. Después, enfriar a una temperatura de 45-50°C y agregar la sangre desfibrinada estéril, en una concentración al 5%. El medio de agar sangre se vierte en varias cajas de Petri limpias y estériles.

2. CALDO TIOGLICOLATO.

Pesar 28.5g de medio tioglicolato, suspender en 1 litro de agua destilada, calentar con agitación manual constante. Hervir durante 1 minuto. Dejar enfriar y verter el caldo en tubos con tapón de baquelita, con volúmenes de 5 ml.

III. PRUEBAS BIOQUIMICAS: 9

III. A) CATALASA:

La prueba de la catalasa, llevada a cabo en portaobjetos o en tubos, es muy comúnmente utilizada para diferenciar estreptococos (positivos) de estafilococos (negativos) o especies de bacilos Gram positivos y micobacterias

Medios y reactivos:

1. Peróxido de hidrógeno al 30%, conservado en refrigerador y de color ámbar.
2. Placa de agar o agar en "pico de flauta" (preferiblemente sin sangre ya que los eritrocitos poseen actividad de catalasa) con un cultivo puro de 18 a 24 horas del organismo en estudio

Prueba en portaobjeto:

1. Con una aguja de punción o un palillo aplicador con la punta aguzada transferir células del centro de una colonia bien aislada a la superficie de un portaobjeto.
2. Añadir 1 o 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 3% (diluir la solución al 30% con agua destilada). Se recomienda no añadir el organismo al reactivo (invirtiendo el orden), especialmente si se usan agujas o asas que contienen hierro, ya que se pueden producir resultados positivos falsos.

Método en tubos o placas de agar:

1. Diluir 1:10 el peróxido de hidrógeno al 30% en agua destilada para obtener una solución al 3%.
2. Añadir unas gotas (aproximadamente 1 ml) del peróxido de hidrógeno al 3% directamente sobre la superficie del desarrollo de una placa o pico de agar. En la prueba semicuantitativa en tubos, el agar se vuelca formando una superficie plana en lugar de inclinada

Interpretación:

1. Prueba cualitativa: La rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia, indica una reacción positiva. Dado que algunas bacterias pueden poseer enzimas distintas a la catalasa, capaces de descomponer el peróxido de hidrógeno, unas pocas burbujas diminutas formadas a los 20 a 30 segundos no se consideran una prueba positiva.

2. Prueba semicuantitativa: Las determinaciones cuantitativas de catalasa se llevan a cabo más comúnmente en la identificación de especies de micobacterias. Se mide la altura que alcanza la formación de burbujas de gas en el tubo luego de añadir el peróxido de hidrógeno. Una columna de 50 mm o más se considera una reacción fuertemente positiva.

Controles:

89

El reactivo peróxido de hidrógeno debe ensayarse con organismos de control positivos y negativos en forma diaria o inmediatamente antes de investigar bacterias desconocidas.

Control positivo: *Staphylococcus aureus*.

Control negativo: *Streptococcus spp*

III.B) HIDROLISIS DE HIPURATO.

Los estreptococos del grupo B contienen la enzima hipuricasa capaz de hidrolizar el ácido hipúrico. Otros estreptococos β -hemolíticos, como por ejemplo del grupo A, carecen de esta enzima.

Medios y reactivos.

Prueba del benzoato.

1. Medio con hipurato de sodio:

Caldo infusión de corazón	25g
Hipurato de Sodio	10g
Agua destilada	1000 ml

2. Reactivo cloruro férrico:

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12 g
HCl al 2% en agua	100 ml

1. Reactivo hipurato de sodio:

Hipurato de Sodio	1 g
Agua destilada	100 ml

2. Reactivo ninhidrina:

Ninhidrina	3.5 g
Acetona/butanol	100 ml

Técnica:***Prueba del benzoato:***

1. Inocular un tubo de caldo hipurato con el organismo por investigar. Incubar a 35°C durante 20 horas o más.
2. Centrifugar el medio para sedimentar las células y transferir con una pipeta 0.8 ml del sobrenadante claro a un tubo limpio.
3. Añadir al tubo 0,2 ml del reactivo cloruro férrico y mezclar bien

Prueba de la glicina:

1. Inocular un asa de una suspensión de cultivo de un estreptococo beta-hemolítico en 0,4 ml de reactivo hipurato de sodio al 1% en un tubo pequeño.
2. Incubar el tubo durante 2 horas a 35°C.
3. Añadir 0,2 ml del reactivo ninhidrina y mezclar bien.

Interpretación:

1. *Prueba del benzoato:* al añadir el reactivo cloruro férrico se forma un precipitado abundante. Si la solución se aclara dentro de los 10 minutos, la reacción es inespecífica y debida a la interacción con el hipurato no hidrolizado o la proteína del medio. Si el precipitado persiste más de 10 minutos es que se ha formado benzoato de sodio, indicando hidrólisis y una prueba positiva.

2. *Prueba de la glicina*: la aparición de un color púrpura intenso luego de añadir el reactivo ninhidrina indica la presencia de glicina y una reacción positiva de hidrólisis de hipurato.

Controles:

Control positivo: estreptococos grupo B

Control negativo: estreptococos grupo D.

III.C) PRUEBA DE BILIS-ESCULINA.

La prueba bilis-esculina está basada en la capacidad de ciertas bacterias, particularmente los estreptococos del grupo D, de hidrolizar esculina en presencia de bilis al 1% a 4%

Medios y reactivos:

El medio bilis-esculina se prepara usualmente en tubos, en forma de "pico de flauta". La fórmula es.

Peptona	5 0 g
Extracto de carne	3.0 g
Bilis de buey	40 g
Esculina	1.0 g
Citrato Férrico	0 5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

pH =7

Pfizer: medio selectivo para enterococos (SEM; contiene azida sódica).

Difco: medio bilis-esculina (BEM; con suero equino); medio bilis-esculina modificado (MBEM; sin suero equino).

BBL: medio bilis-esculina (BEM), agar selectivo para enterococos (contiene azida sódica).

Diagnóstico general tira de bilis-esculina (Patho Tec)

Interpretación:

La esculina, siendo hidrosoluble, difunde hacia el medio de agar. La reacción es positiva si se observa ennegrecimiento difuso del pico, en el caso de las prueba en placas, un halo de color marrón o negro alrededor de las colonias. En la tira Patho Tec, se observa un ennegrecimiento en la zona de reacción de los organismos que hidrolizan esculina.

Controles:

Control positivo: estreptococo grupo D

Control negativo: estreptococo no grupo D.

III.D) PRUEBA DE CAMP.

La identificación de estreptococos hemolíticos del grupo B se ha simplificado con la implementación de la prueba CAMP.

Medios y reactivos:

Se debe usar sangre ovina o bovina. La sangre ovina lavada, resuspendida en solución fisiológica, provoca los resultados más reproducibles. La prueba se lleva a cabo en una placa de Petri común de 100 mm con agar sangre ovina.

Técnica:

La prueba CAMP se realiza trazando una estría de estreptococos (por identificar) en forma perpendicular a otra estría de una cepa de Staphylococcus aureus conocida como productora de β -lisina. Ambas líneas no deben tocarse. Las placas inoculadas se deben incubar a temperatura ambiente. Si bien la incubación en un frasco con vela puede acelerar la reacción, se observan más estreptococos del grupo A positivos falsos.

Las placas no deben incubarse en un medio anaeróbico pues muchos estreptococos del grupo A son positivos en un ambiente anaeróbico.

Interpretación:

La zona de intensificación de lisis asume la forma de una cabeza de flecha en la intersección de ambas estrías. Cualquier estreptococo bacitracina negativo, CAMP positivo, bilis-esculina negativo, puede ser identificado como estreptococo grupo B, presuntivo por CAMP. Los estreptococos del grupo A son bacitracina positivo, bilis-esculina negativo y CAMP negativo

Controles:

Control positivo: estreptococos grupo B (S. agalactiae)

Control negativo: estreptococo grupo A o estreptococo grupo D

XI. REFERENCIAS

1. Isenberg HD, D'amato RF. Indigenous and Pathogenic Microorganisms of Humans. En: Balows A, Hausler WJ, Herrmann Kennet L, Isenberg HD, Shadomy HJ. Manual of clinical microbiology. 5a.ed. Washington DC: Society for microbiology, 1995: 2-5.
2. Balows A, Hausler WJ, Herrmann K, Isenberg H, Shadomy HJ Manual of clinical Conroy JM, Stevens RW, Hechemy KE. Enzyme immunoassay. En: microbiology. 5a.ed. Washington DC: Society for microbiology, 1995: 87-88.
3. Lee FK. Detection and quantitation of specific immunoglobulin responses. En: Balows A, Hausler WJ, Herrmann K, Isenberg H, Shadomy HJ. Manual of clinical microbiology.5a.ed. Washington DC: Society for microbiology, 1995:105-109.
4. Facklam RR, Washigton JA. Streptococcus and related catalase-negative gram positive cocci. En: Balows A, Hausler WJ, Herrmann K, Isenberg H, Shadomy HJ. Manual of clinical microbiology. 5a. ed. Washington DC: Society for microbiology, 1995: 238-250.
5. Denny Jr. FW. Group A streptococcal infections. Curr Prob Ped 1993;23:179-185.
6. Kaplan EL, Couser R, Ballard HB, Mckay C, Wannamaker LW. Significance of quantitative salivary cultures for group A and non-group A beta-hemolytic streptococci in patients with pharyngitis and their family contacts. Pediat 1979;64 (6): 904-911.
- 7 Editor's column. Culturing beta hemolytic streptococci in pediatric practice-observation after twenty years. The J of Pediat 1969; 75 (1): 164-166.
- 8 Oldstone MBA. Current topics in microbiology and immunology, molecular mimicry. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1989: 6-23.
- 9 Scott-Bailey, Finegold SM, Jo Baron E. Diagnóstico microbiológico. 7a.ed. Buenos Aires, Argentina: Interamericana, 1988: 291-305, 354-356.
10. Gómez VC, BLC. Microbiología en Otorrinolaringología. Bioquimia 1990; 15 (59): 39-44.

11. Baird-Paker. Bacterias médicamente importantes. En: Todd Sandford-Davidson. Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio. 7a. ed. Barcelona, España: Salvat, 1985 2: 1576-1580.
12. Lennette EH, Balows A, Hausler WJ. Estreptococos y aerococos Manual de microbiología clínica. 4a.ed. Buenos Aires, Argentina: Panamericana, 1987: 202-225.
13. Delaat, ANC. Microbiología médica. 3a. ed. México, D.F: Interamericana, 1972: 122-125.
14. Burrows W. Tratado de Microbiología. 7a. ed. México, D.F: Interamericana, 1965:371-388
15. Davis B, Dulbecco R. Tratado de Microbiología.10a.ed. Barcelona, España. Salvat, 1989: 732-747.
16. Smith RE, Pease CW, Reiquam and Beatty. A comparison of multiple technics in the recovery of group A streptococci from throat cultures of children. Am J Dis 1984; 44 No. 6: 689-694.
17. Jawetz M, Adelberg. Microbiología clínica. 14a. ed. México, D.F: El Manual Moderno, 1985: 228-237.
18. Goodman JW. Inmunoglobulinas: estructura y función. En: Stites DP, Stobo JD, Wells JV. Inmunología básica y clínica. 6a. ed. México, D.F: El Manual Moderno, 1988: 32-44
19. Lynch MJ, SS Raphael, LD Mcllor, PD Spare, MJH Inwood. Métodos de Laboratorio. 8a. ed. México, D.F: Interamericana, 1972 : 933-935.
20. Ayoub Elia M Enfermedades cardíacas En: Stites DP, Stobo JD, Wells JV. Inmunología básica y clínica. 6a.ed. México, D.F: El manual moderno, S. A de C.V, 1988: 490-495.
21. Van Oss CJ. Las inmunoglobulinas. En: Rose N. R, Milgrom F Principios de inmunología. 5a.ed. México, D.F: Continental, 1983. 252-257.
22. Roitt IM. Esential immunology. 6a.ed. Oxford, Inglaterra: Blackwell Scientific Publications, 1988 31-43.
23. Bellanti AJ. Inmunología. 3a.ed. México, D.F: Interamericana, 1986: 210-215.

24. Bhagavan NV. Bioquímica. 10a.ed. México, D.F: Interamericana, 1978: 110-116.
25. O' beirne AJ and Cooper, Harold R. Heterogeneous enzyme immunoassay. The J of Histochem and Cytochem 1979; 27(8): 1148-1162.
26. Rosenstein SE. Diccionario de especialidades en análisis clínicos. 6a. ed. México, D.F: Ediciones PLM, 1991: 59-60 y 106-108.
27. Nieto A, Carbonetto CH. Enzimoimmunoensayo(ELISA). En: Margi R.A. Inmunología e inmunquímica. 4a.ed. Buenos Aires, Argentina: Panamericana, 1989. 571-586.
28. Kemeny DM. A practical guide to ELISA. Department of Allergy Guy's Hospital, London: Pergamon Press. Member of maxwell macmillan pergamon publishing corporation, 1991:21-25.
29. Lehtonen OP, Vilhanen MK. Antigen attachment in ELISA. The J of Immunol Meth 1980; 34: 61-70.
30. Herzenberg B. Handbook of experimental immunology and immunochemistry. 4a ed Great Britain: Blackwell Scientific Publications, 1986; 1: 27.1-27.2.
31. Revista de enfermedades infecciosas en pediatría: Ensayos inmunoenzimáticos . 1989 jul-sep, 2 83-89.
32. Voller A, Didwell D, Bartlett A. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). Manual of clinical immunology. Edit. Rose Friedman, 1980: 359-371
33. Kemeny R. U, D.Samuel, D.Richards and H.J.Maasch.The use of monoclonal and polyspecific antibodies in the IgE sandwich ELISA. The J of Immunol Meth (JIM) 1986; 87: 45-50
34. Kabat EA, Mayer M. Inmunoquímica experimental. México, D.F : La Prensa Médica Mexicana, 1968: 409-411, 496-498, 503.
35. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. colorimetric method for determination of sugars and related substances Analytical Chem 1956, march, 28(3). 350-356

36. Varios autores. Manual de prácticas de inmunología básica y clínica. México, D.F: ENCB-IPN Sección de graduados, Depto. de inmunología, 1980.
37. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Lowry folin-protein determination. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-267.
38. Cañedo DL. Investigación clínica. 3a.ed. México, D.F: Interamericana, 1988: 112-126.
39. Márques de Cantú MJ. Probabilidad y estadística para las ciencias químico-biológicas. University of Maryland, USA: UNAM, 1988: 153, 337-348.
40. Kash Kachigan Sam. Multivariate stadistical analysis. A conceptual introduction. 2d.ed. New York: Radius Press, 1991: 90-99, 194-204.
41. Departamento de Otorrinolaringología, Colegio Médico. Práctica familiar en el dolor de garganta. Comparación del cultivo de exudado de garganta en agar sangre con una prueba rápida de inmunoensayo enzimático para propósitos de diagnóstico. *Cita, Japón. J-R-Coll-Gen-Pract* 1989 agos; 39 (325): 332-334.
42. Cusker Mc, James J, McCoy E, Young CL, Alamares R. Comparación de la prueba directigen strep grupo A con la técnica tradicional de cultivo para la detección de estreptococos beta hemolíticos del grupo A. *The J Clin Microbiol* 1984; 20(4): 824-825.
43. BG Mi ceika, AS Vitous and KD Thompson. Detection of group A streptococcal antigen directly from throat swabs with a ten-minute latex agglutinal test. *The J Clin Microbiol* 1985; 21(3): 467-469.
44. Lyerly WH, Bass JB, Harden LB, et al. Identification of group A streptococci with bacitracin disc on the primary throat culture plate. *J Pediatr* 1980; 96. 431-433.
45. Murray PR, Wold AD, Hall M, et al. Bacitracin differentiation for presumptive identification of group A β -hemolytic streptococci: Comparison of primary and purified plate testing. *J Pediatr* 1976; 89: 576-579.
46. Dykstra MA, McLaughlin JC, Bartlett RC. Comparison of media and techniques for detection of group A streptococci in throat swab specimens *J Clin Microbiol* 1979; 9: 236-238.

47. Lauer BA, Reller LB, Mirrett S. Effect of atmosphere and duration of incubation on primary isolation of group A streptococci from throat cultures. *J Clin Microbiol* 1983; 17: 338-340.
48. Kellog J. A, Manzella J. P. Detection of group A streptococci in the laboratory or physicians office. *J. Amer. Med. Assoc. (JAMA)* 1986; 255: 2638-26.
49. Giono CS, Sandoval AB, Avitia HC. El estreptococo y la fiebre reumática. *Rev Lat-Amer Microbiol* 1974; 16: 111-122.
50. Wald ER. Acute rheumatic fever. *Current Prob Ped.* 1993;23: 264-270.
51. Petran EI. Comparison of the fluorescent antibody and the bacitracin disk methods for the identification of group A streptococci. *The Am J of Clin Pathol* 1964; 41(2): 224-226.
52. Andersen JS, Borrild NJ, Renneberg J. An evaluation of a commercial coagglutination test for the diagnosis of group A streptococcal tonsillitis in a family practice. *Scand J Prim Health Care* 1992; 10: 223-225.
53. Bodino JA, López EL, Rubeglio E, Gravedoni C. Método rápido de aglutinación del látex por hisopado faríngeo para el diagnóstico de faringitis por estreptococo beta-hemolítico grupo A. *Rev Hosp Niños B Aires* 1987; 29: 14-22.
54. Gupta R, Rattan A, Prakash K, Talwar GP, Gupta SK. Immunodiagnosis of group A streptococci by latex agglutination assay with monoclonals or monospecific polyvalent antibodies. *Indian J Med Res* 1993, 97. 25-31.
55. Wiedermann BL, Schwartz RH, McCoy P. Experience with rapid latex agglutination testing for group A streptococcal pharyngitis in a pediatric group office laboratory. *J Am Board Fam Pract* 1991; 4: 79-82.
56. Drulack M, Bartholomew W, Lascolea L, Amsterdam D, Gunnensen N, Yong J, Fijaikowski C, Winston S. Evaluation of the modified Visuwell Strep a enzyme immunoassay for detection of group A *Streptococcus* from throat swabs. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1991; 14. 281-285.
57. Gupta R, Talwar GP, Gupta SK. Rapid antibody capture assay for detection of group A streptococci using monoclonal antibody and colloidal gold-monospecific polyvalent antibody conjugate. *J. Immunoassay* 1992; 13: 441-455.

58. Schwabe LD, Gobbo AF, Gottschall RL, Randall EL. Comparison of TestPack plus strep A with selective and non selective culture media for detection of group A streptococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1991; 14: 367-372.
59. Anhalt JP, Hester BJ, Naumovitz DW, Bourbeau PP. Comparison of three methods for detection of group A streptococci in throat swabs. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2135-2138.
60. Bourbeau PP, Hester BJ, Anhalt JP, Naumovitz DW. Comparison of direct specimen testing utilizing test Pack Strep A with testing specimens following a two-hour broth enrichment. *Diag Microbiol Infect Dis* 1993; 17: 93-96.
61. Harbeck RJ, Teague J, Crossen GR, Maul DL, Childers PL. Novel, rapid optical immunoassay technique for detection of group A streptococci from pharyngeal specimens: comparison with standard culture methods. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 839-844.
62. Hester BJ, Bourbeau PP. comparison with the gen-probe group A *Streptococcus* direct test with culture and rapid streptococcal antigens detection assay for diagnosis of streptococcal pharyngitis. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2070-2073.
63. Facklam RR. Specificity study of kits for detection of group A streptococci directly from throat swabs. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 504-508.
64. Gordon Deborah, Degirolami PC, Bolwar S, Karafotuaw G, Eichelberger K. A comparison of identification of group A streptococci and enterococci by two rapid pyrrolidonyl aminopeptidase methods. *Am J Clin Pathol* 1988; 90(2): 210-212.
65. Bassion Susan. Reacciones inmunológicas. En: Kaplan Lawrence A, Pesce AJ *Química clínica*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana, 1988: 194.

FE DE ERRATAS

PAGINA	REGLON	DICE:	DEBE DECIR:
27	28	PRUBA	PRUEBA
48	20	mustras	muestras
51	2	tición	tinción
84	9	precipta	precipita
85	24	heptahiratado	heptahidratado