



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTANDARIZACIÓN DE UN ENSAYO TIPO ELISA PARA DETERMINAR  
LOS NIVELES SÉRICOS DE INMUNOGLOBULINAS ESPECÍFICAS  
DIRIGIDAS CONTRA 14 SEROTIPOS DE *Streptococcus pneumoniae*  
PARA EL APOYO AL DIAGNÓSTICO DE LA INMUNODEFICIENCIA  
ESPECÍFICA DE ANTICUERPOS.**

**TESIS MANCOMUNADA**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA  
Y  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTAN**

**MARIEL ALEJANDRA GONZÁLEZ PACHECO  
Y  
ELLIOT ALAN ANTONIO GONZÁLEZ SOLÍS**



**MÉXICO, D.F.**

**2015**



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 esta 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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Enrique Ortega Soto

**VOCAL:** Profesor: Mónica Berenice Heras Chavarría

**SECRETARIO:** Profesor: Edgar Alejandro Medina Torres

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Sonia Mayra Pérez Tapia

**2° SUPLENTE:** Profesor: Julio César Martínez Álvarez

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

### **ASESOR DEL TEMA:**

Edgar Alejandro Medina Torres

\_\_\_\_\_

### **SUSTENTANTES:**

Mariel Alejandra González Pacheco

\_\_\_\_\_

Elliot Alan Antonio González Solís

\_\_\_\_\_

# Índice

1. RESUMEN .....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	2
3. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1 Sistema inmunitario .....	4
3.2 Sistema inmunitario innato.....	5
3.3 Sistema inmunitario adaptativo.....	5
3.4 Respuesta inmunitaria humoral.....	6
3.4.1 Inmunoglobulina G.....	8
3.5 Respuesta humoral frente a antígenos independientes de los linfocitos T.....	9
3.6 Inmunodeficiencias .....	11
3.7 Inmunodeficiencias primarias.....	11
3.8 Inmunodeficiencia de anticuerpos específicos antipolisacáridos (SAD).....	13
3.8.1 Manifestaciones clínicas.....	13
3.8.2 Diagnóstico.....	14
3.8.3 Tratamiento.....	16
3.9 Infección por <i>Streptococcus pneumoniae</i> (neumococo).....	16
3.9.1 Características generales de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	17
3.9.2 Importancia clínica .....	17
3.9.3 Esquema de vacunación en México .....	19
3.10 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).....	20
3.10.1 Técnica de ELISA para la cuantificación de anticuerpos dirigidos contra polisacáridos neumocócicos.....	21
4. OBJETIVOS .....	23
4.1 Objetivo General .....	23
4.2 Objetivos particulares .....	23
5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	24
5.1 Cuantificación de anticuerpos dirigidos contra antígenos neumocócicos en muestras séricas de pacientes.....	24
5.1.1 Toma de muestras.....	24
5.1.2 Reconstitución de polisacáridos.....	24
5.1.3 Sensibilización de las placas para ELISA .....	24
5.1.4 Bloqueo de las placas para ELISA .....	25

5.1.5 Preparación del suero estándar para las curvas de calibración.....	26
5.1.6 Preparación de las muestras .....	26
5.1.7 Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) .....	26
5.2 Estandarización del método de ELISA .....	28
5.2.1 Determinación de la concentración óptima de recubrimiento de PSC.....	28
5.2.2 Efecto de la adición de azida de sodio (NaN <sub>3</sub> ) en las soluciones utilizadas para la ELISA .....	30
6. RESULTADOS .....	31
6.1 Estandarización del método de ELISA .....	31
6.1.1 Condiciones iniciales .....	31
6.1.2. Determinación de la concentración óptima de recubrimiento de PSC.....	32
6.1.3 Efecto de la adición de azida de sodio (NaN <sub>3</sub> ) en las soluciones utilizadas para la ELISA .....	39
6.2 Cuantificación de anticuerpos dirigidos contra antígenos neumocócicos en muestras séricas de pacientes. ....	40
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	46
7.1. Determinación de la concentración óptima de recubrimiento de PSC.....	46
7.2 Efecto de la adición de azida de sodio (NaN <sub>3</sub> ) en las soluciones utilizadas para la ELISA	49
7.3 Cuantificación de anticuerpos dirigidos contra antígenos neumocócicos en muestras séricas de pacientes. ....	49
8. CONCLUSIONES .....	54
9. BIBLIOGRAFÍA .....	55

## 1. RESUMEN

La deficiencia de anticuerpos específicos o SAD es una inmunodeficiencia primaria en la cual los pacientes presentan niveles normales de inmunoglobulinas pero no pueden producir anticuerpos IgG contra polisacáridos bacterianos, lo cual los hace susceptibles de padecer infecciones respiratorias por microorganismos encapsulados. Estas infecciones pueden ocasionar complicaciones que afecten gravemente al paciente, por lo que el diagnóstico oportuno es esencial para mejorar su calidad de vida. En este trabajo se determinaron los niveles séricos de anticuerpos dirigidos contra polisacáridos de 14 serotipos de *Streptococcus pneumoniae* con un ensayo ELISA en pacientes del Instituto Nacional de Pediatría, también se estandarizó la técnica con el fin de optimizar los resultados obtenidos de las muestras, esto mediante la selección de la concentración óptima de la solución de recubrimiento y la adición de azida de sodio (0.1% y 0.2%) para prolongar la vida útil de las placas de ELISA. Se encontró que el 20.8% de los pacientes evaluados antes y después de la inmunización con la vacuna polisacárida resultaron ser casos de probable SAD. Durante la estandarización se determinó que la concentración óptima de recubrimiento para los PSC 1, 3, 4, 19A y 23F fue de 6 µg/ml, para los PSC 5, 6B, 8, 9V, 19F de 8 µg/ml, para el PSC 18C de 4 µg/ml y 8 µg/ml y para los PSC 6A, 11A y 14 de 10 µg/ml. La adición de azida de sodio disminuyó el desempeño de la prueba. Este ensayo apoya al diagnóstico oportuno de SAD, con lo cual se mejorará la calidad de vida del paciente y la optimización del mismo permitirá obtener mejores resultados.

## 2. INTRODUCCIÓN

El sistema inmunitario es fundamental para la supervivencia humana, sin embargo como cualquier sistema puede fallar. En ausencia de un sistema inmune activo, hasta las infecciones menores podrían prosperar y resultar mortales; este estado de vulnerabilidad causado por la ausencia, pérdida de la función y cantidades reducidas de algún elemento del sistema inmunológico se denomina inmunodeficiencia.

Las inmunodeficiencias primarias son una serie de defectos genéticos que provocan una alteración en la maduración y/o función del sistema inmune y dependiendo del componente afectado (segundo mensajero, molécula efectora o población celular) puede causar una amplia gama de enfermedades por lo que las manifestaciones clínicas pueden ser diversas.

De acuerdo con la Sociedad Europea para las Inmunodeficiencias, por sus siglas en inglés ESID, el componente del sistema inmune que se ve afectado con mayor frecuencia es el humoral. La mayoría de los pacientes con inmunodeficiencias humorales son susceptibles a padecer infecciones por microorganismos extracelulares, particularmente bacterias encapsuladas como estafilococos, estreptococos y neumococos, ya que los anticuerpos son esenciales para que se lleve a cabo la opsonización y eliminación de estos organismos.

La deficiencia de anticuerpos específicos (SAD) es una inmunodeficiencia primaria en la cual los pacientes presentan niveles normales de inmunoglobulinas y respuestas normales contra antígenos proteicos, pero no pueden producir anticuerpos IgG contra polisacáridos bacterianos. Así, los individuos con esta inmunodeficiencia son propensos a las infecciones por bacterias encapsuladas; entre las que destaca *Streptococcus pneumoniae*.

Las infecciones por *S. pneumoniae* constituyen un problema importante de salud pública en todo el mundo, entre las cuales se encuentran la neumonía, la meningitis y la bacteremia febril; la otitis media, la sinusitis y la bronquitis son

complicaciones más frecuentes, pero menos graves. En 2005, la OMS estimó que cada año morían por enfermedades neumocócicas 1,6 millones de personas, de las cuales entre 0,7 y un millón son niños menores de 5 años, la mayoría de países en desarrollo<sup>1</sup>.

La prueba de ELISA para la cuantificación de anticuerpos dirigidos contra polisacáridos neumocócicos no se practica comúnmente en los centros de salud en México. No obstante, es necesaria primero, para determinar la efectividad de los esquemas de vacunación y segundo, para el diagnóstico de la inmunodeficiencia de anticuerpos específicos y de algunas otras inmunodeficiencias primarias relacionadas con defectos en la producción de anticuerpos contra antígenos T independientes.

El diagnóstico confiable y oportuno de la inmunodeficiencia específica de anticuerpos es vital para brindar mejor atención médica al paciente y mejorar su calidad de vida.

En este trabajo se desarrolló un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA indirecto, adoptado como método de referencia por la OMS, para la cuantificación de los niveles séricos de inmunoglobulinas IgG contra polisacáridos de 14 serotipos de neumococo en pacientes del Instituto Nacional de Pediatría. Estos serotipos son de importancia clínica para la población mexicana y también están presentes en las vacunas que se usan en México (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 8, 9V, 11A, 14, 18C, 19A, 19F y 23F). Con estos resultados se determinó si el sistema inmunológico de los pacientes es capaz de montar una respuesta humoral adecuada después de la inmunización con la vacuna neumocócica 23-valente no conjugada o presenta la deficiencia específica de anticuerpos contra polisacáridos.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Sistema inmunitario

El ser humano vive en contacto constante con una infinidad de microorganismos; sin embargo, muchas veces este contacto con el mundo microscópico pasa inadvertido gracias a que el organismo cuenta con una serie de mecanismos físicos y químicos que lo defienden y que además controlan a los microorganismos: el sistema inmunitario incluye todas las estructuras y procesos que proporcionan esta defensa<sup>2</sup>.

El sistema inmune es capaz de montar una respuesta específica y protectora contra estructuras reconocidas como ajenas y a las que llamamos antígenos. Este sistema consiste en un conjunto de células y moléculas que reaccionan de manera conjunta y coordinada frente a la entrada de los antígenos, a esto se le conoce como respuesta inmunitaria.

Para su estudio, la respuesta inmunitaria se ha dividido en: respuesta inmunitaria innata y respuesta inmunitaria adaptativa. A continuación se muestra la tabla 1 en dónde se observan las características de la respuesta inmune innata y adaptativa.

**TABLA 1.** Características de la respuesta innata y adaptativa.

Característica	Inmunidad innata	Inmunidad adaptativa
<b>Tiempo de activación</b>	Inmediato de minutos a horas	5-6 días.
<b>Actividad</b>	Siempre activa.	Activa solo después del encuentro antigénico.
<b>Especificidad</b>	Limitada y previamente definida	Sumamente diverso y mejora conforme se desarrolla la respuesta inmune
<b>Presente en:</b>	Todos los individuos de la misma especie.	Solo en individuos que han entrado en contacto con el antígeno.
<b>Respuesta a infecciones subsecuentes</b>	Misma cada vez	Más rápida y efectiva con una infección subsecuente

<b>Mediada por:</b>	Células fagocíticas, barreras anatómicas, moléculas antimicrobianas y procesos inflamatorios.	Linfocitos T y linfocitos B y sus productos como anticuerpos y citocinas.
<b>Papel en la eliminación de patógenos</b>	Contiene a los patógenos y da pie al inicio de la respuesta adaptativa	Usualmente es necesaria para la eliminación completa de patógenos y provee protección a largo plazo

Tabla adaptada de *Kuby Immunology* 2013 <sup>3</sup>

### 3.2 Sistema inmunitario innato

La respuesta inmunitaria innata (también llamada inmunidad natural o espontánea) aporta la primera línea de defensa frente a los microorganismos y está constituida por mecanismos pre-existentes de defensa, celulares y bioquímicos, preparados para responder con rapidez ante una infección.

Este sistema es capaz de reconocer estructuras moleculares altamente conservadas dentro de las especies microbianas que están ausentes en las células de los mamíferos. Estas estructuras reciben el nombre de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y son reconocidas por receptores para el reconocimiento de patrones (PRRs) presentes en varios tipos celulares, entre los que se incluyen: macrófagos, neutrófilos y células dendríticas<sup>3</sup>.

### 3.3 Sistema inmunitario adaptativo

La respuesta inmunitaria adaptativa (también llamada específica o adquirida) es altamente específica, es decir que puede distinguir entre distintos microorganismos y moléculas, incluso los que son muy parecidos estructuralmente. Además, esta respuesta genera memoria inmunitaria, la cual consiste en la capacidad de responder de una manera más eficiente a antígenos con los que ya se había estado en contacto previamente. Esta memoria inmunitaria se da debido a que cuando el organismo responde a un antígeno se generan células efectoras y células de memoria, las cuales permanecen en el organismo.

También, el sistema inmunitario adaptativo es capaz de reconocer una amplia gama de sustancias extrañas relacionadas o no con agentes microbianos. Este reconocimiento se da a través de los receptores de los linfocitos T y las inmunoglobulinas ( $10^{11}$  anticuerpos diferentes), los cuales son muy diversos, ya que surgen como consecuencia de las recombinaciones entre distintos segmentos de los genes que los codifican<sup>4</sup>.

Los principales componentes del sistema inmune adaptativo son los linfocitos T, los linfocitos B y los anticuerpos, y posee dos tipos de respuestas inmunes: la inmunidad humoral y la inmunidad celular.

### **3.4 Respuesta inmunitaria humoral**

Los principales componentes de la respuesta inmunitaria humoral son los linfocitos B y sus productos, los anticuerpos, que son responsables de la destrucción de microorganismos extracelulares y evitan la diseminación de infecciones intracelulares.

Las respuestas inmunitarias humorales inician cuando los linfocitos B reconocen antígenos específicos a través de su receptor (BCR) y se activan. Una vez activados, los linfocitos B proliferan y posteriormente se diferencian, dando lugar a las células plasmáticas productoras de anticuerpos y a las células B de memoria<sup>5</sup>.

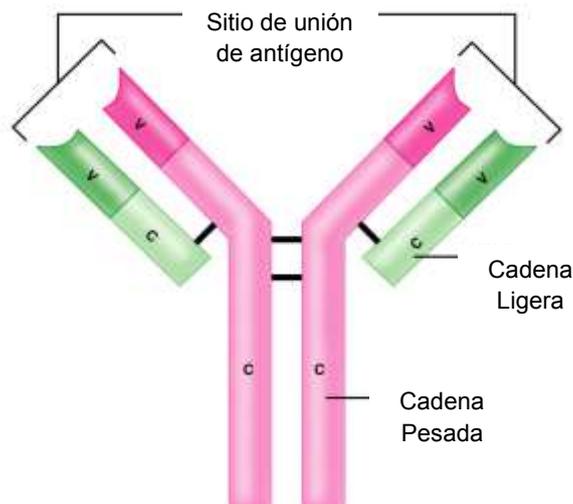
Existen distintas subpoblaciones de linfocitos B que responden preferentemente a diferentes tipos de antígenos, como se observa en la tabla 2. Esta activación se puede producir de forma dependiente de los linfocitos T o independiente de los linfocitos T como se explica más adelante.

**TABLA 2.** Características de las distintas subpoblaciones de células B.

Denominación	Células B2		Células B1	
	Células B foliculares	Células B de zona marginal	Células B-1a	Células B-1b
Función	Respuesta a antígenos TD	Respuesta a antígenos TI	Productoras de anticuerpos "naturales"	Respuesta a antígenos TI
Localización	Folículos de órganos linfoides secundarios	Zona marginal del bazo	Cavidades corporales como la cavidad pleural y cavidad peritoneal	

Información obtenida de (Defrance, Taillardet, & Genestier, 2011).<sup>6</sup> TD: timo dependientes. TI: timo independientes.

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son glicoproteínas solubles compuestas por dos cadenas polipeptídicas ligeras idénticas (aproximadamente 23 kDa) y dos cadenas polipeptídicas pesadas (50-80 kDa) también idénticas. Tanto las cadenas pesadas como las ligeras constan de una región variable que determina la especificidad de unión a antígeno y una región constante que determina la función efectora del anticuerpo: es decir, define el modo en que el anticuerpo elimina al antígeno una vez que está unido<sup>7</sup>.



**FIGURA 1.** Estructura de los anticuerpos. V = región variable. C = región constante.

Según la región constante de la cadena pesada, las moléculas de anticuerpos o inmunoglobulinas se pueden dividir en diferentes clases: IgM, IgD, IgG, IgE e IgA.

Las funciones de los anticuerpos son: el reconocimiento de los antígenos microbianos, neutralización de la infectividad de los microorganismos, con lo cual se evita que los microorganismos y/o toxinas microbianas entren a las células, y protección contra microorganismos extracelulares, los cuales son marcados por los anticuerpos como una diana (opsonización) para su eliminación por diversos mecanismos inmunes efectores (complemento, mastocitos, células NK y fagocitos)<sup>8</sup>.

### 3.4.1 Inmunoglobulina G

La inmunoglobulina IgG es la más abundante en suero, teniendo una concentración promedio de 10 g/L en un adulto. Los anticuerpos IgG confieren protección a largo plazo y se consideran como indicativos de inmunidad humoral<sup>9</sup>. En la tabla 3 se observan las funciones de esta inmunoglobulina.

**TABLA 3.** Funciones del isotipo IgG.

- |   |
|---|
| • Opsonización de antígenos para su fagocitosis por macrófagos y neutrófilos.(IgG3 e IgG4)        |
| • Activación de la vía clásica del complemento (IgG3 preferentemente)                             |
| • Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por los linfocitos NK y macrófagos.    |
| • Inmunidad neonatal: paso de los anticuerpos de la madre a través de la placenta y el intestino. |
| • Inhibición por retroalimentación de la activación de los linfocitos B.                          |

Tabla adaptada de Kuby Immunology (2013).<sup>5</sup>

Existen 4 subclases de IgG que difieren en su capacidad para llevar a cabo algunas funciones efectoras y también en su concentración sérica, <sup>8</sup> estas subclases son: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

La agrupación de moléculas de IgG, característicamente sobre la superficie de un patógeno como una bacteria, conduce a la activación del complemento. Las subclases de IgG lo activan con eficacias diferentes; la IgG1 y la IgG3 lo

activan mejor; la IgG2 sólo lo activa por antígenos con concentraciones elevadas como los hidratos de carbono de una bacteria, y la IgG4 no lo activa.<sup>10</sup>

### 3.5 Respuesta humoral frente a antígenos independientes de los linfocitos T

La naturaleza del antígeno define la vía de activación del linfocito B, así cuando los linfocitos B reconocen antígenos de naturaleza proteica, se activan con ayuda de los linfocitos T, por ello a estos antígenos se les conoce como timo-dependientes (TD). Por el contrario, cuando se reconocen antígenos con determinantes repetidos, como los polisacáridos y lípidos, la activación de los linfocitos B es independiente de los linfocitos T y por lo tanto a estos antígenos se les conoce como timo-independientes (TI).

En la tabla 4 se presenta un resumen de las principales características de los antígenos TD y TI.

**TABLA 4.** Características de los antígenos timo-dependientes y timo-independientes.

Propiedad	Antígeno TD	Antígeno TI	
		Tipo 1	Tipo 2
Naturaleza química	Proteína soluble	Componentes de la pared celular bacteriana (LPS)	Proteínas poliméricas y polisacáridos capsulares
Respuesta humoral			
• Cambio de isotipo	Si	No	Limitada
• Maduración de la afinidad	Si	No	No
• Memoria inmunológica	Si	No	No
• Activación policlonal	No	Si	No

Tabla tomada de Kuby Immunology<sup>3</sup>

La respuesta a los antígenos TI se caracteriza por ser débil (baja afinidad), sin la formación de células de memoria y con producción casi exclusiva de IgM, ya que el cambio de la globulina de superficie requiere de la participación de

células T, que son esenciales en procesos tales como la maduración de la afinidad de los anticuerpos y el cambio de isotipo.

Los antígenos timo-independientes pueden activar a los linfocitos B de dos formas: Los llamados de tipo 1 (TI-1) son activadores policlonales de los linfocitos B, como los mitógenos, donde no intervienen la especificidad antigénica (activan a la célula B por medio de receptores de inmunidad innata), y los de tipo 2 (TI-2) contienen unidades repetidas de polisacáridos o proteínas poliméricas que activan a los linfocitos B debido a que promueven un alto grado de entrecruzamiento del BCR<sup>6</sup>.

En este trabajo nos enfocaremos en los TI-2 ya que entre ellos se encuentran las cápsulas de polisacáridos del neumococo.

Los antígenos TI-2 son de alto peso molecular, poliméricos y presentan múltiples epítomos antigénicos idénticos. También son antígenos de bajo metabolismo *in vivo*, retenidos en órganos linfoides por mucho tiempo y tienen la capacidad de fijar complemento por vía alterna<sup>3</sup>.

La activación de la célula B por este tipo de antígenos se debe a que las moléculas, por su gran tamaño y alto número de epítomos, provocan un alto grado de entrecruzamiento del BCR, lo cual activa la proliferación y diferenciación de los linfocitos B sin la necesidad de la señal coestimuladora de CD40, aunque para una respuesta máxima se requiere la participación de otras moléculas de superficie del linfocito B como los receptores de complemento<sup>11</sup>.

Las células B estimuladas por antígenos TI-2 también requieren la interacción con macrófagos y células dendríticas, para recibir las señales de supervivencia y diferenciación<sup>3</sup>, y la interacción con citocinas producidas por células T que permiten el cambio de IgM a otras clases de anticuerpos (cambio de isotipo)<sup>11</sup>.

### **3.6 Inmunodeficiencias**

El funcionamiento regulado y la efectividad biológica de cada uno de los elementos que participan en la respuesta inmunológica es un requisito indispensable para que se mantenga la homeostasis del organismo, es por ello que las alteraciones en cualquiera de estos aspectos conducen a fenómenos que ponen en riesgo la integridad de los individuos.

Los defectos en uno o más componentes del sistema inmunitario producen patologías que se conocen como inmunodeficiencias. Estas patologías tienen un espectro de manifestaciones clínicas muy amplio, el cual está condicionado al tipo de defecto que se presente en el organismo afectado<sup>10</sup>.

Según su origen, las inmunodeficiencias pueden clasificarse en primarias o congénitas y secundarias o adquiridas; las primarias se producen por mutaciones en genes que participan o controlan las respuestas inmunitarias, en cambio, las inmunodeficiencias secundarias se desarrollan como consecuencia de otras enfermedades, de inanición, exposición a radiación o uso de medicamentos.

### **3.7 Inmunodeficiencias primarias.**

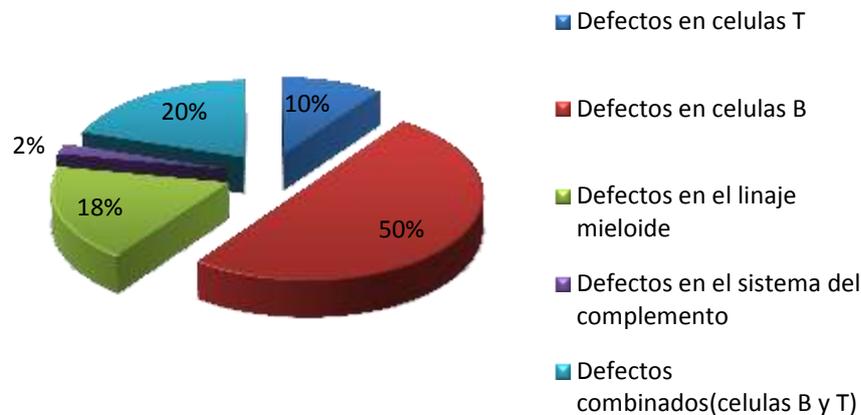
Las inmunodeficiencias primarias son un grupo heterogéneo de enfermedades hereditarias que comprenden alteraciones en el desarrollo, función o ambos, del sistema inmunitario.<sup>12</sup> Hasta la fecha se han identificado más de 130 trastornos diferentes con una prevalencia global de aproximadamente 1:10 000 habitantes (con excepción de la deficiencia de IgA)<sup>13, 14</sup>.

La prevalencia reportada varía entre países y sus regiones debido al escaso conocimiento de estas enfermedades y la falta de diagnóstico y registro epidemiológico. En México los primeros registros de inmunodeficiencias primarias corresponden a los datos publicados en el primer (1988) y segundo (2007) reportes del Registro del Grupo Latinoamericano de Inmunodeficiencias

Primarias (LAGID), en el que participaron 8 y 12 países respectivamente. En el 2007 las inmunodeficiencias más reportadas fueron las deficiencias de anticuerpos con 53.2%, los síndromes bien definidos correspondieron a 22.6%, la inmunodeficiencia combinada de células T y B a 9.5% y los trastornos de la fagocitosis a 8.6 por ciento<sup>12</sup>.

Las manifestaciones clínicas de las inmunodeficiencias primarias son muy variables, por lo general incluyen infecciones recurrentes por el mismo patógeno o patógenos similares e incluso por microorganismos de baja virulencia, y con frecuencia se manifiestan durante la lactancia o la infancia, aunque a veces se detectan clínicamente en fases posteriores de la vida.

La naturaleza de las inmunodeficiencias primarias depende del componente del sistema inmune afectado, ya sean componentes del sistema inmune innato (células fagocíticas o proteínas del complemento) o componentes del sistema inmune adaptativo (linfocitos T y B).



**FIGURA 2.** Porcentaje de incidencia de las inmunodeficiencias primarias. Véase la abundancia de defectos en la inmunidad humoral. Información recopilada de Kuby Immunology,<sup>3</sup>

Como se observa en la figura 2, los defectos en los linfocitos B representan el 50% de las inmunodeficiencias que se reportan a nivel mundial.<sup>15</sup> Estas alteraciones tienen un amplio espectro de enfermedades que van desde una reducción del número de linfocitos B en circulación y en tejidos linfáticos y la ausencia de células plasmáticas e inmunoglobulinas, hasta la ausencia

selectiva de ciertas clases de inmunoglobulinas<sup>3</sup>, las cuales pueden cursar sin ninguna manifestación clínica debido a que muchos componentes en el sistema inmune se sobreponen en su función protectora y el fallo de un componente puede ser compensado por los demás<sup>16</sup>.

### **3.8 Inmunodeficiencia de anticuerpos específicos antipolisacáridos (SAD).**

La deficiencia de anticuerpos específicos o SAD (acrónimo del inglés Specific Antibody Deficiency) es una inmunodeficiencia primaria en la cual, los pacientes presentan niveles normales de inmunoglobulinas y respuestas normales contra antígenos proteicos, pero no pueden producir anticuerpos IgG contra polisacáridos bacterianos.

La prevalencia de SAD sólo se ha reportado en pacientes con infecciones respiratorias recurrentes, la cual es de 5-10%<sup>17</sup>. Su prevalencia en otros pacientes no es conocida.

#### **3.8.1 Manifestaciones clínicas.**

Las bacterias piógenas tienen una cápsula de polisacáridos que no es reconocida de manera directa por los receptores sobre macrófagos y neutrófilos que estimulan la fagocitosis. Las bacterias escapan a la eliminación inmediata por la respuesta inmunitaria innata y son patógenos exógenos exitosos.

Los individuos sanos pueden eliminar infecciones por bacterias piógenas porque los anticuerpos y el complemento opsonizan a las bacterias, lo que permite que los fagocitos las ingieran y las destruyan. Así, los individuos con deficiencia de anticuerpos específicos contra antígenos polisacáridos son propensos a las infecciones por bacterias encapsuladas.

Los pacientes con SAD generalmente presentan un historial de sinusitis, otitis media, bronquitis, neumonía recurrente<sup>18</sup> e incluso dermatitis y asma,<sup>19</sup> además se ha sugerido que esta inmunodeficiencia está relacionada con rinitis alérgica y con historial de otitis media en asociación con otorrea crónica. Estas infecciones son ocasionadas principalmente por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis* o *Staphylococcus aureus*.

Pacientes con otras inmunodeficiencias primarias, como por ejemplo inmunodeficiencias combinadas no severas, deficiencia de IgG2, síndrome de Wiskott-Aldrich, síndrome hiper-IgE, asplenia congénita y otros, frecuentemente presentan deficiencia de anticuerpos específicos<sup>9, 11, 17</sup>. Para fines del Registro, todos estos pacientes deben clasificarse de acuerdo al síndrome primario, del cual una deficiencia de anticuerpos específicos es sólo un componente<sup>17</sup>.

### **3.8.2 Diagnóstico**

En los recién nacidos, la actividad antibacteriana mengua conforme los niveles de anticuerpos maternos transferidos pasivamente disminuyen. Esta disminución de anticuerpos está correlacionada con la alta incidencia de varias enfermedades ocasionadas por microorganismos piógenos extracelulares (*S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae* tipo b) en niños pequeños; además durante la infancia, la capacidad de generar anticuerpos que reconozcan a los polisacáridos de estos microorganismos es más tardía que la que se observa para antígenos proteicos y aunque la respuesta a algunos antígenos neumocócicos polisacáridos puede ser demostrada a los 6 meses de edad, en general es pobre hasta los 18-24 meses de edad<sup>18</sup>, por lo que la deficiencia selectiva de anticuerpos antipolisacáridos es buscada generalmente en niños mayores de dos años con infecciones bacterianas recurrentes.

Para evaluar a un paciente sospechoso de tener la inmunodeficiencia SAD se deben tomar en cuenta tres aspectos:

- Niveles séricos de inmunoglobulinas.

- Niveles séricos de subclases de IgG.
- Niveles séricos de anticuerpos específicos contra antígenos polisacáridos.

Para este último punto se realiza una cuantificación en suero de anticuerpos contra polisacáridos, para ello se toman dos muestras de sangre, la primera antes de recibir una dosis de la vacuna neumocócica no conjugada de 23 serotipos y la segunda 4 semanas después de la inmunización para poder evaluar la respuesta de anticuerpos IgG contra cada serotipo; la respuesta a los distintos serotipos puede ser:<sup>11</sup>

- Ninguna respuesta a algún serotipo.
- Respuesta a algunos serotipos.
- Caída de los títulos después de inmunización (memoria defectuosa).
- Ausencia de anticuerpos de la clase IgG2

Se considera que se tiene una respuesta adecuada cuando se detecta una concentración de anticuerpos  $\geq 1.3\mu\text{g/mL}$  contra un serotipo particular después de la inmunización o un título 4 veces mayor respecto al valor basal, sin embargo se ha observado que la probabilidad de tener una respuesta 4 veces mayor disminuye cuando el título de anticuerpos antes de la inmunización es mayor a  $1.3\mu\text{g/mL}$  y que sólo se obtiene una respuesta 2 veces mayor respecto al nivel basal<sup>20</sup>.

Para interpretar el resultado debe considerarse la edad, estado de inmunización y las concentraciones de anticuerpo en cada estudio. Por lo anteriormente dicho un niño menor de 5 años debe responder al 50% de los serotipos en evaluación, mientras que los pacientes mayores de 5 años deben responder a no menos del 70% de los serotipos en evaluación<sup>20</sup>.

Los serotipos 6A, 14, 6B, 19F y 23F son pobres inmunógenos, mientras que los serotipos 2, 3, 4, 7F, 8, 9N, 9V y 18C son altamente inmunógenicos, esto puede atribuirse a sus características químicas intrínsecas como son: tamaño molecular y número de epítomos. La baja inmunogenicidad de los serotipos 6B

y 23F se puede deber a que su estructura es similar a la del DNA, por lo que hay una mayor regulación de la respuesta inmune hacia dichos antígenos<sup>21</sup>.

### **3.8.3 Tratamiento**

El objetivo del tratamiento es prevenir complicaciones o retrasarlas, mejorando así la calidad de vida del paciente, aumentando la expectativa de vida y en niños, asegurando el correcto desarrollo<sup>15</sup>.

Las bases generales del tratamiento son:

- Terapia antimicrobiana
- Inmunización adicional
- Administración de inmunoglobulinas

Siendo el tratamiento más efectivo la administración de inmunoglobulinas, misma que puede ser intravenosa o subcutánea, sin embargo este tratamiento es costoso y en nuestro país se requiere que el caso de cada paciente sea documentado con evidencia sólida que justifique su uso.

### **3.9 Infección por *Streptococcus pneumoniae* (neumococo).**

Las infecciones producidas por neumococos son una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. En 2005, la OMS estimó que cada año morían por enfermedades neumocócicas 1.6 millones de personas, de las cuales entre 0.7 y un millón son niños menores de 5 años, la mayoría de países en desarrollo.

Dentro de las patologías más frecuentemente asociadas al neumococo están la otitis media y enfermedades invasoras como bacteriemia/septicemia, neumonía y meningitis.

### **3.9.1 Características generales de *Streptococcus pneumoniae***

*Streptococcus pneumoniae* es una bacteria Gram positiva con forma de bala, de un diámetro de 0.5-12  $\mu\text{m}$  e inmóvil, que produce una toxina llamada neumolisina y a diferencia de los demás miembros del género *Streptococcus*, se agrupa en pares (diplococos) <sup>22</sup>.

La pared celular del neumococo está compuesta de peptidoglucano, ácido teicoico y ácido lipoteicoico.<sup>23</sup> El ácido teicoico está expuesto en la superficie celular y se une covalentemente al peptidoglucano, esta estructura se denomina polisacárido C (PSC C) que es específica de especie, por lo que todos los serotipos neumocócicos lo presentan<sup>24</sup>.

El principal factor de virulencia de *Streptococcus pneumoniae* es la cápsula de polisacáridos que reduce la fagocitosis. Químicamente, la cápsula es un polímero largo, soluble y organizado, formado por unidades repetidas de 2 a 7 monosacáridos que pueden ser lineales o ramificados.<sup>23</sup> Las combinaciones de polisacáridos y las ramificaciones de estos en la cápsula son los que determinan los serotipos.

### **3.9.2 Importancia clínica**

La infección neumocócica es un problema de salud pública cuya importancia es subestimada por la dificultad de identificación bacteriológica de los neumococos en la práctica corriente<sup>25</sup>.

Se ha reportado que el neumococo es flora normal de vías respiratorias superiores en 5-40% de adultos<sup>22</sup> y hasta 70-80% en infantes,<sup>26</sup> sin embargo es la causa de muchas infecciones en el ser humano que se pueden clasificar según su gravedad, como se observa en la tabla 5.

**TABLA 5.** Clasificación y manifestaciones de la infección por neumococo.<sup>27</sup>

Clasificación	Intensidad de los síntomas	Frecuencia	Manifestaciones
Enfermedad neumocócica invasiva	Severos	Poco común	Otitis media Sinusitis Bronquitis
Enfermedad neumocócica no invasiva	Moderados	Común	Neumonía Bacteriemia febril Meningitis

Los grupos más afectados por este patógeno son los niños pequeños y los adultos mayores. En los niños, el sistema inmune no está preparado para el reto antigénico, mientras que en los adultos mayores el sistema inmune ya no es tan eficaz<sup>28</sup>.

*Streptococcus pneumoniae* es el microorganismo más frecuentemente aislado en casos de meningitis infantil<sup>29</sup> y se estima que la neumonía infantil neumocócica será responsable de 27 millones de muertes en naciones en desarrollo durante la siguiente década, si no se implementa una estrategia de vacunación<sup>3</sup>.

En adultos mayores de 65 años se estima que la infección neumocócica tiene una tasa de mortalidad del 20% y esta se duplica en adultos mayores de 85 años<sup>30</sup>, convirtiéndose en la quinta causa de muerte en adultos mayores.

Actualmente se han identificado alrededor de 90 serotipos de neumococos, los cuales se diferencian en su patogenicidad y poder invasivo. Entre los niños, las infecciones suelen asociarse con los serotipos 6, 14, 18, 19 y 23 y en los adultos con los serotipos 1, 3, 4, 7, 8 y 12<sup>23</sup>.

En el 2007 en México, la incidencia de neumonía y bronconeumonía en población de 60 a 64 fue de 206.73 y en personas de 65 y más años de 469.61 por 100 000 habitantes, y es más frecuente en hombres que en mujeres<sup>13</sup>.

Otros factores de riesgo descritos para adquirir una infección invasora por neumococo son: antecedente de prematuridad, asplenias anatómicas o funcionales, inmunodeficiencias primarias y secundarias y ciertas enfermedades crónicas (cardíacas, pulmonares, hepáticas, diabetes mellitus)<sup>31</sup>.

### 3.9.3 Esquema de vacunación en México

Actualmente, en el esquema de vacunación en México se incluyen dos vacunas contra *S. pneumoniae*: la vacuna antineumocócica polivalente indicada para adultos mayores de 65 años y la vacuna neumocócica conjugada indicada para niños menores de 2 años.

La vacuna antineumocócica polivalente está compuesta por una mezcla purificada de 23 polisacáridos capsulares neumocócicos: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F. Estos tipos capsulares representan del 85 al 90% de los serotipos que causan infecciones neumocócicas invasivas en adultos y niños.<sup>23</sup> Debido a la naturaleza timo independiente de las respuestas humorales a estos antígenos su uso es limitado, ya que estas vacunas no ofrecen protección a largo plazo y no estimulan la respuesta inmune en niños menores de 2 años<sup>27</sup>, por lo que en México se encuentra en el esquema de vacunación para población de 60-64 años con factores de riesgo y para toda la población de 65 años de edad.

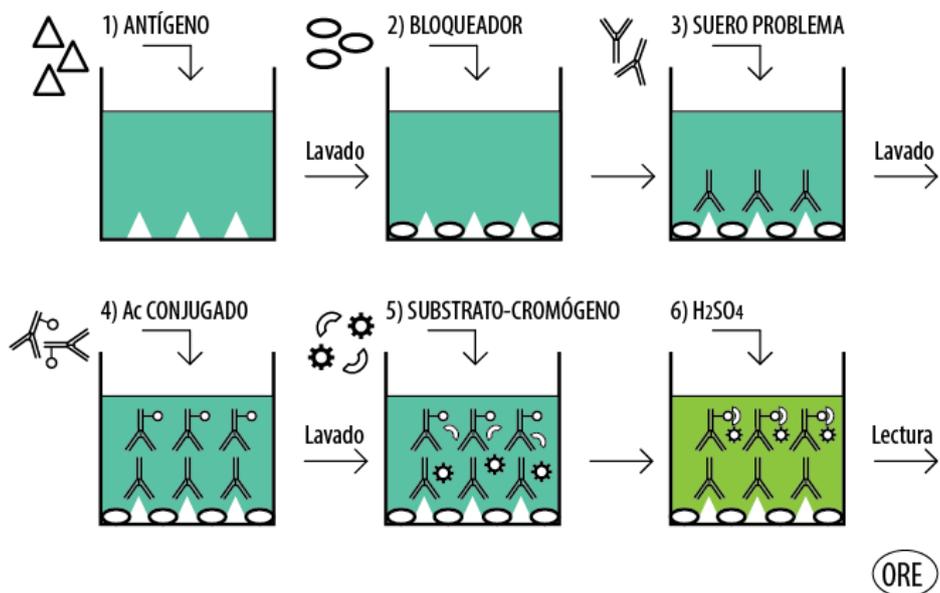
La vacuna de polisacáridos contra el neumococo se introdujo en México en 1993, sin embargo fue en 2006 cuando la Secretaría de Salud (SSA) la introdujo de manera universal para las personas de 65 años de edad en adelante<sup>25</sup>. Las vacunas actualmente disponibles en México son la Pneumovax® 23 (Merck, EU) y Pneumo 23 (Sanofi Pasteur, Francia).

Otra vacuna neumocócica disponible es la vacuna conjugada trece valente, compuesta por trece serotipos ligados de manera covalente a una proteína inerte (proteína transportadora de toxina diftérica CRM197). Los trece serotipos incluidos en esta vacuna son: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 9A, 19F y 23F y está incluida en el esquema de vacunación para niños menores de 8 años (3 inmunizaciones)<sup>32</sup>.

### 3.10 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

La técnica ELISA (acrónimo del inglés “Enzyme linked Immuno-Sorbent Assay”) es uno de los métodos inmunoenzimáticos empleados para la detección de antígenos o anticuerpos; tiene su origen en el radioinmunoanálisis (RIA), desarrollado por S. A. Berson and Rosalyn Yalow. La diferencia principal es la forma en que se pone en evidencia la interacción antígeno-anticuerpo. En el RIA se usan antígenos marcados con isótopos radioactivos y en la ELISA se usan anticuerpos ligados a enzimas.

Existen dos métodos básicos, el ELISA directo que detecta antígenos y el ELISA indirecto que detecta anticuerpos. El principio básico de la técnica de ELISA indirecto se muestra en la ilustración 3.



**FIGURA 3.** Principio básico de la técnica ELISA indirecta. Primero los pozos se recubren con el antígeno conocido (1), después se lavan y los espacios no recubiertos con antígeno, se bloquean con una proteína (2), posteriormente se incuban con el suero problema (3). Para detectar los anticuerpos unidos al antígeno, se utiliza un segundo anticuerpo conjugado a una enzima (4) que se revela al adicionar el sustrato de la enzima y un cromógeno (5) para obtener como resultado un producto colorido. La reacción se detiene con ácido sulfúrico (6) y se lee la absorbancia del producto colorido.

### **3.10.1 Técnica de ELISA para la cuantificación de anticuerpos dirigidos contra polisacáridos neumocócicos.**

Los primeros ensayos utilizados para cuantificar el nivel de anticuerpos contra polisacáridos neumocócicos se basaron en el ensayo de Farr, un radioinmunoensayo que mide la unión del anticuerpo con el polisacárido capsular, marcado con un isótopo radioactivo. Sin embargo este ensayo es poco práctico ya que requiere de grandes volúmenes de suero para cada serotipo, isótopos radioactivos y no estaba claro si proporcionaba la especificidad de serotipo necesaria. Así, a principios de la década de los 80s, la técnica de ELISA se convirtió en el método preferido para la estimación de las concentraciones de anticuerpos dirigidos contra polisacáridos de *S. pneumoniae*<sup>28</sup>. Este método ha experimentado varias modificaciones que se conocen como generaciones.

La primera generación de ELISA sobreestimaba la concentración de anticuerpos antipolisacáridos y daba una falsa idea de protección ya que en el ensayo se cuantificaban los anticuerpos dirigidos contra el polisacárido de la pared celular (PSC C) y los anticuerpos dirigidos contra el polisacárido capsular<sup>28</sup>. Muchos individuos tienen anticuerpos contra este polisacárido por infección previa o colonización asintomática, sin embargo los anticuerpos dirigidos contra este PSC C no confieren ninguna protección<sup>27</sup>. Así, se desarrolló una segunda generación de ELISA, donde se neutralizaba el PSC C antes de realizar las cuantificaciones, sin embargo se encontró que los anticuerpos dirigidos contra ciertos polisacáridos significativos como el PSC 4 tenían reactividad cruzada con otros polisacáridos irrelevantes como el PSC 22F, y que una pre-incubación con este último mejoraba considerablemente la correlación concentración-eficacia de inmunización<sup>30</sup>.

Finalmente se desarrolló la ELISA de tercera generación, la cual fue adoptada como método de referencia por un grupo de expertos en una reunión celebrada en 2000 en la sede de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en Ginebra, Suiza. En esta ELISA se realiza la pre adsorción del antisuero con los PSC C y PSC 22F.

Para interpretar las concentraciones de anticuerpos obtenidos por la técnica de ELISA, se necesita conocer los niveles de anticuerpos dirigidos contra polisacáridos neumocócicos suficientes para la protección inmune, para ello debe considerarse lo siguiente:

- El umbral o valor de corte que discrimina entre individuos en riesgo de una infección y los que no depende de muchos factores, desde la exposición a los microorganismos y su virulencia inherente, hasta factores en el huésped como la inmunidad innata, infecciones virales concomitantes, etc<sup>27</sup>.
- Los niveles protectores de anticuerpos también dependen del serotipo neumocócico y del tipo de infección, ya que se requiere una menor cantidad de inmunoglobulinas para defenderse de una bacteriemia diseminada que para evitar una infección de vías respiratorias superiores<sup>28</sup>.
- Aunque la cantidad de anticuerpos es el principal factor de protección, hay que considerar que la afinidad de estos por sus antígenos de origen o su avidéz es un factor crucial para que ejecuten correctamente su función biológica, por lo que también debe tomarse en cuenta<sup>28</sup>.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Estandarizar un ensayo ELISA indirecto para apoyar en el diagnóstico de la deficiencia de anticuerpos específicos y cuantificar anticuerpos de la clase IgG dirigidos contra antígenos polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* en muestras de pacientes que recibe el Instituto Nacional de Pediatría.

### 4.2 Objetivos particulares

- Determinar la concentración óptima de polisacárido en la disolución de recubrimiento para cada uno de los serotipos empleados en el estudio.
- Evaluar el efecto de la azida de sodio como conservador en el desempeño de la cuantificación de anticuerpos por ELISA (determinar si existe una variación en la cuantificación de anticuerpos IgG, en presencia y ausencia de azida de sodio).
- Determinar la concentración de anticuerpos antipolisacáridos, mediante la técnica de ELISA, en muestras de pacientes que recibe la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias Primarias (UIID) del Instituto Nacional de Pediatría.
- Identificar a los pacientes con diagnóstico de inmunodeficiencia de anticuerpos específicos contra polisacáridos (SAD).

## **5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

### **5.1 Cuantificación de anticuerpos dirigidos contra antígenos neumocócicos en muestras séricas de pacientes.**

#### **5.1.1 Toma de muestras**

Se tomaron muestras de sangre (5 mL) de 91 pacientes por punción venosa (sistema Vacutainer®) y se recolectaron en un tubo sin anticoagulante, previamente identificados. Una vez recolectadas, se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 minutos y se tomaron alícuotas de 300 µL de suero hasta obtener un mínimo de 6 viales por paciente. Estos viales fueron identificados con el nombre de cada paciente y congelados a -28°C hasta su análisis.

#### **5.1.2 Reconstitución de polisacáridos.**

Para la reconstitución de los polisacáridos neumocócicos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 8, 9V, 11A, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23 y C (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark), se añadió 1 mL de agua grado biología molecular al vial de cada uno de los PSC con ayuda de una jeringa de insulina, de tal manera que la concentración final fuera de 10mg/mL, posteriormente se agitó el vial manualmente hasta que todo el polvo quedó disuelto y finalmente se hicieron alícuotas de 10 µL.

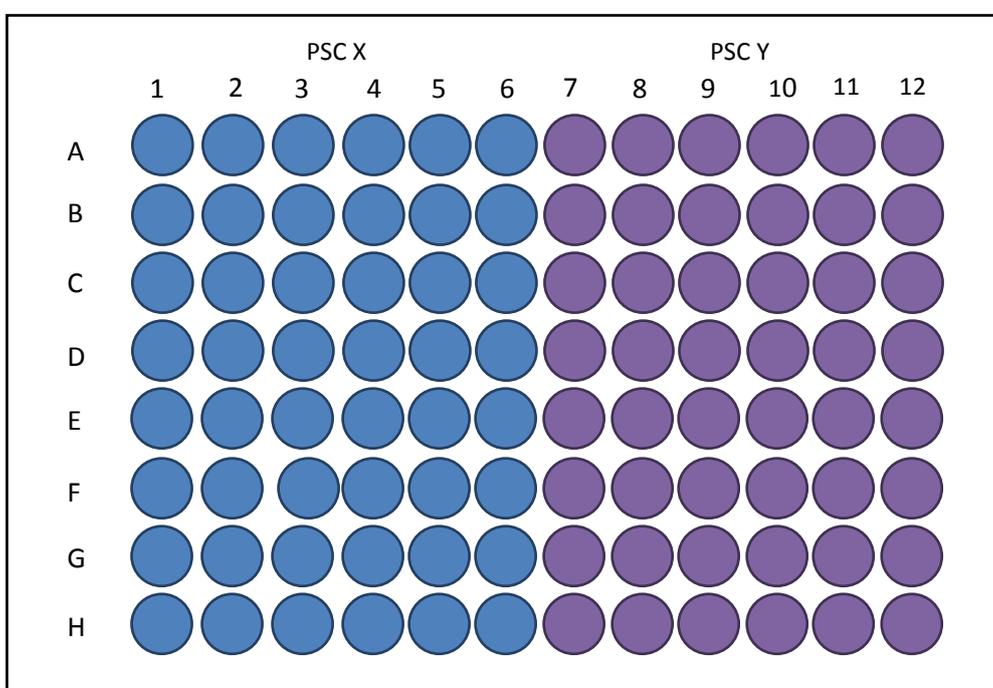
Los PSC se almacenaron a una temperatura de -28°C hasta su uso.

#### **5.1.3 Sensibilización de las placas para ELISA**

Para preparar las soluciones de recubrimiento de los PSC neumocócicos, se descongelaron las alícuotas de PSC a temperatura ambiente y se diluyeron los 10µL del PSC en 10mL de una disolución reguladora de fosfatos (PBS), pH 7.4,

0.01M, 25°C (Sigma Aldrich, USA) para obtener una concentración de 10µg/mL y se agitaron con ayuda de un vortex a una velocidad de 8 durante 30 segundos.

Cada placa para ELISA de 96 pozos (Thermo scientific, USA) se recubrió con dos PSC (7 placas en total): las primeras seis columnas se recubrieron con un PSC y las otras seis con otro PSC como se muestra en la figura 4. Se añadieron 100µL de la solución de recubrimiento a cada uno de los pozos, se cubrieron las placas y después se incubaron por 4 horas a 37°C. Finalmente se almacenaron a 4°C durante toda la noche.



**FIGURA 4.** Recubrimiento de placas para ELISA.

Placa 1: PSC 1 y PSC 3. Placa 2: PSC 4 y PSC 5. Placa 3: PSC 8 y PSC 14. Placa 4: PSC 6B y PSC 11A. Placa 5: PSC 18C y PSC 19A. Placa 6: PSC 23 y PSC 6A. Placa 7: PSC 9V y PSC 19F.

#### 5.1.4 Bloqueo de las placas para ELISA

Después de decantar la solución de recubrimiento de todas las placas, se agregaron 100 µl de solución PBS (pH 7.4, 0.01M, 25°C) / 3% leche (leche descremada) a cada pozo, se cubrieron y se incubaron durante 1 hora a 37°C.

### **5.1.5 Preparación del suero estándar para las curvas de calibración**

Para las curvas de calibración, el suero estándar (STD) utilizado fue un patrón secundario preparado en la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias (UIID) a partir del suero de referencia SF-89 proporcionado por la Food & Drug Administration (FDA).

Se realizaron tres diluciones del STD: 1:300, 1:200 y 1:100, para ello, se descongeló el STD dejándolo a temperatura ambiente por 30 minutos y posteriormente se diluyó en una solución de leche al 3%, preparada con PBS (pH 7.4, 0.01M, 25°C) más Tween-20 (Sigma Aldrich, USA) al 0.05%, finalmente se agregó PSC C, 10 µg/mL, y se agitaron en vortex durante 30 segundos.

### **5.1.6 Preparación de las muestras**

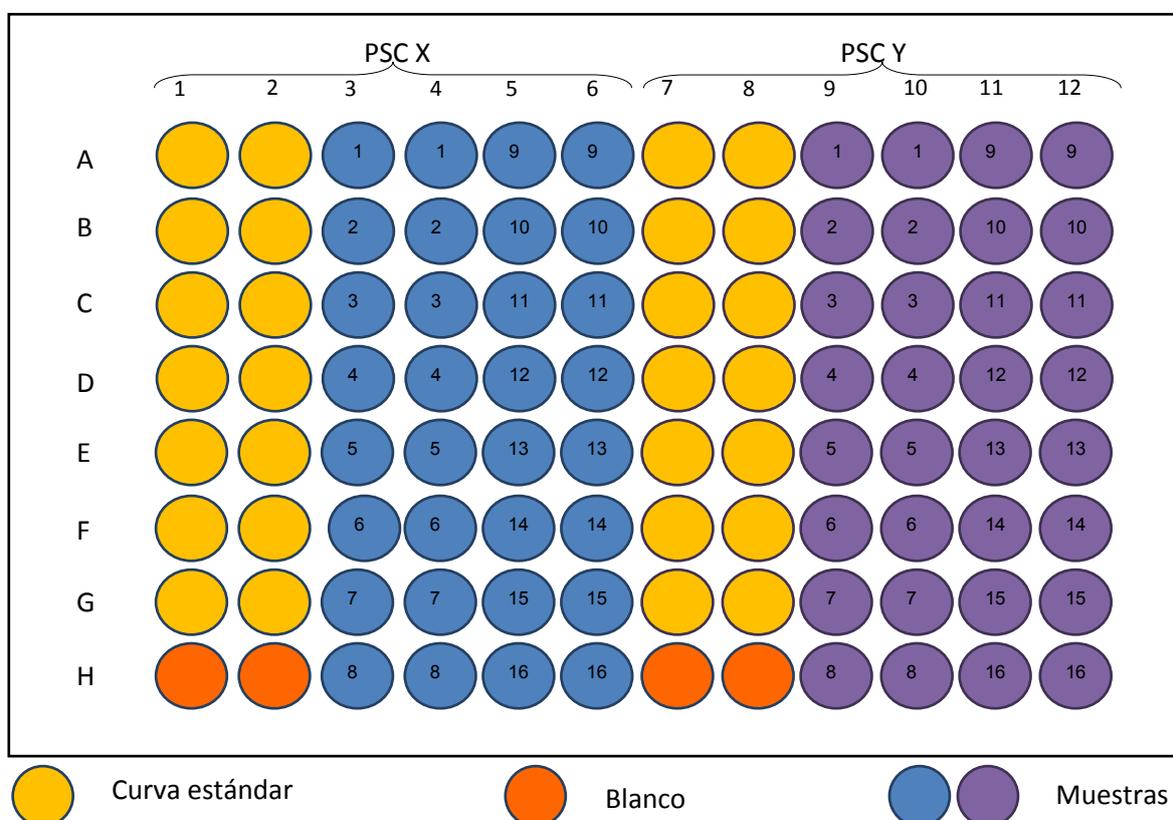
Se descongelaron las muestras dejándolas a temperatura ambiente por 30 minutos y después se diluyeron 12µL de cada muestra de suero en 3.6mL de una disolución de PBS (pH 7.4, 0.01M, 25°C) / 3% leche / 0.05% Tween-20, después se agregó PSC C, 10µg/mL, y polisacárido 22, 30µg/mL, a cada muestra y se agitaron en vortex durante 30 segundos.

### **5.1.7 Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)**

Después del bloqueo, las placas se lavaron tres veces agregando 200 µL de PBS (pH 7.4, 0.01M, 25°C) / 0.05% Tween-20 en cada pozo y posteriormente se prepararon las curvas de calibración por duplicado para cada serotipo. Para cuantificar los anticuerpos dirigidos contra los polisacáridos 1, 3, 4, 5, 8 y 14, se realizaron curvas de calibración con la dilución del STD 1:300, para los polisacáridos 6B, 11A, 18C, 19A y 23 se utilizó la dilución del STD 1:200 y para los polisacáridos 6A, 9V y 19F se utilizó la dilución del STD 1:100.

Se agregaron 200  $\mu$ l de la disolución de STD correspondiente en los pozos A1, A2, A7 y A8 de la placa para ELISA y 100  $\mu$ l PBS (pH 7.4, 0.01M, 25°C) / 3% leche / 0.05% Tween-20 en los demás pozos de las mismas columnas (1, 2, 7 y 8). El STD se diluyó sucesivamente, tomando 100  $\mu$ L y transfiriéndolos al siguiente pozo (diluciones 1:2) hasta la fila G, dejando el último (fila H) como blanco.

Se colocaron 100  $\mu$ L de muestra (16 muestras en total analizadas por duplicado), como se muestra en la figura 5.



**FIGURA 5.** Distribución de muestras y curvas de calibración. Cada número representa una muestra diferente.

Se cubrieron las placas y se incubaron a 37°C durante 1h40min.

Después de la incubación, se lavaron las placas con PBS (pH 7.4, 0.01M, 25°C)/0.05% Tween-20 por triplicado y se agregaron 100  $\mu$ L de una dilución 1:5000 del anticuerpo de cabra-anti IgG humana conjugado con la enzima peroxidasa de rábano picante (Santa cruz biotechnology, USA) en PBS (pH 7.4,

0.01M, 25°C)/3% leche/0.05% Tween-20 a cada pozo y se cubrieron para incubar por 1:40h a 37°C. A continuación se lavaron las placas nuevamente y se añadieron 100 µL de sustrato, 3,3',5',5'-Tetrametilbencidina (TMB substrate, MP biomedical). Esta reacción se detuvo con 50 µL de una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M y se obtuvieron las absorbancias utilizando el Espectrofotómetro para Microplacas Epoch - BioTek, ajustado a una longitud de onda de 450nm.

Las concentraciones de IgG se calcularon mediante la interpolación a la curva obtenida con el STD, del que se conocen las concentraciones de IgG frente a los polisacáridos capsulares estudiados.

## **5.2 Estandarización del método de ELISA**

### **5.2.1 Determinación de la concentración óptima de recubrimiento de PSC**

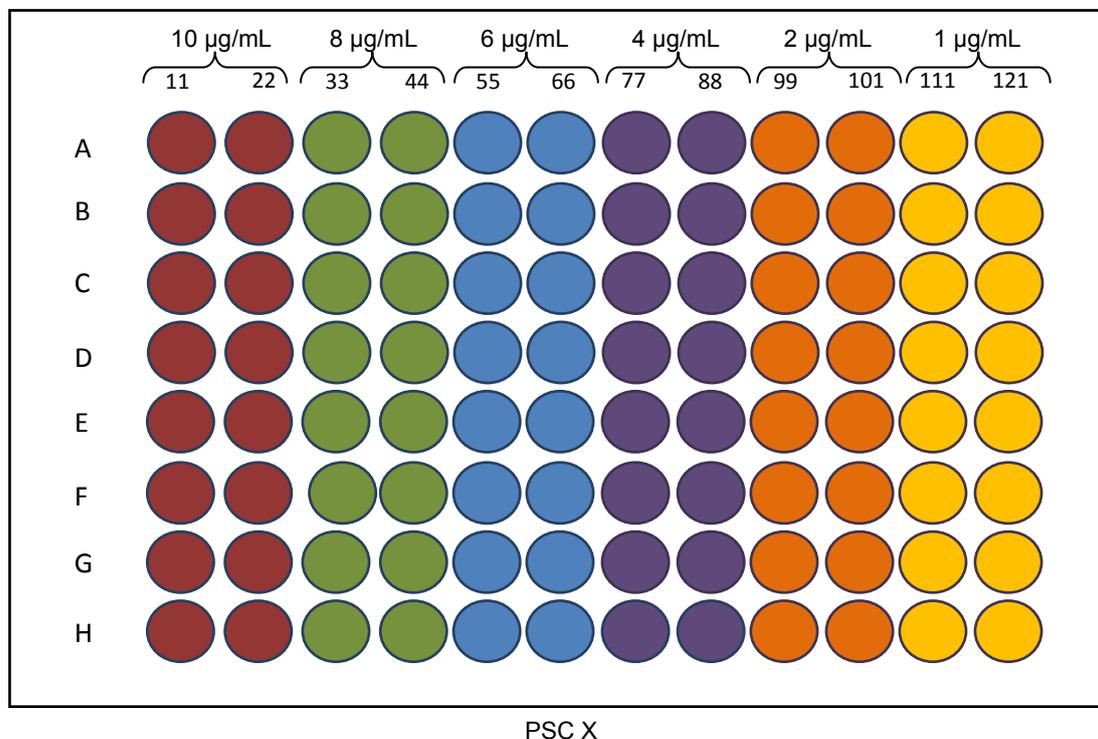
Durante el análisis de las muestras de pacientes con el procedimiento descrito anteriormente se observó una elevada tendencia en ciertos serotipos a la saturación de los puntos más altos de la curva de calibración, por lo que de acuerdo con la guía propuesta por la OMS, se decidió variar la concentración de PSC en la solución de recubrimiento.

En estos ensayos se siguió el procedimiento general de ELISA referido anteriormente con las siguientes modificaciones:

#### **A. Sensibilización de las placas para ELISA**

Se prepararon 6 soluciones de recubrimiento para cada uno de los PSC neumocócicos analizados, para lo cual se diluyó el PSC reconstituido (10µg/mL) en 10mL de PBS (pH 7.4, 0.01M, 25°C) para obtener las siguientes concentraciones: 10µg/mL, 8µg/mL, 6µg/mL, 4µg/mL, 2µg/mL y 1µg/mL, finalmente se agitaron con ayuda de un vortex a una velocidad de 8 durante 30 segundos.

Se recubrieron las placas para ELISA de 96 pozos con un polisacárido neumocócico (14 placas en total) como se muestra en la figura 6.



**FIGURA 6.** Recubrimiento de placas para ELISA con diferentes concentraciones de PSC para la evaluación de la concentración óptima de recubrimiento.

## B. Preparación del suero estándar para las curvas de calibración

Para las curvas de calibración se utilizó el mismo patrón secundario del laboratorio (STD).

Se realizó una única dilución 1:200 del STD en una solución de PBS (pH 7.4, 0.01M, 25°C) / 3% leche / 0.05% Tween-20, posteriormente se agregó PSC C, 10 µg/mL, y se agitaron en vortex a una velocidad de 8 durante 30 segundos.

Se añadieron 200µL del STD en la primera fila de cada placa y 100µL de una solución de PBS (pH 7.4, 0.01M, 25°C) / 3% leche / 0.05% Tween-20 en todos los demás pozos, después se realizaron diluciones 1:2, dejando la última fila como blanco.

### **5.2.2 Efecto de la adición de azida de sodio (NaN<sub>3</sub>) en las soluciones utilizadas para la ELISA**

Se realizaron dos ensayos evaluando dos diferentes concentraciones de NaN<sub>3</sub>: 0.02% m/v y 0.01% m/v

Las placas para ELISA se recubrieron de la misma manera que las placas utilizadas en el ensayo para determinar la concentración óptima de recubrimiento de PSC, sólo que la solución de recubrimiento se preparó con una disolución buffer de PBS (pH 7.4, 0.01M, 25°C) a la que se le añadió NaN<sub>3</sub> a una concentración final de 0.02% m/v o 0.01% m/v, dependiendo del ensayo, y se agitó a una velocidad de 8 en un Vortex por 30 segundos.

La solución de bloqueo también se preparó utilizando PBS (pH 7.4, 0.01M, 25°C) / (0.02% m/v ó 0.01% m/v) de NaN<sub>3</sub> / 3% leche y se agitó en un Vortex a una velocidad de 8 durante 30 segundos.

Para la construcción de las curvas de calibración, el STD se diluyó 1:200. Se añadieron 200µL del STD en la primera fila de cada placa y 100µL de una solución de PBS (pH 7.4, 0.01M, 25°C) / 3% leche / 0.05% Tween-20 en todos los demás pozos, después se realizaron diluciones 1:2, dejando la última fila como blanco.

El método de ELISA se realizó como se describió anteriormente.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Estandarización del método de ELISA

#### 6.1.1 Condiciones iniciales

Durante la implementación de la prueba (estudio previo) se determinaron las condiciones ideales de dilución del suero pero fijando a 10 µg/ml la concentración de la solución de recubrimiento, esto por motivos de tiempo y con la finalidad de implementar lo más pronto posible la prueba. Los resultados obtenidos fueron:

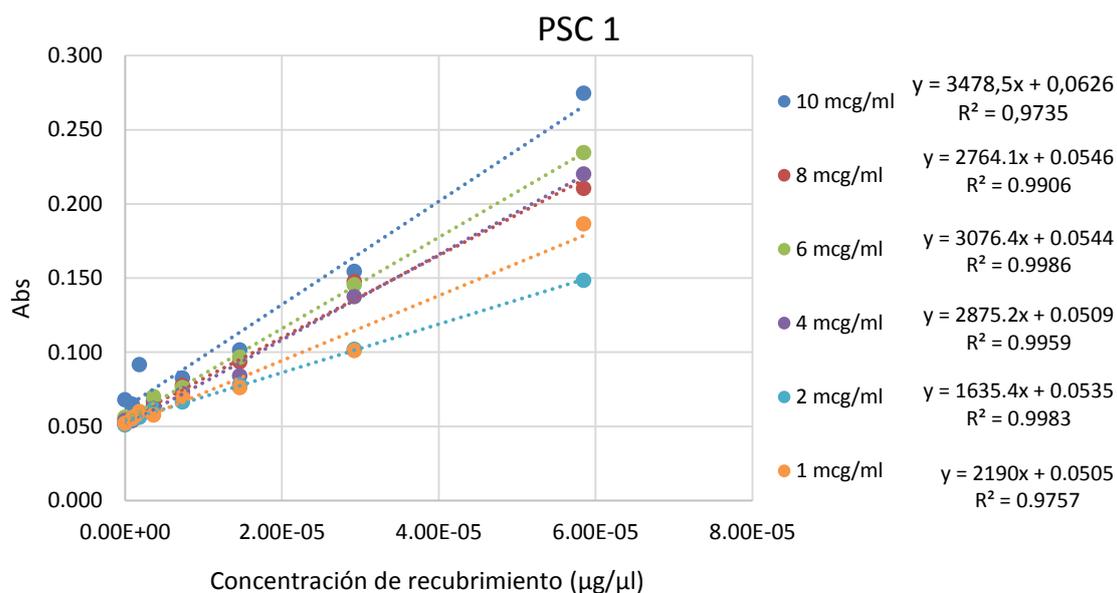
**TABLA 6.** Dilución óptima del suero estándar para cada uno de los serotipos evaluados, todos con una solución de recubrimiento de 10 µg/ml.

Polisacárido	Dilución óptima de suero estándar	Coefficiente de determinación	Pendiente
1	1:300	0.985	26935
3	1:200	0,9952	133956
4	1:300	0.9938	32813
5	1:200	0.9845	16029
6A	1:100	0.9896	17604
6B	1:200	0.9901	16942
8	1:200	0.9984	23981
9V	1:100	0.9906	14457
11A	1:200	0.9901	25579
14	1:300	0.9968	13918
18C	1:300	0.9963	26513
19A	1:300	0.9951	7981
19F	1:100	0.9875	15679
23	1:200	0.9973	22621

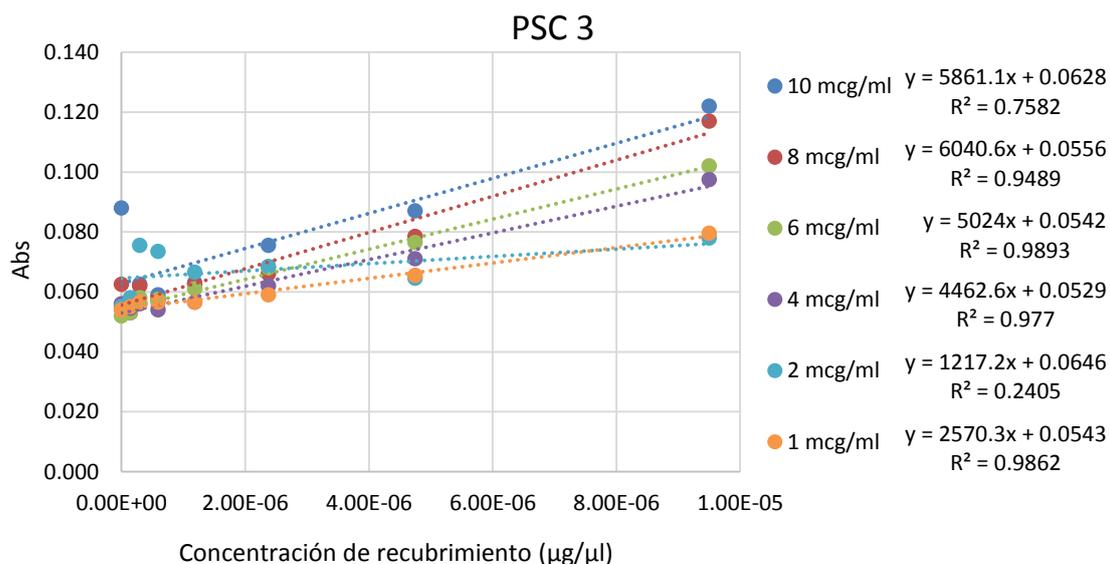
Para la mejora continua de dicho ensayo, se buscó encontrar la concentración óptima de recubrimiento para cada una de los polisacáridos. Los resultados se muestran a continuación.

### 6.1.2. Determinación de la concentración óptima de recubrimiento de PSC

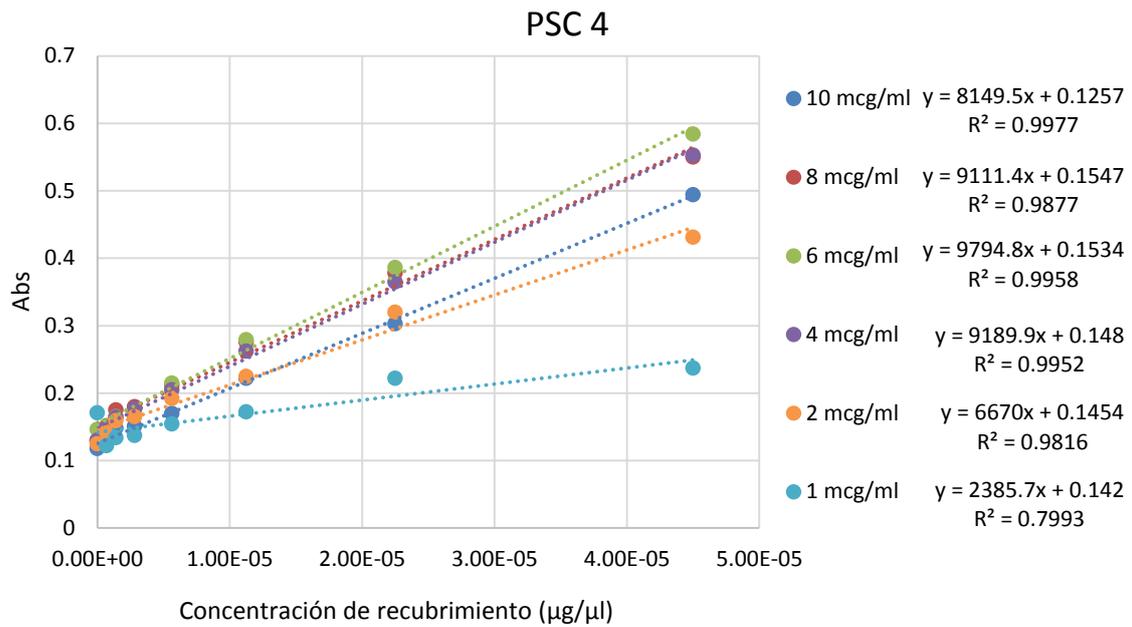
Se construyeron las curvas estándar de cada una de las concentraciones de recubrimiento probadas y se obtuvo la ecuación de cada recta y su coeficiente de determinación  $R^2$  para finalmente seleccionar la recta con mayor linealidad ( $R^2 > 0.98$ ) (Figuras 7-20).



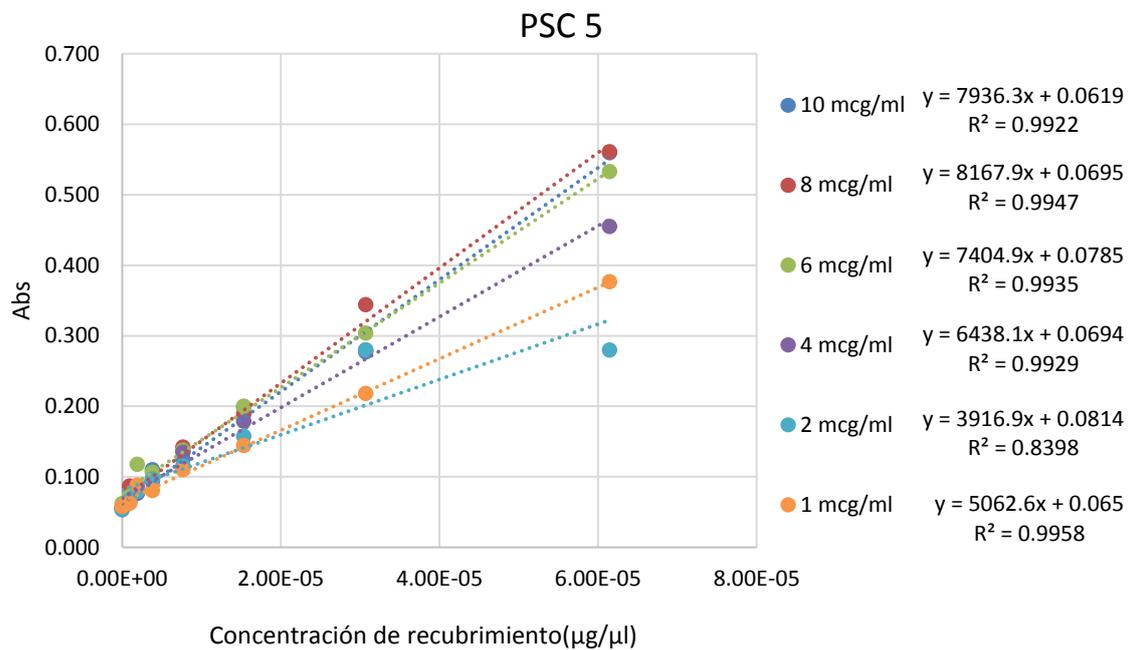
**FIGURA 7.** Curvas de calibración de la solución de recubrimiento a distintas concentraciones de PSC1. La curva con mayor linealidad fue en la que la concentración de la solución de recubrimiento fue de **6 µg/ml**.



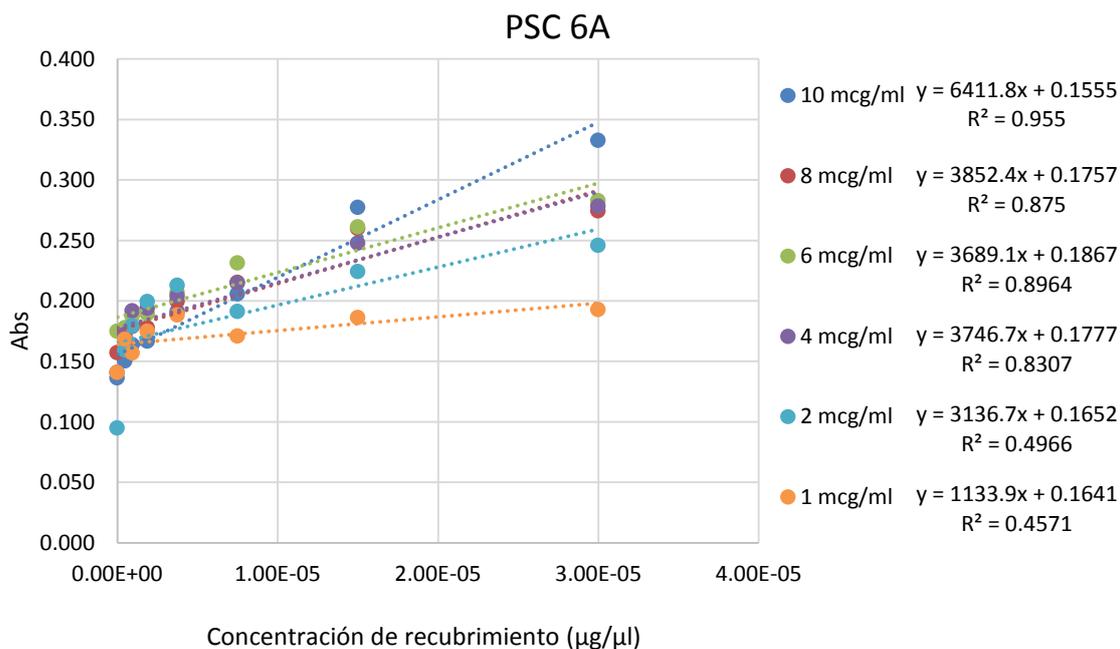
**FIGURA 8.** Curvas de calibración de la solución de recubrimiento a distintas concentraciones del PSC3. La curva con mayor linealidad fue en la que la concentración de la solución de recubrimiento fue de **6 µg/m**.



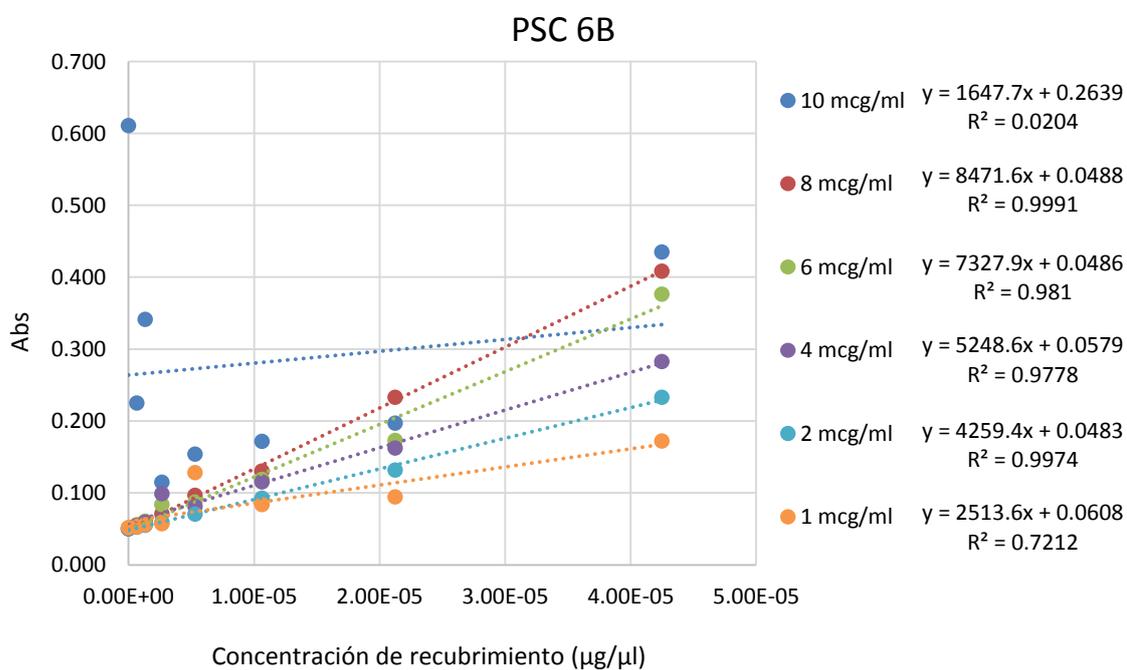
**FIGURA 9.** Curvas de calibración de la solución de recubrimiento a distintas concentraciones del PSC4. La curva con mejor regresión lineal fue en la que la concentración de la solución de recubrimiento fue de **6 µg/ml**.



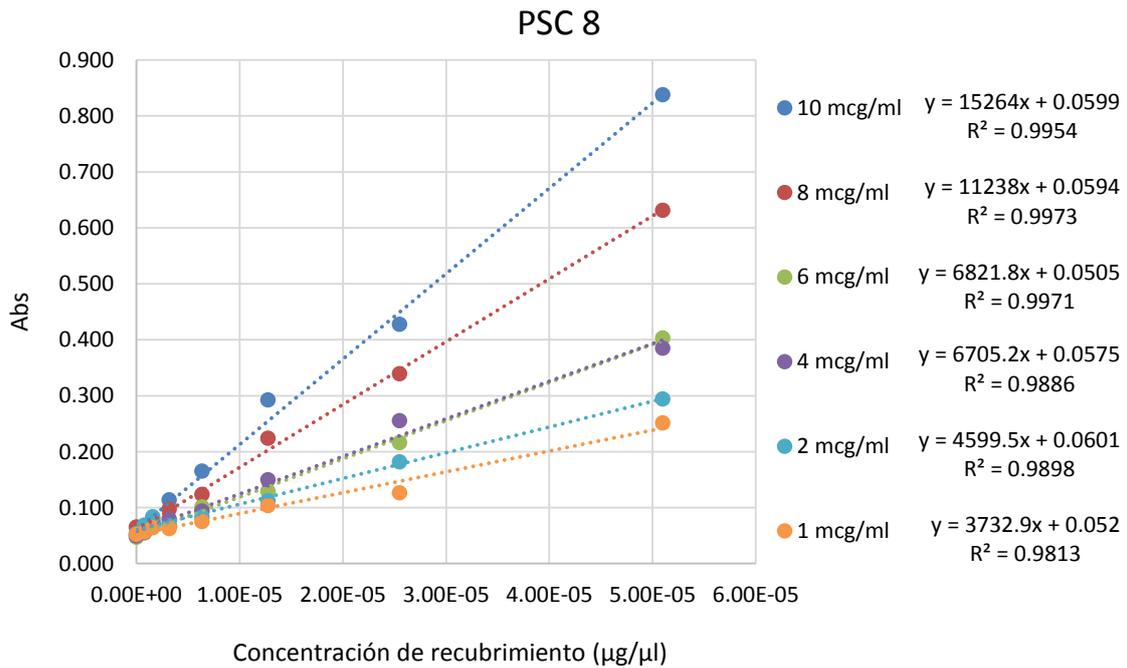
**FIGURA 10.** Curvas de calibración de la solución de recubrimiento a distintas concentraciones de PSC 5. La curva con mayor linealidad fue en la que la concentración de la solución de recubrimiento fue de **8 µg/ml**.



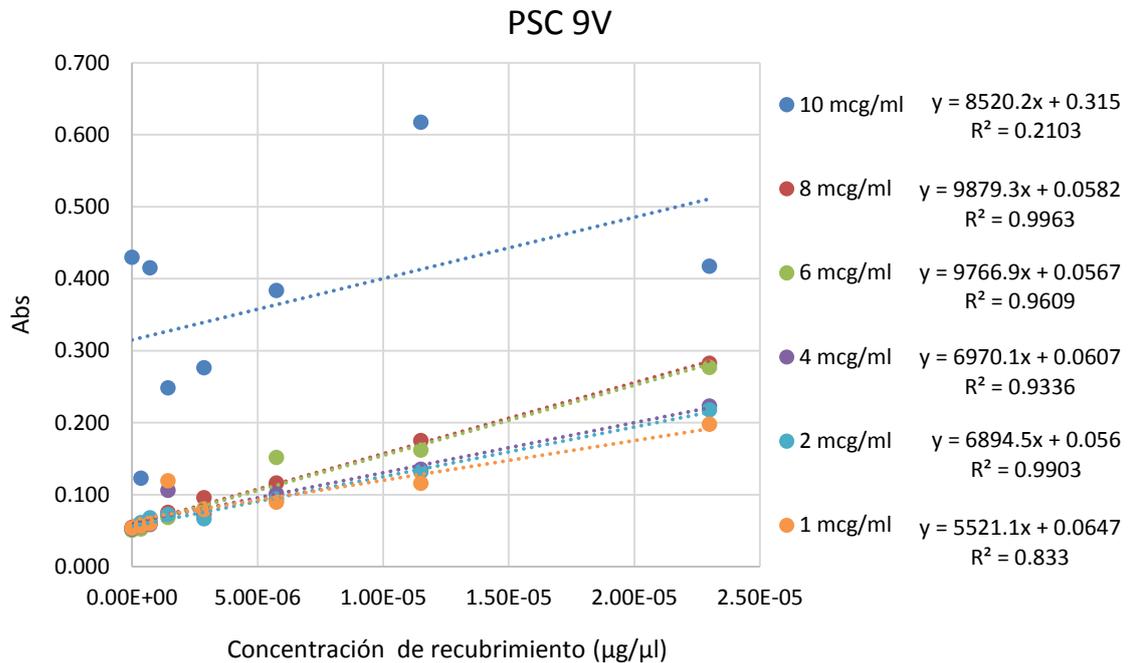
**FIGURA 11.** Curvas de calibración de la solución de recubrimiento a distintas concentraciones de PSC6A. La curva con mayor linealidad fue en la que la concentración de la solución de recubrimiento fue de **10 µg/ml**.



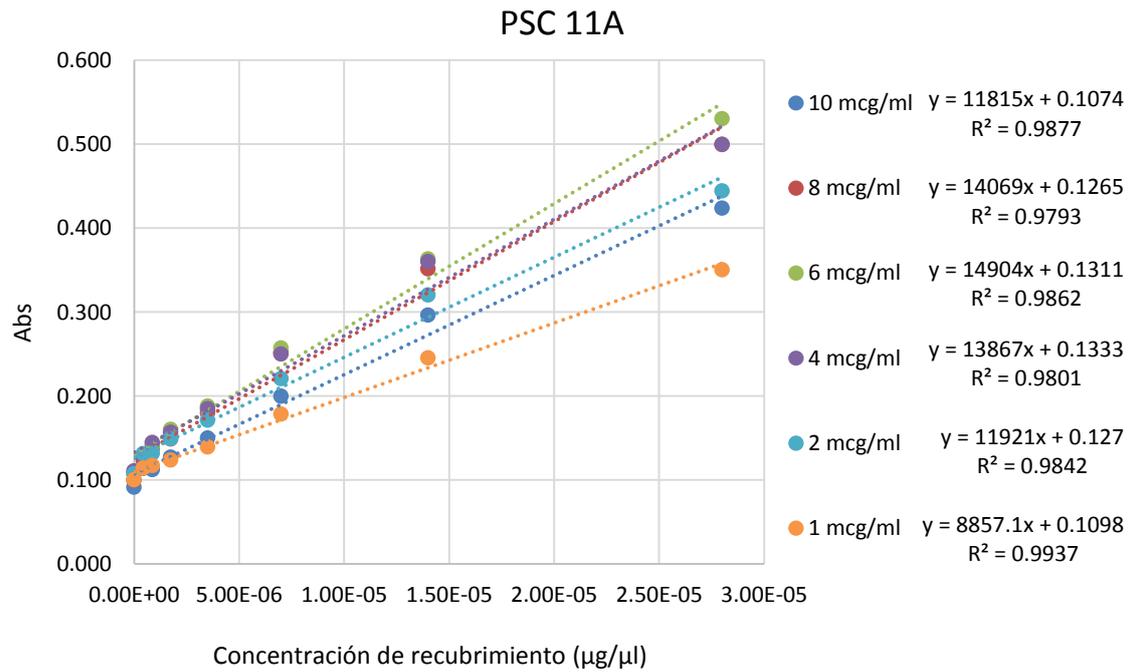
**FIGURA12.** Curvas de calibración de la solución de recubrimiento a distintas concentraciones de PSC6B. La curva con mayor linealidad fue en la que la concentración de la solución de recubrimiento fue de **8 µg/ml**.



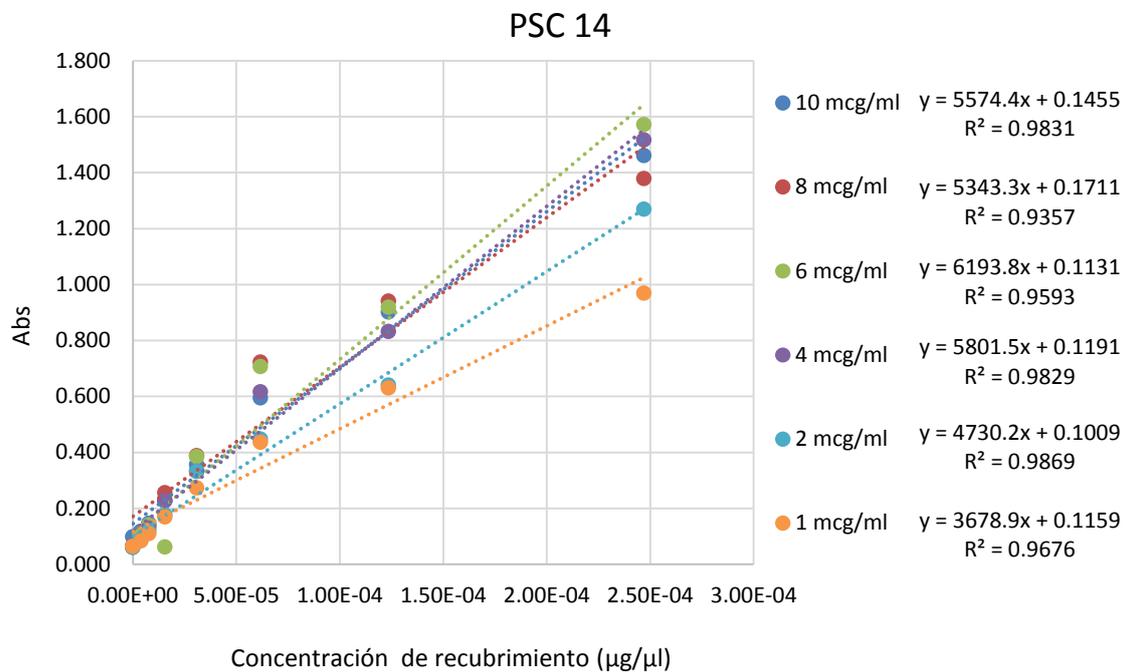
**FIGURA 13.** : Curvas de calibración de la solución de recubrimiento a distintas concentraciones de PSC8. La curva con mayor linealidad fue en la que la concentración de la solución de recubrimiento fue de **8 µg/ml**.



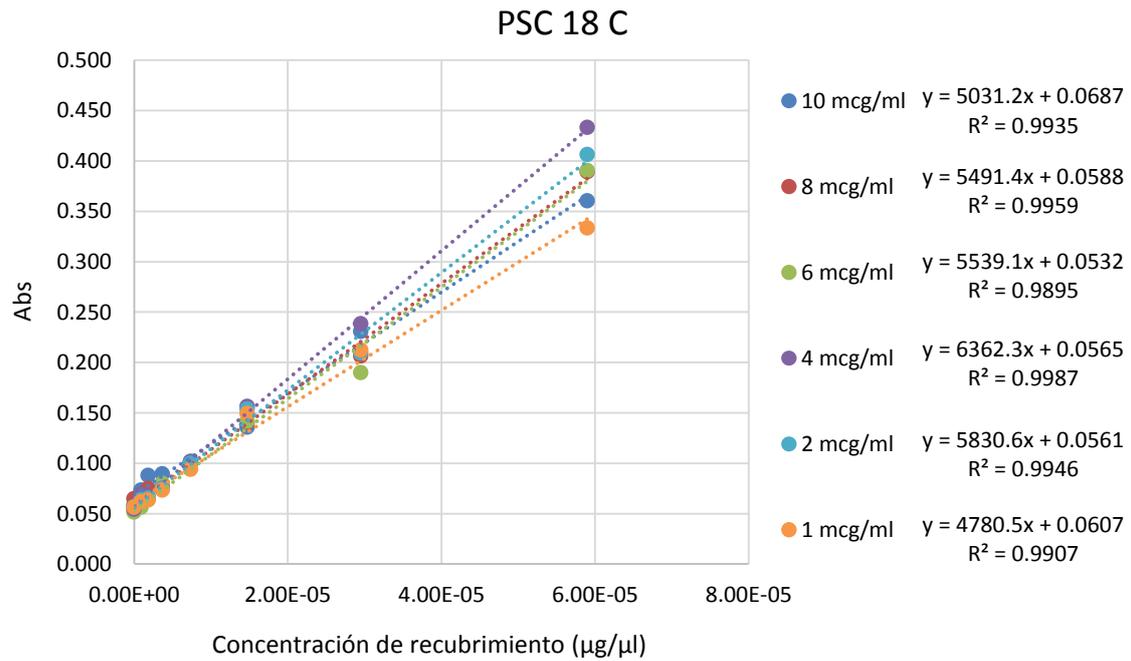
**FIGURA 14.** Curvas de calibración de la solución de recubrimiento a distintas concentraciones de PSC9V. La curva con mayor linealidad fue en la que la concentración de la solución de recubrimiento fue de **8 µg/ml**.



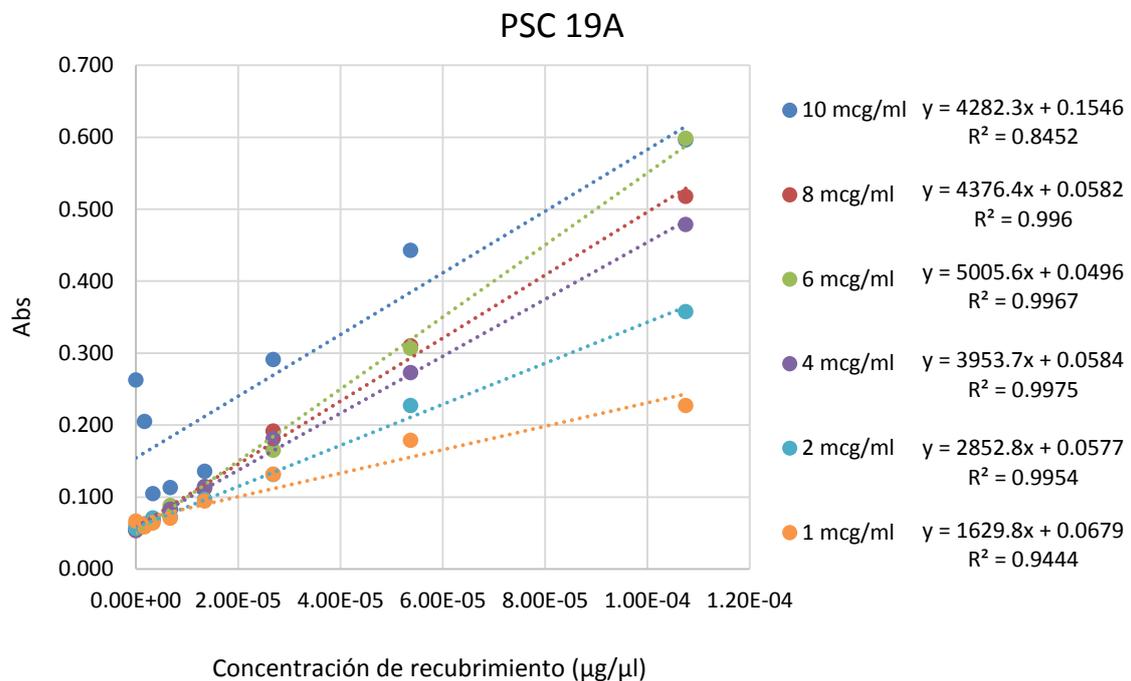
**FIGURA 15.** Curvas de calibración de la solución de recubrimiento a distintas concentraciones de PSC11A. La curva con mayor linealidad fue en la que la concentración de la solución de recubrimiento fue de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .



**FIGURA 16.** Curvas de calibración de la solución de recubrimiento a distintas concentraciones de PSC14. La curva con mayor linealidad fue en la que la concentración de la solución de recubrimiento fue de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

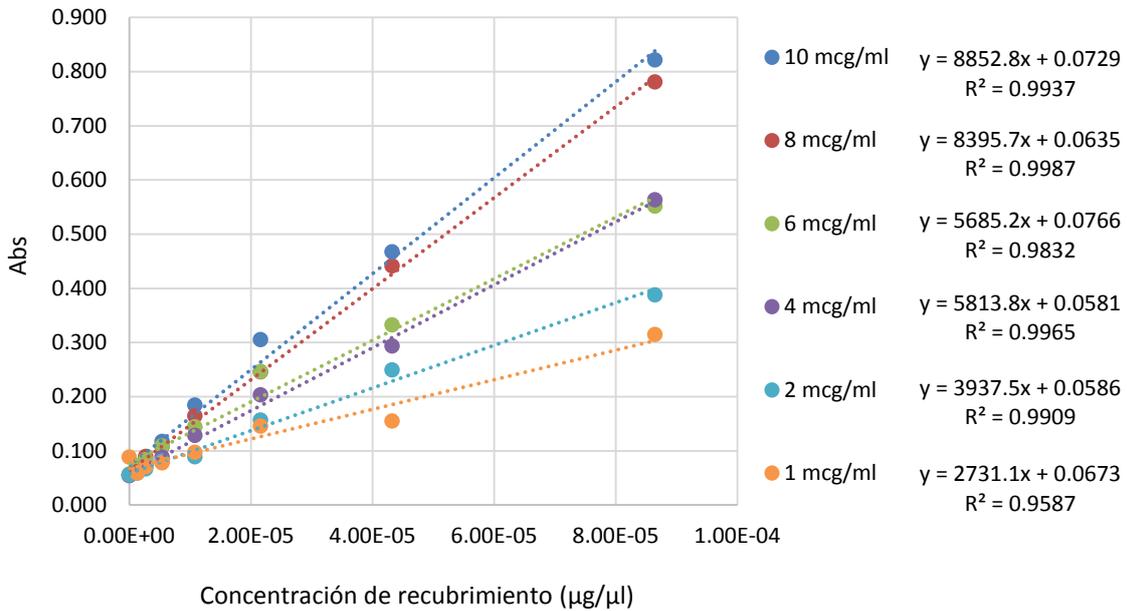


**FIGURA 17.** Curvas de calibración de la solución de recubrimiento a distintas concentraciones de PSC18C. La curva con mayor linealidad fue de **4 µg/ml**.



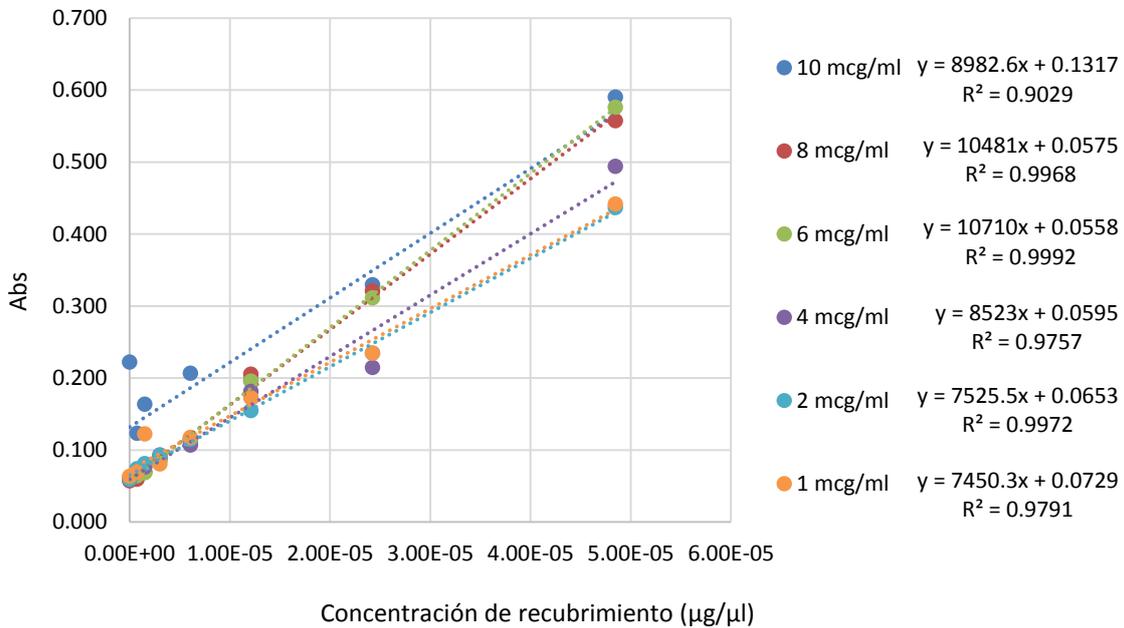
**FIGURA 18.** Curvas de calibración de la solución de recubrimiento a distintas concentraciones de PSC19A. La curva con mayor linealidad fue en la que la concentración de la solución de recubrimiento fue de **6 µg/ml**.

### PSC 19F



**FIGURA 19.** Curvas de calibración de la solución de recubrimiento a distintas concentraciones de PSC19F. La curva con mayor linealidad fue en la que la concentración de la solución de recubrimiento fue de **8 µg/ml**.

### PSC 23F



**FIGURA 20.** Curvas de calibración de la solución de recubrimiento a distintas concentraciones de PSC23. La curva con mayor linealidad fue en la que la concentración de la solución de recubrimiento fue de **6 µg/ml**.

En la siguiente tabla se muestran los coeficientes de determinación y las pendientes de las curvas con mayor linealidad para cada uno de los polisacáridos de *S. pneumoniae* incluidos en el estudio.

**TABLA 7.** Coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y pendientes de las curvas de calibración con mayor linealidad.

Polisacárido	Concentración (µg/ml)	Coeficiente de determinación	Pendiente(m)
PSC 1	6	0.9986	3076.4
	2	0.9983	1635.4
PSC 3	6	0.9893	5024
	1	0.9862	2570
PSC 5	1	0.9958	5062.6
	8	0.9947	8167.4
PSC 4	10	0.9977	8149.5
	6	0.9958	9794.8
PSC 6A	10	0.955	6411.8
	6	0.8904	3689.1
PSC 6B	8	0.9991	8471.6
	2	0.9974	4259.4
PSC 8	8	0.9973	11238
	6	0.9971	6821.8
PSC 9V	8	0.9963	9879.3
	2	0.9903	6894.5
PSC 11A	1	0.9937	8857
	10	0.9877	11815
PSC 14	2	0.9869	4730.2
	10	0.9831	5574.4
PSC 18C	4	0.9987	6362.6
	8	0.9959	5491.4
PSC 19A	4	0.9975	3953.7
	6	0.9967	5005.6
PSC 19F	8	0.9987	8395.7
	4	0.9965	5813.8
PSC 23	6	0.9992	10710
	2	0.9972	7525.5

### 6.1.3 Efecto de la adición de azida de sodio (NaN<sub>3</sub>) en las soluciones utilizadas para la ELISA

Los ensayos realizados con la adición de ambas concentraciones de azida de sodio, 0.02% y 0.01%, (Datos no mostrados) no son totalmente satisfactorios debido a que el tiempo de revelado de las placas es extenso; ya que aquellos ensayos en los que no se empleó azida de sodio la reacción de revelado fue de cinco minutos, a diferencia de aquellos en los que sí se utilizó, donde el

revelado tardó hasta treinta minutos y la mayoría de las absorbancias están por debajo de 0,400 unidades. Además, al momento de la construcción de las curvas estándar con estas placas, el intervalo dinámico de trabajo es muy reducido y la pendiente de las curvas disminuye de manera considerable.

## 6.2 Cuantificación de anticuerpos dirigidos contra antígenos neumocócicos en muestras séricas de pacientes.

Se analizaron las muestras de 91 pacientes de distintos estados de la República Mexicana (figura 21), principalmente del D.F. (36.3%), Veracruz (19.8%) y el Estado de México (18.7%).

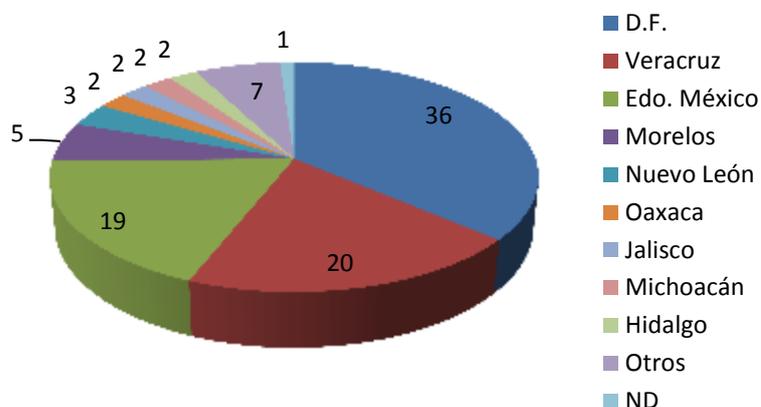


FIGURA 21. Estado de procedencia de los pacientes.

La edad de los pacientes varió entre 9 meses y 38 años, media de 8.9 años; el 9.9% corresponde a niños < 2 años de edad, 56.0% niños de 2 a 5 años de edad, 29.7% niños de 6 a 17 años de edad y 4.4% a personas  $\geq$  18 años de edad (figura 22).

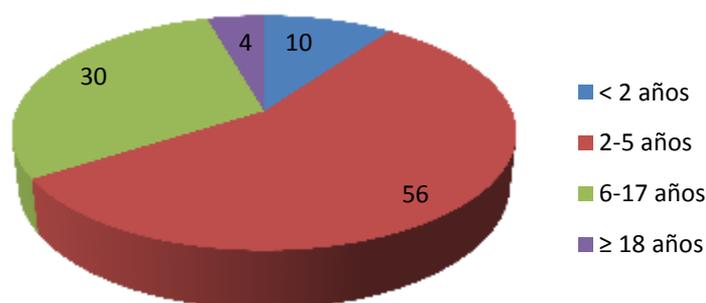


FIGURA 22. Edad de los pacientes analizados.

**TABLA 8.** Diagnóstico de los 91 pacientes evaluados.

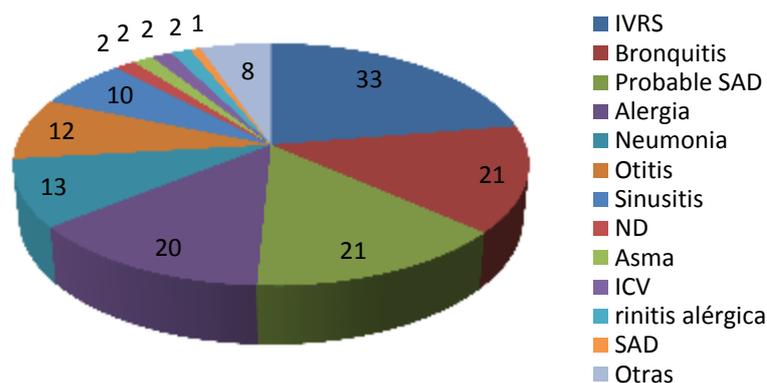
No.	Sexo	Edad	Diagnóstico
1	F	3	Asma
2	M	1	
3	F	2	Bronquitis recurrentes
4	F	3	
5	M	1	
6	M	1	
7	F	2	
8	M	2	
9	M	2	
10	M	2	
11	F	2	
12	M	2	Bronquitis recurrentes / alergia
13	F	2	
14	F	3	
15	M	5	
16	F	5	
17	M	6	
18	F	6	
19	F	33	
20	M	9 meses	CID
21	M	9	Deficiencia selectiva de IgG3
22	F	8	Dermatitis /papilomatosis
23	M	1	ICV
24	F	38	ICV / TB recurrente
25	M	6	IVRS / Bronquitis
26	M	4	IVRS / neumonías recurrentes
27	M	2	IVRS / Otitis / Neumonía
28	M	5	IVRS / Probable SAD
29	M	5	
30	F	2	
31	F	3	
32	F	1	
33	F	2	
34	F	3	
35	M	4	
36	F	4	
37	F	5	IVRS recurrentes
38	F	6	
39	M	6	
40	F	8	
41	M	12	
42	M	26	
43	F	36	
44	M	2	IVRS recurrentes / alergia
45	M	4	IVRS recurrentes / asma

CID: Inmunodeficiencia combinada no grave. ICV: Inmunodeficiencia común variable. TB recurrente: Tuberculosis recurrente. IVRS: Infección de vías respiratorias superiores. SAD: Inmunodeficiencia de anticuerpos específicos.

No.	Sexo	Edad	Diagnóstico
46	M	3	IVRS recurrentes / deficiencia de IgG2
47	M	7	IVRS recurrentes / Otitis recurrentes
48	M	8	IVRS recurrentes / rinitis alérgica
49	M	4	IVRS recurrentes / sinusitis
50	M	11	IVRS recurrentes / Sinusitis / alergia
51	M	14	IVRS recurrentes / sinusitis / otitis recurrentes
52	M	7	IVRS recurrentes / sinusitis / otitis recurrentes
53	M	4	Neumonía / alergia / IVRS
54	M	4	Neumonía / probable SAD
55	M	6	Neumonía / SAD
56	M	2	
57	M	3	
58	M	4	Neumonías recurrentes
59	M	4	
60	M	4	
61	F	3	Otitis / neumonía
62	M	5	Otitis / Sinusitis
63	M	4	
64	M	5	
65	F	7	Otitis recurrentes
66	F	7	
67	F	13	
68	F	13	
69	M	16	Pansinusitis de repetición
70	M	1	
71	F	1	
72	M	2	
73	M	2	
74	M	2	
75	M	3	
76	M	4	
77	F	4	Probable SAD
78	F	4	
79	M	4	
80	F	5	
81	M	5	
82	F	6	
83	M	8	
84	F	8	
85	M	9	
86	M	7	Rinitis alérgica / sinusitis / Neumonía
87	F	4	Sepsis por neumococo
88	F	3	Sinusitis / IVRS
89	F	8	Sinusitis crónica
90	F	1	ND
91	F	11	

IVRS: Infección de vías respiratorias superiores. SAD: Inmunodeficiencia de anticuerpos específicos.  
ND: No Disponible.

En la tabla 8 se muestra el diagnóstico de cada uno de los pacientes evaluados. Las enfermedades más frecuentes dentro de esta población de estudio fueron: infecciones de vías respiratorias superiores, bronquitis, probable SAD y alergia (figura 23).



**FIGURA 23.** Diagnóstico de los pacientes al momento de solicitar la prueba.

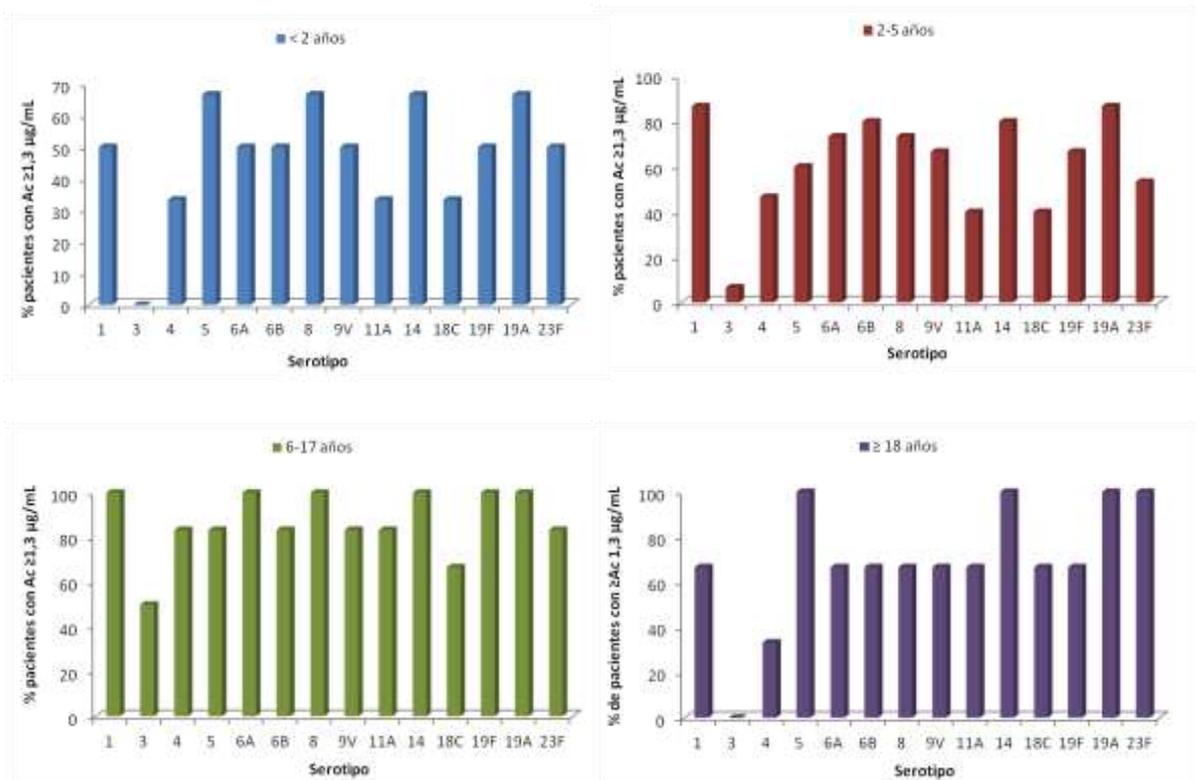
Se analizaron 139 muestras de las cuales 96 corresponden a muestras antes y después de la inmunización con la vacuna neumocócica polisacárida no conjugada 23-valente en 48 pacientes, 30 fueron solamente muestras antes de la inmunización y 13 fueron solamente muestras después de la inmunización. (Tabla 9).

**TABLA 9.** Tipo de análisis realizado a cada grupo de pacientes.

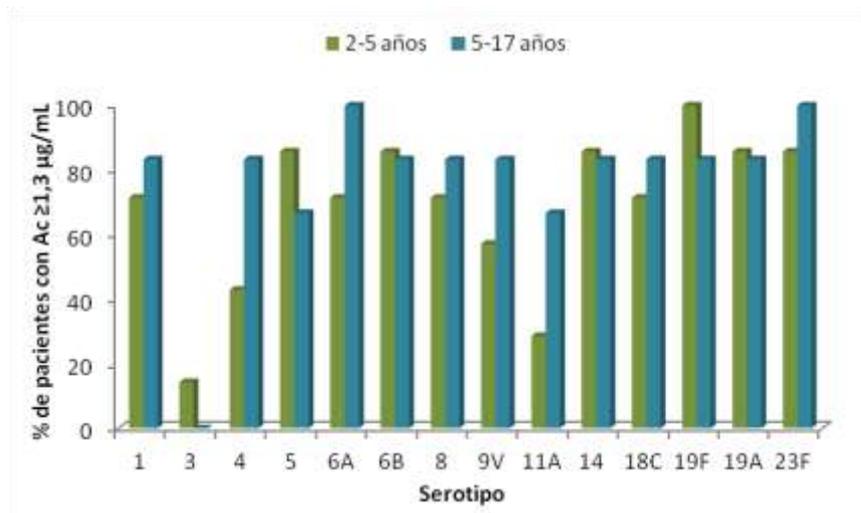
Tipo de análisis	Número de pacientes
Pre-inmunización y Post-inmunización	48
Pre-inmunización	30
Post-inmunización	13
Total	91

Se analizaron 30 muestras de pacientes antes de la inmunización y se dividieron en 4 grupos según la edad de los pacientes: menores de 2 años, de 2 a 5 años, de 6 a 17 años y con una edad mayor o igual a 18 años (figura 24). En el grupo de menores de 2 años ninguno de los pacientes tuvo una

concentración de anticuerpos  $\geq 1.3 \mu\text{g/mL}$  para el serotipo 3 y para los serotipos 4, 11A y 18C sólo el 33% de pacientes tuvieron una respuesta  $\geq 1.3 \mu\text{g/mL}$ . En el grupo de 2-5 años sólo el 7% tuvo niveles protectores de anticuerpos para el serotipo 3 y el 40% para los serotipos 11A y 18C. En el tercer grupo, de 6-17 años, se detectaron niveles protectores de anticuerpos para el serotipo 3 en el 50% de los pacientes, para los demás serotipos el porcentaje fue mayor y en el grupo de  $\geq 18$  años ninguno de los pacientes respondió al serotipo 3 y sólo el 33% tuvo niveles de anticuerpos  $\geq 1,3 \mu\text{g/mL}$  para el serotipo 4.



**FIGURA24.** Porcentaje de pacientes con niveles de anticuerpos  $\geq 1,3 \mu\text{g/mL}$  en muestras de preinmunización



**FIGURA 25.** Porcentaje pacientes con niveles de anticuerpos  $\geq 1,3$   $\mu\text{g/mL}$  en muestras de postinmunización.

estos pacientes también se dividieron en grupos según su edad: 2-5 años y 5-17 años (figura 25). La mayoría de los pacientes en ambos grupos tuvo un nivel adecuado de anticuerpos contra los distintos serotipos de *S. pneumoniae* analizados, excepto para el serotipo 3.

**TABLA 10.** Respuesta a polisacáridos (PSP) de *S. pneumoniae*. Análisis en muestras de preinmunización y postinmunización

Edad pacientes	Respuesta adecuada* a PSC analizados		Respuesta adecuada* a PSC analizados	
	< 50 %	$\geq 50\%$	< 70 %	$\geq 70\%$
< 2 años	0	100.0% (3)	---	---
2-5 años	6.9%(2)	93.1%(27)	---	---
6-17 años	---	---	46.7%(7)	53.3%(8)
$\geq 18$ años	---	---	100.0%(1)	0

\*Respuesta adecuada: aumento de título de dos veces o más después de la inmunización.

Sólo en 48 pacientes se determinaron los niveles de anticuerpos antes y después de la inmunización. Todos los pacientes menores de dos años respondieron adecuadamente a más del 50% de los polisacáridos analizados y sólo dos pacientes de 2 a 5 años no respondieron adecuadamente a más del 50 por ciento. En el grupo de 6 a 17 años el 46.7% (7) tuvo un aumento de título de dos veces o más después de la inmunización en menos del 70% de los polisacáridos analizados y el paciente mayor de 18 años tampoco respondió a más del 70 por ciento (tabla 10).

## 7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 7.1. Determinación de la concentración óptima de recubrimiento de PSC

El motivo por el cual se decidió analizar diferentes concentraciones de recubrimiento fue que la linealidad de la curva de calibración se perdía en los puntos de mayor concentración, para evitar que esto sucediera se probaron soluciones de recubrimiento de menor concentración. Para cada uno de los polisacáridos se analizaron 5 diluciones de concentraciones diferentes (1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 6 µg/mL, 8 µg/mL y 10 µg/mL) y se obtuvieron las curvas de calibración por el método de mínimos cuadrados.

El reactivo utilizado para revelar las placas de ELISA fue la 3, 3', 5,5'-tetrametilbencidina, esta al ser oxidada genera un producto colorido que bajo ciertas condiciones cumple la Ley de Lambert y Beer, la cual establece que la absorbancia de la disolución que contiene el analito de interés, a una longitud de onda constante, es directamente proporcional a la concentración de dicho analito<sup>33</sup>, lo cual permite la construcción de curvas de calibración. Teóricamente es posible obtener la concentración de una muestra problema con la medición de un solo estándar, sin embargo esto es muy problemático debido a que es poco probable que una sola medición esté exenta de errores, esto se soluciona aumentando el número de estándares de distintas concentraciones, razón por la cual se hacen curvas de calibración en un intento de disminuir los errores asociados a estas mediciones y volver más acertados los resultados.

Se construyeron las curvas de calibración para cada una de las soluciones de recubrimiento de los 14 polisacáridos evaluados (figuras 7-20) y se seleccionó la curva con mejor coeficiente de determinación o  $R^2$ , ya que este nos indica el porcentaje de la variación de Y que se explica a través del modelo lineal que se ha estimado, así mientras más cercano esté de uno más se acerca al 100% hay menor variación no explicada en Y por la ecuación. Además, un factor de determinación cercano a uno también nos habla de un alto grado de correlación

(R), lo que significa que la mayoría de los puntos experimentales tienden a caer dentro de una sola recta y que las diferencias o residuales entre los puntos experimentales y los puntos de la recta son muy pequeñas. Cuando se obtuvieron curvas con  $R^2$  similares, se consideró también la pendiente de la curva (tabla 7), ya que es un indicador de qué tan sensible es el método para la detección del analito deseado, por lo que una curva con mayor pendiente es más sensible.

Se observó que los PSC 1, 3, 4, 19A y 23F generan una mejor curva a una concentración de 6  $\mu\text{g/ml}$  (figuras 7, 8, 9, 18 y 20), los PSC 5, 6B, 8, 9V, 19F a 8  $\mu\text{g/ml}$  (figuras 10, 12, 13, 14 y 19) y el PSC 18C a 4  $\mu\text{g/ml}$  y 8  $\mu\text{g/ml}$  (figura 17). Estas polisacáridos tuvieron curvas con mejor linealidad a concentraciones menores de 10  $\mu\text{g/ml}$ , esto ocurrió posiblemente porque la ley de Lambert y Beer aplica sólo para soluciones diluidas, puesto que un exceso de moléculas en la solución genera mayor interacción entre ellas y la absorbancia deja de ser proporcional a la concentración de la disolución<sup>33</sup>.

El PSC 11A tuvo mejor comportamiento a una concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$  con un coeficiente de determinación de 0.9937 y una pendiente de 8857  $\mu\text{g/ml}$  (figura 15), sin embargo la preparación de esta solución de recubrimiento es poco práctica en el laboratorio ya que las alícuotas necesarias para su preparación son muy pequeñas, por lo que se considerará la curva de 10  $\mu\text{g/ml}$  ( $R^2 = 0.9877$  y  $m = 11815 \mu\text{g/ml}$ ) como la de mejor comportamiento.

Para los PSC 6A y 14 se obtuvo mejor linealidad con recubrimiento de 10  $\mu\text{g/ml}$  (figuras 11 y 16). En el caso particular del polisacárido 6A se obtuvieron coeficientes de determinación menores de 0.98 y las pendientes de las curvas fueron muy bajas en comparación con los demás polisacáridos, por lo que este ensayo debe repetirse.

Los resultados obtenidos mediante este protocolo se compararon con los obtenidos por otros dos laboratorios: Laboratorio de neumococo (MCRI, Australia) y Laboratorio de vacunas e inmunología (KTL, Finlandia); donde se realiza la cuantificación de anticuerpos contra los PSC 4, 6B, 9V, 14, 18C 19F y

23F<sup>34</sup>. Dichos protocolos difieren del descrito en este trabajo ya que el laboratorio KTL utiliza otra enzima, la fosfatasa alcalina, y el MCRI utiliza una concentración distinta del suero estándar y placas de mediana afinidad. Las concentraciones de recubrimiento se muestran en la siguiente tabla.

**TABLA 11.** Comparación de distintos ensayos interlaboratorio.

Antígeno	UIID (µg/ml)	MCRI (µg/ml)	KTL (µg/ml)
4	10	5	2.5
6B	8	10	5
9V	8	5	5
14	2	5	2.5
18C	4	5	5
19F	8	5	2.5
23F	6	5	10

Como se puede observar la concentración óptima de recubrimiento varía en cada laboratorio, lo cual se debe a que la concentración de recubrimiento no sólo depende del tipo de polisacárido, sino también de los materiales y reactivos utilizados en cada protocolo y es por ello que se ha establecido que cada laboratorio debe analizar o determinar sus propias concentraciones óptimas de trabajo, entre ellas la concentración del recubrimiento.<sup>28</sup>

Es importante puntualizar que en los ensayos previos se utilizaban 3 diluciones del suero estándar (1:300,1:200,1:100), lo cual es poco práctico especialmente cuando se analiza un número elevado de muestras; es por ello que se decidió observar el comportamiento de los 14 polisacáridos utilizando una sola dilución del suero estándar, 1:200.

Se obtuvieron concentraciones óptimas de recubrimiento diferentes para cada polisacárido analizado, sin embargo para la mayoría osciló entre 6-8 µg/ml, por lo que se propone probar una concentración de 7 µg/ml y observar si se obtienen curvas con coeficientes de determinación  $\geq 0.98$  para todos los serotipos.

## **7.2 Efecto de la adición de azida de sodio (NaN<sub>3</sub>) en las soluciones utilizadas para la ELISA**

La adición de azida de sodio ocasionó que se obtuvieran absorbancias menores a 0,400 unidades como punto más alto de las curvas de calibración; lo cual redujo el intervalo dinámico de las mismas afectando la sensibilidad y confiabilidad del ensayo, sobre todo aquellas con concentraciones bajas de anticuerpos. Sin embargo, aunque se le reconoce un amplio potencial biocida<sup>35</sup>, debido a su naturaleza química, es capaz de interactuar con muchas moléculas entre ellas enzimas<sup>36</sup> por lo que es posible que haya interaccionado con las moléculas presentes en el ensayo, limitando su capacidad de reaccionar y generar el producto colorido que posteriormente se detecta por espectrofotometría.

No obstante se pretende encontrar la concentración de azida que sea útil para la inhibición microbiana y que no afecte de manera considerable el desempeño de la prueba.

## **7.3 Cuantificación de anticuerpos dirigidos contra antígenos neumocócicos en muestras séricas de pacientes.**

Se analizaron las muestras de 91 pacientes con un historial de infecciones recurrentes de la vía respiratoria alta y/o baja (sinusitis, otitis media, bronquitis, neumonía, etc.), ya que la mayoría de los pacientes con SAD presentan estas características clínicas, también se analizaron muestras de pacientes con otras afecciones tales como dermatitis puesto que algunos pacientes con SAD pueden presentar asociación con enfermedades atópicas como dermatitis y asma<sup>11, 17</sup>.

La maduración del sistema inmune ocurre durante los primeros años de vida, siendo los antígenos polisacáridos los que tardan más tiempo en generar una respuesta inmune adecuada y es hasta los 2 años de edad cuando el niño alcanza los niveles de inmunoglobulinas normales en el adulto, por ello el uso de la vacuna de polisacáridos de neumococo se recomienda para personas  $\geq 2$  años de edad, sin embargo a los 6 meses de edad puede demostrarse una

respuesta a algunos antígenos neumocócicos polisacáridos<sup>18</sup>, aunque generalmente es pobre, y el LAGID también ha reportado que esta vacuna puede ser efectiva en pacientes menores, por lo cual se incluyeron en el análisis muestras de pacientes de  $\geq 9$  meses (figura 22).

En este trabajo sólo se cuantificaron los niveles séricos contra antígenos polisacáridos como un apoyo al diagnóstico de SAD pero es importante señalar que para poder confirmar el diagnóstico de SAD, también se tienen que conocer los niveles séricos de inmunoglobulinas totales y subclases de IgG, los cuales deben ser normales.

Para interpretar la capacidad de respuesta a la vacuna neumocócica no conjugada se consideró que una respuesta adecuada es una concentración de anticuerpos  $\geq 1.3\mu\text{g/mL}$  para cada serotipo después de la inmunización, ya que se presume que esta concentración de anticuerpos confiere protección contra la infección y colonización de *S. pneumoniae*<sup>37</sup>. Otro de los criterios utilizados para interpretar la respuesta a antígenos PSC es el de obtener una respuesta postinmunización 4 veces mayor sobre el nivel basal, no obstante altos niveles de anticuerpos previos a la inmunización tienden a disminuir el incremento de la cantidad de anticuerpos postinmunización<sup>20, 37</sup>; teniendo en cuenta esto y con base en nuestras observaciones, para niveles altos de preinmunización se consideró como un indicador de una respuesta inmunológica adecuada un aumento de 2 veces sobre el nivel basal<sup>20</sup>. Además, debido a que la maduración del sistema inmune depende de la edad también se consideró que niños menores de 5 años deben responder a  $\geq 50\%$  de los serotipos analizados y  $\geq 70\%$  cuando son pacientes  $\geq 6$  años.

En las muestras de preinmunización (figura 24) se observa que en general la mayoría de los pacientes tuvieron niveles elevados de anticuerpos contra varios de los serotipos analizados, esto puede deberse a infecciones subclínicas o clínicas previas con *S. pneumoniae*, ya que este microorganismo forma parte de la microflora normal de la nasofaringe (5-40% en adultos y 70-80% en niños)<sup>22, 26</sup> es decir que es muy común en la población, por lo que no

es raro encontrar concentraciones de anticuerpos por encima de los niveles protectores.

En los cuatro grupos se detectaron bajas concentraciones de anticuerpos para el serotipo 3, además en los grupos <2 años y ≥18 años también se detectaron niveles bajos de anticuerpos para el serotipo 4 y en pacientes menores de 5 años para el serotipo 18C, es posible que estos bajos niveles de anticuerpos se deban a que estos serotipos no son frecuentemente aislados de las vías respiratorias en pacientes mexicanos<sup>38</sup>. Con la muestra preinmunización sólo se puede evaluar si se tienen niveles de anticuerpos protectores; para determinar si el organismo es capaz de montar una respuesta inmunológica adecuada es necesario evaluar la muestra sérica después de la administración de la vacuna.

En las 13 muestras postinmunización (figura 25) se observó que para casi todos los serotipos analizados, los pacientes mayores de 5 años alcanzaron los niveles protectores de anticuerpos excepto para el serotipo 3. En el grupo de pacientes de 2 a 5 años sólo el 14% respondió adecuadamente al serotipo 3, el 43% al serotipo 4 y el 29% al serotipo 11A. Sólo en un paciente del grupo 2-5 años se detectaron niveles de anticuerpos protectores para un solo serotipo de los 14 probados y un paciente >5 años sólo respondió a 3 serotipos, por lo cual es probable que estos pacientes tengan la inmunodeficiencia específica de anticuerpos contra antígenos polisacáridos.

El objetivo de esta prueba es poner en evidencia la capacidad de un paciente de montar una respuesta humoral después de haber sido expuesto a antígenos polisacáridos de neumococo, así que las pruebas con una sola determinación tienen un valor limitado. La prueba de preinmunización sólo nos permite establecer si el paciente está o no protegido contra ciertos serotipos, sin embargo debe recordarse que la protección depende de muchos factores, como son: la exposición a los microorganismos, el serotipo neumocócico, el tipo de infección<sup>28</sup>, la integridad del sistema inmune del huésped, infecciones virales concomitantes, etc.<sup>27</sup>, por lo que esta evaluación podría no ser efectiva. En la prueba de postinmunización el porcentaje de pacientes con

concentraciones de anticuerpos por arriba de los niveles protectores es mayor que los observados en las muestras de preinmunización, esto muy probablemente es resultado de la respuesta a la vacuna, pero no se sabe con certeza si hubo un aumento de los anticuerpos o si ya se tenían estos niveles elevados y el sistema inmune no fue estimulado, por ello es recomendable realizar dos determinaciones del mismo paciente y ver los niveles de inmunoglobulinas antes y después del reto antigénico.

De los 48 pacientes a los que se les tomó muestra antes y después de la inmunización, solamente el 6.9% de los pacientes de 2-5 años respondieron a menos del 50% de los PSC analizados y sólo el 46.7% de los pacientes de 6-17 años y un paciente mayor de 18 años respondió a menos del 70% de los PSC analizados, los cuales son indicadores de SAD (tabla 10). El diagnóstico de los pacientes que no respondieron adecuadamente fue de infecciones de las vías respiratorias superiores (IVRS), otitis recurrentes, dermatitis, neumonía y sinusitis.

En nuestra población de estudio el 20.8% resultó ser probable SAD, este porcentaje es mayor al reportado, 5-10% de los pacientes evaluados por presentar infecciones respiratorias recurrentes<sup>17</sup>, esta diferencia puede deberse a que antes el subdiagnóstico de SAD era mayor y a que la Unidad de Investigación de Inmunodeficiencias primarias del INP es un laboratorio de atención especializada en esta deficiencia, entre otras, así que los pacientes que son remitidos a éste son pacientes que muy probablemente tengan esta enfermedad.

Se observó también que los pacientes de un año de edad tuvieron niveles protectores de anticuerpos para el 50% de los polisacáridos analizados después de recibir la vacuna polisacárida no conjugada, por lo que es posible demostrar una respuesta a algunos antígenos neumocócicos en pacientes menores de dos años, aunque no debe descartarse que la respuesta inadecuada a estos antígenos en niños menores de dos años pueda deberse a una maduración incompleta del sistema inmune. También algunos niños menores de 5 años podrían cursar con formas transitorias de la

inmunodeficiencia debido a un retraso en la maduración del sistema inmune, por lo que es importante reevaluarlos cuando son mayores para saber si la deficiencia sigue presente.

Que los pacientes tengan títulos de anticuerpos protectores no garantiza que no puedan enfermarse, ya que esta defensa no depende sólo de la cantidad de inmunoglobulinas sino que también de su correcto funcionamiento. La función de los anticuerpos puede ser evaluada con el ensayo de opsonofagocitosis, no obstante esta prueba es complicada y costosa, por lo que no se realiza comúnmente y también porque uno de los parámetros que han permitido saber si esta prueba es funcional es el de la relación con la clínica del paciente. Según el resultado de la prueba se decide cuál es el mejor tratamiento para cada paciente y al darle seguimiento se ha observado que existe una buena correlación y mejoramiento de la calidad de vida de los mismos.

## 8. CONCLUSIONES

- La concentración óptima de recubrimiento para los PSC 1, 3, 4, 19A y 23F fue de 6 µg/ml, para los PSC 5, 6B, 8, 9V, 19F de 8 µg/ml, para el PSC 18C de 4 µg/ml y 8 µg/ml y para los PSC 6A, 11A y 14 de 10 µg/ml.
- La solución óptima de recubrimiento depende del serotipo neumocócico y del protocolo utilizado.
- El desempeño de la prueba se vio considerablemente disminuido en presencia de azida de sodio al 0.01% y 0.02%, por lo que no es viable usarla como conservador a estas concentraciones.
- En el presente trabajo se encontró que el 20.8% de los pacientes evaluados antes y después de la inmunización con la vacuna polisacárida, resultaron ser casos de probable SAD.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. (23 de diciembre de 2014). Vacuna antineumocócica conjugada para la inmunización infantil, documento de posición de la OMS. Obtenido de: [http://www.who.int/immunization/Pneumococcal\\_conjugate\\_vaccine\\_child\\_SP.pdf](http://www.who.int/immunization/Pneumococcal_conjugate_vaccine_child_SP.pdf)
2. Fox, S. I. (2008). Fisiología humana. En S. I. Fox, *Fisiología humana*. España: Mc Graw Hill.
3. Kind, T.K.; Osborne, B.A.; Goldsby, R.A., (2006) Kuby Immunology. 6ª edición. Freeman, W. H. & Company.
4. Cooper, G. M. (2000). The Cell: A molecular approach. 2ª edición. Sinauer Associates.
5. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., & Pillai, S. (2008) Inmunología celular y molecular. 6ta edición. España: Elsevier.
6. Defrance, T., Taillardet, M., & Genestier, L. (2011). T cell independent B cell memory. *Current opinion in Immunology*, 330 - 336.
7. M. Murphy, K. (2009) Inmunología de Janeway. 7ª edición. España: Mc Graw Hill Interamericana.
8. Peakman, M., & Vergani, D. (2009). Basic and Clinical Immunology. 2da edición. Elsevier.
9. U. Sorensen, R., H, Tammy & E. Leiva, Lilly (2012). "Immunodeficiency" Chapter 8: Selective Antibody Deficiency with Normal Immunoglobulins. USA: Intech
10. M. Roitt, Ivan, et.al. (2008) Inmunología: Fundamentos. 11ª edición. España: Editorial Médica Panamericana.
11. Ferreyra, P. N. (2001). Síndrome de deficiencia de anticuerpos polisacáridos con niveles séricos normales de inmunoglobulinas. *Archivos de alergia e inmunología clínica*, 23(4), 109 - 116.
12. C, R. Érika, E. P. Sara, et. al. (2010) Panorama epidemiológico de las inmunodeficiencias primarias en México. *Revista Alergia México*, 57(5), 159-163.

13. Notarangelo, LD. (2010). Primary Immunodeficiencies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 182-194.
14. McCusker, C. & Warrington, R. (2011) Primary Immunodeficiency. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 1-8.
15. R, H., & W, S. (2008). Antibody deficiency. *Journal of clinical pathology*, 994-1000.
16. Jefferis, R. (1990). Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance. *Clinical & experimental immunology*, 357 - 367.
17. Sorensen, R.U.; LAGID. Grupo Latinoamericano de Inmunodeficiencias Primarias. Clasificación y Manejo de las Deficiencias de Anticuerpos Específicos con Inmunoglobulinas Normales. Obtenida de: <http://www.lagid.lsuhs.edu/sindromes/971-009.htm>
18. Rich, R., Fleisher, T.A., Shearer, W.T., Schroeder, H.W., Frew, A.J., & Weyand, C.M. (2008). *Clinical Immunology. Principles and Practice*. 3ª edición. Elsevier.
19. Norma, F.P. et.al. (2001) Síndrome de deficiencia de anticuerpos antipolisacáridos con niveles séricos normales de inmunoglobulinas. *Archivos de Alergia e Inmunología Clínica*; Volumen 32 No. 4, 109-116.
20. D. Hare, N., J. Smith, B. & K. Ballas, Z. (2008) Antibody response to pneumococcal vaccination as a function of preimmunization titer. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*; Volumen 123 No. 1, 195-200.
21. Laferriere, C. (2011). The immunogenicity of pneumococcal polysaccharides in infants and children: A meta regression. *Vaccine*, 6838 - 6847.
22. Brooks, G., Butel, J., & Morse, S. (2005). Estreptococos. En G. Brooks, J. Butel, & S. Morse, *Microbiología Médica Jawetz, Melnick y Aldeberg* (págs. 227 - 243). Mexico: Manual Moderno.
23. Koneman, E. (2008). Cocos Grampositivos parte II. En E. Koneman, *Koneman Diagnostico Microbiologico Texto y Atlas* (págs. 656 - 660). Buenos Aires: Editorial Panamericana.
24. Murray, P., Rosenthal, K., & Pfauer, M. (2006). Estreptococos. En P. Murray, K. Rosenthal, & M. Pfauer, *Microbiología médica* (págs. 252 - 258). España: Elsevier.

25. Trejo, V. B., R. Mendoza, L. et.al. (2012). Encuesta Nacional de Cobertura de Vacunación (influenza, neumococo y tétanos) en adultos mayores de 60 años en México. *Salud Pública México*; Vol. 54 No.1, México.
26. Rodenburg, G. (2011). Lower immunoglobulin G antibody responses to pneumococcal conjugate vaccination at age of 2 years after previous nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of Pediatrics*, 965 - 970.
27. Balmer, P., Cant, A., & Borrow, R. (2007). Anti-pneumococcal antibody titre measure: what useful information does it yield? *Journal of Clinical Pathology*, 345 - 350.
28. Wernette, C., Frash, C., & colaboradores, D. M. (2003). Enzyme-linked Immunosorbent Assay for quantitation of human antibodies to pneumococcal polysaccharides. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 514 - 519.
29. Garza, R., Camacho, A., & Perea, M. (2011). Cocos Gram positivos y Gram negativos. En R. Garza, *Manual de Bacteriología Experimental* (págs. 10 - 45). Mexico: Facultad de Química.
30. Kolibab, K., Smithson, L., & colaboradores, A. S. (2005). Immune response to pneumococcal polysaccharides 4 and 14 in elderly and young adults. I antibody concentrations, avidity and functional activity. *Immunity & Ageing*.
31. Abdelnour, A. (2008). Vacunación contra Neumococo. *Acta Pediátrica Costarricense*, Volumen 20, No. 8. 77-79.
32. CeNSIA. (20 de Enero de 2015). *Secretaría de Salud*. Obtenido de <http://www.censia.salud.gob.mx/contenidos/vacunas/neumococo.html>
33. Skoog, D. (2008). *Principios de análisis instrumental*. Mexico DF: CENGAGE Learning.
34. Balloch, A., Licciardi, P., Leach, A., & A, N. (2009). Results from an inter-laboratory comparison of pneumococcal serotype-specific IgG measurement and critical parameters that affect assay performance. *Vaccine*, 1333-1340.
35. Sittig, M. (1981). *Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals*.
36. Cuatzami, O. (2004). *Bioquímica de los procesos metabólicos*. Reverte.

37. Paris, K., & Sorensen, R.U. (2007). Assesment and clinical interpretation of polysaccharide antibody responses. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 462 - 464.
38. Ramírez, E.C., Espinosa, S., Espinosa, F., Vargas, M.E., & Blancas, L. (2010). Panorama epidemiológico de las inmunodeficiencias primarias en México. *Revista Alergia México*, 159 – 163.