



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

.. CUAUTITLAN ..

**DETECCION DE ANTIGENO DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE
EN LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO DE ENFERMOS DE MENINGITIS
BACTERIANA POR TECNICA DE ELISA (ENZYME - LINKED
IMMUNOSORBENT ASSAY).**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A
CELIA GOMEZ TELLO

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. CARLOS E. SALAS CONTRERAS

CUAUTITLAN IZCALLI, MEXICO

1981



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I N D I C E

ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	2
ANTECEDENTES.....	3
INTRODUCCION.....	5
OBJETIVOS.....	21
MATERIAL Y METODOS.....	22
RESULTADOS.....	31
DISCUSION.....	47
CONCLUSION.....	51
BIBLIOGRAFIA.....	53

A B R E V I A T U R A S

Solución amortiguadora de fosfatos.....	PBS
Solución amortiguadora de fosfatos	
Tween 20 0.05%.....	PBS Tween
Solución amortiguadora de fosfatos	
Tween 0.05%-albumina bovina 0.5%.....	PBS Tween BSA
"mililitros... ..	-l
"microlitros.....	-ul
Granos.....	-gr
Microgramos.....	-ug
Nanogramos.....	-ng
"minutos.....	-min
Hora.....	-hr.
Verck Sharp & Dohme.....	WSD
Sin Lectura	S. L.
Densidad Optica	D.O.
Centro Médico Nacional	CMN
Secretaria de Salubridad y Asistencia.	SSA
Ensayo de Inmunoadsorbencia Ligado a una Enzima (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	ELISA

R E S U M E N

Con el objeto de contar con un procedimiento adecuado para el diagnóstico etiológico oportuno de meningitis bacteriana, se establecieron las condiciones para identificar y cuantificar el antígeno de Streptococcus pneumoniae en líquido cefalorraquídeo de pacientes con diagnóstico bacteriológico de meningitis por Streptococcus pneumoniae, mediante la técnica de RISA. Así, la cantidad mínima detectable del antígeno polisacárido capsular fue de 9 μ g/ml. Los resultados fueron positivos en todos los casos de meningitis por Streptococcus pneumoniae y negativos en los de diferente etiología. Utilizando microplacas de poliestireno previamente sensibilizadas con antisuero de conejo conteniendo anticuerpo contra 63 serotipos de neumococos, adicionando diferentes diluciones de líquido cefalorraquídeo proclea y un conjugado de fosfatasa alcalina a la fracción de la inmunoglobulina obtenida del antisuero, fue posible revelar el complejo formado conjugado-anticuerpo-antígeno al añadir el sustrato cromogénico que se transforma, por acción enzimática, en producto colorido cuya concentración es proporcional a la cantidad de antígeno presente en el líquido cefalorraquídeo. Estos resultados no indican que con la técnica establecida en este trabajo es posible detectar y cuantificar en líquido cefalorraquídeo pequeñas cantidades de antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae, de un modo rápido y eficaz.

ANTECEDENTES

La meningitis bacteriana es una enfermedad infecciosa del Sistema Nervioso Central que afecta principalmente al encefalo y sus cubiertas. Es una enfermedad infecciosa mortal, causada por diversas bacterias, por lo que el diagnóstico de meningitis bacteriana constituye, una emergencia para evitar el daño permanente ó muerte (1,2,3). Con el advenimiento de los antimicrobianos se ha modificado el curso del pronóstico de la meningitis; reduciendo la mortalidad de 50% a 90%, a menos del 10%. Sin embargo debe recalcar convenientemente que la meningitis bacteriana no diagnosticada y no tratada es tan grave y mortal, en la actualidad, como lo era antes de descubrirse los antibióticos (2).

En nuestro medio los gérmenes que con mayor frecuencia son los causantes de meningitis purulenta son: Streptococcus pneumoniae y Meningococcus influenzae, aunque el grupo de los microorganismos Gram negativos tienen una elevada incidencia principalmente por las malas condiciones higiénicas en las que vive nuestra población (1,2,3).

En México, en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional entre abril de 1963 y diciembre de 1971 se estudiaron 2,213 casos de pacientes con infecciones del Sistema Nervioso Central - de los cuéles, las neurovirosis ocuparon el primer lugar, la meningitis purulenta ocuparon el segundo lugar, el mayor porcentaje de meningitis bacterianas se presentó en el grupo de recién nacidos y lactantes. Los Gram negativos son la causa principal en el recién nacido mientras, que los Gram positivo predominan en lactantes, eg

colares y adultos (1).

Posterior a las observaciones de Griffith, en 1928 (4), relativas a que las células de neumococo de un tipo serológico podían transformarse en células neumocócicas de otro tipo in vivo, Avery, McCleod y McCarty descubrieron que el constituyente químico de las células neumocócicas responsable de la reacción de transformación es su DNA.

Possieck B. y cols. (6) usaron la técnica de Contraimmuno-electroforesis para la detección del antígeno polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*, en líquido cefalorraquídeo y suero ag. Ante esta prueba se detectó hasta 50 ng/ml del antígeno. Posteriormente Harding S. y cols. (7) probaron la técnica de ELISA y - Contraimmuno-electroforesis encontraron que el método de ELISA fue más sensible (1-3 ng/ml) que el de Contraimmuno-electroforesis (25-50 ng/ml). Posteriormente Leisonen M. (8) utilizando las técnicas de Aglutinación en látex, Radioinmunoensayo y Contraimmuno-electroforesis en muestras de exudado de oído medio en pacientes con otitis media, obtuvieron mayor sensibilidad al utilizar Radioinmunoensayo detectando, de 5-10 ng/ml. en menor grado, Contraimmuno-electroforesis detectando de 50-100 ng/ml y con menor sensibilidad, la Aglutinación en látex encontrando de 50-200 ng/ml.

I N T R O D U C C I O N

La puerta de entrada del germen, en orden de importancia, es: respiratoria, digestiva, cutánea, urinaria y traumática. Aunque existen factores predisponentes para que se produzca meningitis -- por Streptococcus pneumoniae, como por ejem. lo infecciones de vías aéreas, otitis media aguda y crónica, sinusitis, neumonías, bronco neumonías y conjuntivitis purulenta.

La invasión del patógeno a Sistema Nervioso Central se lleva a cabo por vía hematógena y/o directa. Por vía hematógena, la meningitis depende de bacteremias, así los organismos que han colonizado la nasofaringe en forma inadvertida ó con pequeños síntomas respiratorias invaden y alcanzan los vasos sanguíneos subyacentes. Esto puede producir la afección directa de los vasos que riegan el Sistema Nervioso Central. La vía directa es cuando la entrada del agente infeccioso es por continuidad, es decir, el patógeno se ingresa directamente en el encéfalo iniciándose de inmediato las reacciones locales de congestión y edema, esto ocurre por extensión -- directa de un seno paranasal ó del oído medio hacia el mastoideo y meninges, también puede ocurrir por complicación tardía de fracturas de cráneo. Este tipo de vía se manifiesta en el 15% de los casos neumocócicos estudiados.(3).

La mucosa respiratoria normal debe poseer gran resistencia natural contra el neumococo, ya que entre el 40% y el 70% de las personas normales son en alguna época de su vida portadoras de neumococos virulentos. Entre los factores que disminuyen esta resisten

cia, y que por lo tanto predisponen a la infección neumocócica, es-
tán las anomalías del aparato respiratorio, alérgias, virosis,
gases irritantes que lesionan las células superficiales ejerciendo
protección a los neumococos por inhibición de la fagocitosis, tam-
bién la intoxicación alcohólica que abate la actividad fagocitaria
deprime el reflejo de la tos y facilita la aspiración de material
extrado, la congestión pulmonar, desnutrición, anemia y la debili-
dad general que son otras afecciones que ayudan a la implantación
del neumococo (1,9).

Dado que este trabajo se refiere a una infección del Sistema -
Nervioso Central causado por Streptococcus pneumoniae creemos con-
veniente hablar específicamente de éste agente causal y de los mé-
todos inmunológicos más usados actualmente para su identificación
en especial los métodos inmunoenzimáticos particularmente, la téc-
nica de ELISA.

El Streptococcus pneumoniae fué aislado por primera vez a -
partir de la saliva humana por Pasteur en Francia y por Sternberg
en Estados Unidos (1881), (5,10). Los neumococos son diplococos -
lanceolados, capsulados, Gram positivos, su cápsula está formada -
por polisacárido que permiten una fácil tipificación con antiseros
específicos. Se observan generalmente en cultivos jóvenes de muer-
tras de esputos, pus, líquidos serosos y tejidos del cuerpo, pue-
den hallarse formando cadenas cortas y en ocasiones como cocos in-
dividuales. Con la edad se vuelven Gram negativos y tienden a li-
sarse espontáneamente éste fenómeno se debe a la acción de enzimas
autolíticas que primero transforman las células a Gram negativas y

posteriormente les causa lisis, el proceso autolítico se ve estimulado por agentes tensioactivos como sales biliares, por ejemplo - el desoxicolato de sodio (2,5,9,10). Los neumococos in vitro forman colonias pequeñas y redondas, orillantes de 0.5 a 1.5 um. de diámetro, presentan Alfa hemólisis en gelosa sangre. El medio más empleado para el crecimiento del Streptococcus pneumoniae es el caldo de carne con sangre. El CO₂ al 10% favorece el crecimiento, favoreciendo la fermentación de la glucosa por lo que hay rápida producción de ácido láctico lo que limita su crecimiento (1,5,9,10). Es habitante normal del aparato respiratorio superior del hombre y puede causar neumonía, sinusitis, otitis y meningitis en individuos de cualquier edad.

La pared de este germen contiene una sustancia hidrocarbonada específica de especie, la sustancia C, éste carbohidrato puede ser precipitado por la proteína C reactiva la cual se encuentra en el suero de algunos pacientes con procesos inflamatorios necrosantes ó neoplásicos. También se encuentra la proteína V que es análoga a la proteína V del Streptococcus pneumoniae. Aunque éstos antígenos no son inmunogénicos como los capsulares (1,5).

Se han diferenciado más de 85 tipos serológicos de neumococos por la existencia de polisacáridos inmunológicamente diferentes - en su cápsula por lo que éste germen se clasifica tomando como base los tipos serológicos capsulares designados originalmente con números romanos (9,10). El material capsular es soluble en agua - por lo que se le denomina "Sustancia Específica Soluble" (SES) - (5,9,10). El espesor de la cápsula se halla en relación directa -

con la velocidad de síntesis de polisacárido debido, a que el material capsular se disuelve en el líquido circundante; por lo que - las cápsulas se arrugan a medida que envejecen los cultivos y se torna más lenta la síntesis. Las estructuras completas de sólo algunos tipos capsulares de los neumococos, son conocidas y las más importantes son los de tipo III, que tienen una cápsula compuesta de unidades repetitivas de ácido celobiurónico unidos por enlaces Beta 1-3. En general la cantidad de material capsular es directamente proporcional al grado de virulencia. Los tipos I, II, III, - V, VII, VIII y XIV son considerados muy virulentos. Los de tipo - III por lo general poseen las cápsulas más grandes y constituyen - los más difíciles de fagocitar por lo que se requiere de opsoninas para facilitar la fagocitosis por los polimorfonucleares (5,9,10).

Con respecto a las toxinas, el ~~Streptococcus pneumoniae~~ en crecimiento libera una hemolisina que es sensible al oxígeno llamada neumolisina que produce hemólisis Alfa en agar sangre, también contiene un polisacárido capsular y la enzima neuraminidasa. Esta última toxina se piensa que es la causante de la toxicidad irreversible y la muerte consecutiva a las infecciones neumocócicas en el hombre. Por otra parte, se sabe que es antigénica y que induce a la producción de anticuerpos neutralizantes. Así mismo, presenta una fibrinolisisina que es activa solamente en conejo (5,9,10,11).

El diagnóstico de meningitis bacteriana debe sospecharse principalmente, en padecimientos agudos febriles que se acompañan de a normalidades neurológicas y debe confirmarse mediante el examen ci toquímico de líquido cefalorraquídeo. El líquido cefalorraquídeo,

en caso de meningitis bacteriana aguda, muestra aspecto turbio, aumenta el número de leucocitos, principalmente polimorfonucleares, disminuye la cantidad de glucosa, aumentan las proteínas y el microorganismo aparece en frotis y cultivo. El diagnóstico se establece principalmente mediante el aislamiento y cultivo del germen patógeno causal, acompañado del estudio morfológico y de pruebas bioquímicas como la prueba de solubilidad en bilis ó la de inhibición del crecimiento por optoquina (1,2,5,9). Anteriormente, el diagnóstico de tipo se hacía por examen directo sobre laminillas - del fenómeno de Quellung (5,9,10).

Métodos inmunológicos para la detección del antígeno capsular de *Streptococcus pneumoniae*.

En la actualidad, es posible detectar infecciones producidas por *Streptococcus pneumoniae* mediante técnicas inmunológicas de las cuáles, se mencionan las más utilizadas e importantes en la clínica.

Técnica de Aglutinación.- Esta técnica es usada para identificación del antígeno polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* en suero, orina, exudados y líquido cefalorraquídeo. La técnica implica adsorber anticuerpo específico a partículas de látex - (anticuerpo contra antígeno polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*) y ponerlas en contacto con el líquido problema siendo positiva ésta prueba cuando se presenta aglutinación de las partículas de látex (5,8,9,10,12,13).

Técnica de Contraelectroforesis.- Es una técnica de diagnóstico rápido (1-2 hrs), específico y sensible para la detec-

ción de ciertas enfermedades infecciosas, en las cuáles se incluye, meningitis bacteriana por Streptococcus pneumoniae (6,14).

Técnica de Radioinmunoensayo.- Es una técnica con un alto -- grado de sensibilidad y especificidad ya que se ha alcanzado a detectar, de 5-10 ng/ml de antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae (8).

Técnica de Inmunofluorescencia.- Es una prueba histoquímica - utilizada en la identificación y localización de antígenos mediante anticuerpos específicos conjugados con compuestos fluorescentes éstos conjugados son muy útiles en la identificación rápida de organismos responsables de enfermedades infecciosas ó para medir los niveles de anticuerpos (5,16).

Como se ha mencionado, existe una gran variedad de métodos utilizados en la detección de antígenos ó anticuerpos en varias - muestras problema, pero todos tienen limitaciones y desventajas, - como por ejemplo: la técnica de Radioinmunoensayo que ha sido el - método de elección por su sensibilidad y especificidad y que sirve para la identificación y cuantificación de partículas de alto y bajo peso molecular (15,16), requiere de material, reactivos y equipo más sofisticado para un laboratorio clínico, además de ser útil cuando se trabaja un gran número de pruebas y las condiciones de - trabajo son muy estrictas. También la técnica de inmunofluorescencia es tediosa y se requiere de más tiempo para el ensayo.

Por los inconvenientes que se han mencionado se han venido desarrollando técnicas inmunoenzimáticas como es el caso de la técnica de ELISA en la cuál el material requerido está disponible, los

reactivos son estables, pudiéndose guardar por tiempo prolongado - sin perder su actividad inmunogénica y enzimática.

Técnicas Inmunoensimáticas.- El ensayo inmunoensimático depende de que un antígeno ó anticuerpo puede ser unido a una enzima - reteniendo sus propiedades de actividad, inmunológica y enzimática respectivamente en el conjugado resultante. Los primeros trabajos en éste campo fueron dirigidos en principio a la observación visual para la localización de antígenos, fueron en 1967 Nakane y Pierce (34) indicaron que el método de acoplamiento de un reactivo a un anticuerpo es factible, tal es el caso de la Inmuno fluorescencia. El primer ensayo inmunoensimático fué por Sternberg y cols. (1970). Ellos estimaron los resultados visualmente de manera análoga a la Inmuno fluorescencia, la ventaja es que el ensayo inmunoensimático resulta un color que puede ser observado sin el uso de un aparato en especial. Los siguientes pasos en el desarrollo del ensayo inmunoensimático, fueron unidos el antígeno ó anticuerpo se unió a una fase sólida en la cuál la reactividad de los componentes inmunológicos son retenidos. Estas fueron las bases para la técnica de ELISA ó Análisis Inmunoadsorbente unido a una enzima, - cuyos pioneros fueron Engvall y Perlmann en 1971-1972 (17).

Técnica de ELISA.- Técnica de Ensayo de Inmunoadsorbencia ligado a una Enzima, ésta técnica se ha usado extensamente para la detección de hormonas (13) tales como insulina, cortisol, y progesterona entre otras, también ha sido usada para medir el antígeno - carcinoembrionario (CEA), siendo Engvall y Perlmann los que han desarrollado anticuerpos, para este antígeno, por ésta técnica (17).

Esta metodología es única en el diagnóstico de enfermedades tanto no infecciosas como infecciosas y es aquí donde tiene mayor aplicación. Como en el caso de antígenos de *Brucella* (16), en la detección del antígeno polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* (7), en la detección de antígenos de *Haemophilus influenzae* - tipo b (19) y enfermedades parasitarias (19), ampliándose cada vez más su uso.

Aspectos metodológicos.- La prueba de ELISA puede ser competitiva, indirecta y de doble anticuerpo ó sandwich.

El método competitivo es usado en la detección y semicuantificación de antígenos; el anticuerpo específico es adsorbido a la fase sólida, se adiciona la muestra a probar, que supuestamente contiene el antígeno y posteriormente el antígeno ligado a una enzima se incuba para permitir la reacción antígeno anticuerpo. Al adicionar el sustrato de la enzima los pozos que solamente contienen la enzima ligada al antígeno muestran coloración, debido a que la inhibición del cambio de color en los pozos con muestras a probar es proporcional a la cantidad del antígeno presente en la muestra, éste método competitivo se muestra en la figura 1 (16).

El método indirecto se puede usar en la detección y semicuantificación de anticuerpos. El antígeno específico es adsorbido a la fase sólida. Así se adiciona el suero a probar y a varias diluciones, se incuba y se lava, se agrega una enzima unida a una antioglobulina y se deja reaccionar, en seguida la placa es lavada y el sustrato de la enzima es adicionado, se hace observación visual del color producido. La degradación del sustrato tiene por

resultado un cambio de color. La cantidad y velocidad del cambio de color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos en el suero probado. Este método se muestra en la figura 2 (16).

El método de doble anticuerpo ó sandwich se detectan antígenos. El anticuerpo específico purificado es adsorbido a la fase sólida (diluyéndolo en solución alcalina). Se adiciona la solución a probar que se piensa contiene el antígeno, se incuba y se lava. Bajo estas condiciones, se adiciona un complejo enzima-anticuerpo (anti-antígeno), posteriormente se agrega el sustrato de la enzima, el cambio de color es proporcional a la cantidad de antígeno en solución problema. El procedimiento a seguir como se muestra en la figura 3 (16).

Respecto a la fase sólida usada hay una gran variedad de sustratos que se han usado como son celulosa, polisilicatos, varios tipos de plásticos y tucos de poliestireno. El uso de microplacas son sin duda, más convenientes para la realización de un gran número de pruebas, además de que se requieren pequeños volúmenes de reactivos y muestras.

Las placas de poliestireno de fórmula especial son mejores para la adsorción de múltiples antígenos proteicos ó lipoproteicos. La sensibilización se lleva a cabo por adsorción pasiva en solución alcalina. Las placas de cloruro de polivinil son útiles para adherir, en forma azilar, con anticuerpo en el sistema de doble anticuerpo ó sandwich. Deben guardarse las condiciones óptimas de concentración del reactivo, tiempo de incubación, temperatura y pH

FIGURA 1 METODO COMPETITIVO DE ELISA PARA
ENSAYO DE ANTIGENOS.

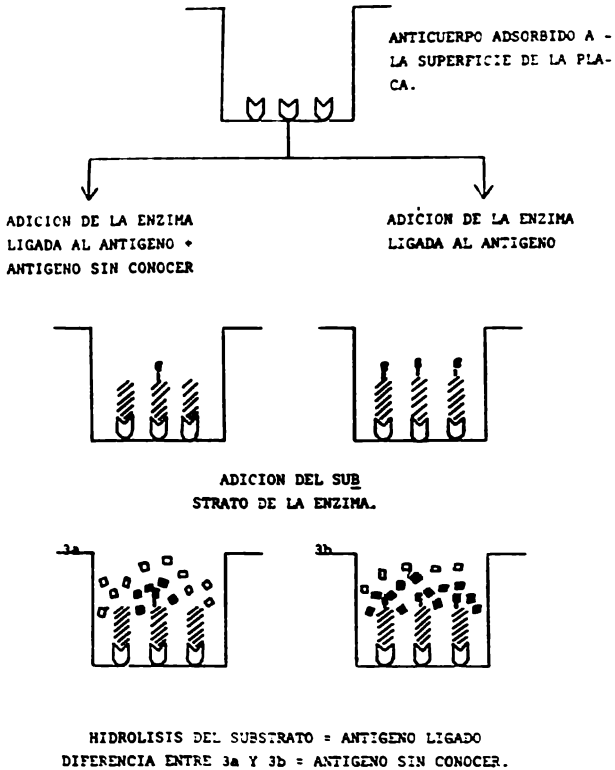
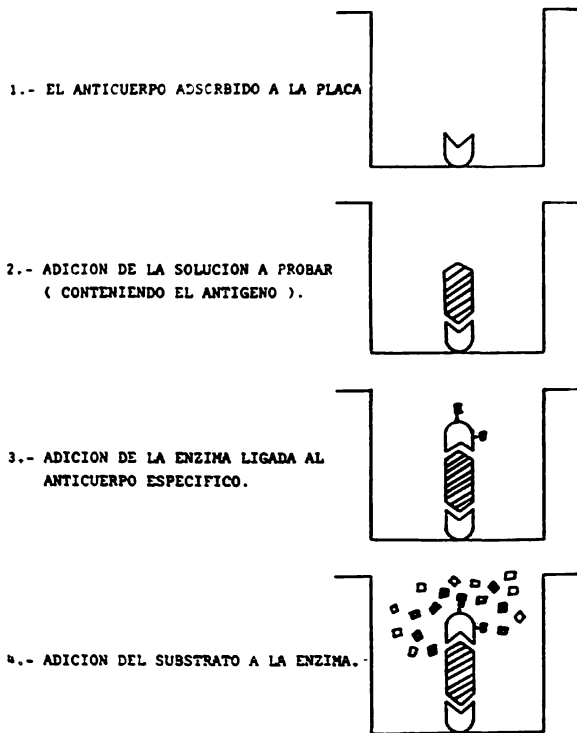


FIGURA 2 METODO INDIRECTO DE ELISA PARA
MEDIR ANTICUERPO.



LA HIDROLISIS ES DIRECTAMENTE PROPORCIONAL A LA
CANTIDAD DEL ANTICUERPO PRESENTE

FIGURA 3 METODO DE DOBLE ANTICUERPO O SANDWICH DE ELISA PARA MEDIR ANTIGENO.



CANTIDAD DE HIDROLISIS = CANTIDAD DE ANTIGENO
PRESENTE.

para una buena reacción bajo las características necesarias del sistema. En la sensibilización con proteínas se usan concentraciones de 1-10 ug/ml de proteína en solución amortiguadora de carbonato y el tiempo de adsorción es de 2 a 4 horas a 4°C (15,16).

Las muestras deberán diluirse en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 conteniendo un agente humectante como el Tween 20 en concentración de 0.05%, para prevenir la adsorción inespecífica a la fase sólida. En algunos casos es necesario incluir una proteína adicional como por ejemplo la albúmina para reducir el fondo inespecífico ó adsorción de partículas inespecíficas.

El conjugado usado en éste ensayo incluye un gran número de enzimas que se han investigado por su utilidad, estabilidad, alta reactividad y disponibilidad, tomando en cuenta que el sustrato requerido para la reacción cubra las mismas cualidades. Algunas enzimas que llenan éstos requisitos y más comúnmente usadas son: peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y Beta galactooxidasa (16,21). Las enzimas pueden ser unidas a anticuerpos ó a antígenos por medio de un agente ligante, uno de los más usados es el glutaraldehído.

Avrameas (21) describe dos métodos para unir enzimas a anticuerpos ó a anticuerpos y son referidos como: método en un paso y método en dos pasos. El método conocido como de un paso, es de alto rendimiento de conjugado y fácil de llevarlo a cabo. Consiste en mezclar la enzima que puede ser fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y peroxidasa entre otras, el anticuerpo y el agente ligante, se

mezclan y posteriormente se dializa. El método de dos pasos es usado para la reacción con peroxidasa, éste tiene la ventaja de producir conjugados homogéneos a razón de una enzima por molécula de anticuerpo ó antígeno. Estos conjugados tienen actividad 10 veces mayor que la de preparados por un paso. Consiste en que la enzima, (antígeno ó anticuerpo) son tratados primero con el agente ligante y entonces el antígeno, anticuerpo ó enzima es adicionada. Alternativamente la enzima es tratada con un exceso de agente ligante removiendo el exceso y finalmente se prueba la actividad del conjugado.

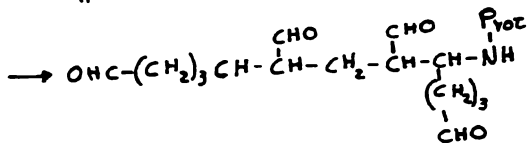
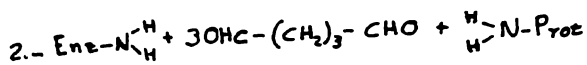
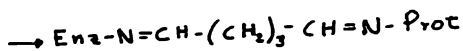
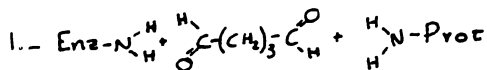
El procedimiento para formar el conjugado por el método en un paso usando el glutaraldehído es el siguiente: se sabe que el glutaraldehído reacciona irreversiblemente uniéndose al grupo ϵ -amino de lisina presente en las proteínas y formando una unión entre ellas, el mecanismo de ésta reacción aún no ha sido establecido, aunque hay dos posibilidades para que el glutaraldehído ligue la enzima al anticuerpo (15,21). Estos dos posibles mecanismos son mostrados en la figura 4.

La fosfatasa alcalina conjugada a la inmunoglobulina es estable a 4°C durante seis meses, aproximadamente, adicionada de un preservativo como lo es la asida de sodio, sin deterioro de su actividad (2), razón por la cuál es preferida por diversos investigadores.

Con respecto a los sustratos de la enzima es importante que sean estables, altamente reactivos y que estén disponibles.

El tiempo necesario para que el sustrato reaccione con el

FIGURA 4.- Dos posibles mecanismos de reacción para la formación del conjugado glutaraldehído-enzima.



conjugado es de 20 a 30 min. y no más de 1 hr. Cuando el sustrato reacciona rápidamente, el tiempo ó la temperatura de incubación de dicho sustrato será menor. De aquí que, el tiempo y la temperatura de incubación dependerá de la reactividad del sustrato. La reacción del sustrato se suspende por la adición de un ácido ó un alcalí fuerte.

El conjugado de fosfatasa alcalina tiene como sustrato el p-nitrofenil fosfato, éste es conveniente ya que posee las propiedades antes mencionadas; además le que se adquiere en forma de tabletas, las cuáles pueden ser guardadas a 4°C por largo tiempo sin perder sus propiedades. La actividad de la enzima con dicho sustrato es alta y da un producto amarillo que es estable por mucho tiempo (15, 21).

O B J E T I V O

Debido a que los métodos enzimáticos proveen una gran ayuda en el diagnóstico rápido y oportuno, de enfermedades infecciosas, en el laboratorio clínico y tomando en cuenta la estabilidad de los reactivos utilizados, planteamos los siguientes objetivos para detectar por el método de ELISA, antígenos de Streptococcus pneumoniae en líquido cefalorraquídeo de humanos.

I.- Búsqueda y obtención de las condiciones óptimas para estandarizar la técnica de ELISA en la detección del antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae en líquido cefalorraquídeo de pacientes con diferentes padecimientos del Sistema Nervioso Central.

II.- Mediante esta técnica, buscar un método práctico y rápido para valorar la concentración del antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae en líquido cefalorraquídeo.

III.- Evaluar la especificidad del método aplicando ésta técnica a líquidos cefalorraquídeos de pacientes con meningitis bacteriana cuya etiología es Streptococcus pneumoniae y de pacientes con meningitis de diferente etiología.

MATERIAL Y METODOS

Líquidos Cefalorraquídeos.- Se obtuvieron líquidos cefalorraquídeos de 25 pacientes con diferentes padecimientos del Sistema Nervioso Central, éstos líquidos fueron obtenidos del Hospital de Pediatría del CMN y del Hospital Infantil de México de la SSA. De los líquidos obtenidos se tomó una muestra para cultivo y diagnóstico bacteriológico del agente infeccioso, el resto se guardó en alícuotas de 0.5 a 3 ml. a 4°C para ensayos de la técnica de ELISA.

Soluciones Amortiguadoras.- En todos los experimentos se usó una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4 como stock, la cual contiene NaCl 1.36 M, KCl 0.026 M, Na_2HPO_4 0.015 M. De ésta solución se partió para preparar la solución amortiguadora de fosfatos Tween 20 al 0.05% más albúmina bovina al 0.5% conteniendo solución stock de fosfatos al 10% (10 ml), Tween 20 0.05% (0.05g) y albúmina bovina al 0.5% (0.5 g).

Obtención y preparación de antisueros.- Para el desarrollo del presente trabajo, se requirió de antisuero contra el antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae para preparar el conjugado y sensibilización de las microplacas. Los antisueros de conejo específicos para los 83 antígenos polisacáridos capsulares de Streptococcus pneumoniae, denominados comercialmente Bacto-Pneumococcus antisera set fueron obtenidos de los laboratorios MFCO (Detroit Michigan, USA).

Para la preparación de antisueros específicos el contenido de seis frascos del antisuero se diluyeron en 6 ml. de PBS pH 7.4 se agregaron 6 ml de Na_2SO_4 al 36% se agitó durante 30 min. temperatura ambiente sin dejarlo calentar, se centrifugó durante 5 min. a 3 000 xg en centrífuga de alta velocidad (RC-Super speed Refrigerated Centrifuge Sorvall). El precipitado obtenido, se lavó con Na_2SO_4 al 18% y el precipitado se disolvió en 5 ml de PBS pH 7.4 y se agregó una cantidad igual de Na_2SO_4 al 24%, se agitó y se centrifugó a 3 000 xg por 10 min. El precipitado se lavó con Na_2SO_4 al 12% y se disolvió en 1 ml de PBS pH 7.4, se dializó a 4°C toda una noche contra PBS pH 7.4.

Determinación de proteínas.- Las proteínas del antisuero fueron determinadas por el método de Folin modificado (22). Este método consiste en preparar una solución stock de albúmina bovina - fracción V (8 mg/ml). Una alícuota de ésta solución se diluyó 50 veces para obtener una solución de 160 ug/ml. La concentración correcta se determinó por la lectura de ésta solución en un espectrofotómetro (SP 8-100 PYE UVICAM) a 280 nm y multiplicando por el coeficiente de extinción de la albúmina bovina (1.515 ug/ml). Las muestras problema se diluyeron 10 veces.

Se prepararon las siguientes soluciones: Folin A: Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N, Folin B₁: CuSO_4 al 0.01%, Folin B₂: tartrato de potasio al 0.02%. Estas soluciones nos dan el reactivo colorante de Folin que se obtuvo al mezclar 49 ml. de Folin A, 0.5 ml de Folin B₁ y 0.5 ml de Folin B₂. El reactivo de Folin-fenol se usó al 50% en agua destilada. El procedimiento es el siguiente: en va

rios tubos de ensayo de 15 X 125 se adicionaron cantidades aumentadas de albúmina bovina diluida 1:50 y se llevó con H₂O a un volumen de 1 ml., a cada tubo se le adicionó 5 ml. de reactivo colorante, se agitaron y se dejaron reposar a temperatura ambiente 15 min se agregó a cada tubo 1 ml. del reactivo de Polin-fenol al 50 %. Se incubó a 50°C por 10 min. y se dejó enfriar a temperatura ambiente. El antisuero de conejo se diluyó 1:10 (muestra problema) y se trajo en las mismas condiciones experimentales que las soluciones para la curva estandar. Se trazó una curva de concentración de proteína contra D.O. de los problemas (antisuero de conejo contra los 83 tipos de antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae) se extrapó en dicha gráfica (fig.5) para determinar las concentraciones de proteína.

Obtención y preparación del Conjugado.- Al conjugado anticuerpo de conejo contra los 83 tipos de antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae unido a la enzima fosfatasa alcalina, se le determinó su actividad para poder realizar la técnica de ELISA doble anticuerpo ó sandwich y así, probar su sensibilidad y especificidad como se describe a continuación:

1.- Preparación del Conjugado.- El procedimiento que se siguió fué según la técnica de Avrameas llamada de "un paso glutaral denido" (19,20,22), en donde el antisuero se conjugó con fosfatasa alcalina (obtenida de los laboratorios SIGMA, Chemical Company), contenida en frascos de 5 mg/ml de una enzima precipitada con (NH₄)₂SO₄, por lo que fué necesario dializarla primeramente contra PBS pH 7.4 y mezclarla con 2 ug. de anticuerpo de conejo contra

los 8 tipos de antígeno capsular de Streptococcus pneumoniae, obtenido como se mencionó anteriormente. El glutaraldehído fué adicionado en cantidad suficiente para obtener una concentración final de 0.2% de glutaraldehído, éste complejo se mezcló durante 2-hrs. a temperatura ambiente, se dializó contra P&S pH 7.4 a 4°C durante toda la noche el conjugado resultante fué llevado a un volumen final de 4 ml. con solución T&S pH 8 conteniendo 1% de albúmina bovina y 0.02% de asida de sodio. El conjugado resultante se guardó a 4°C permaneciendo estable por más de seis meses.

2.- Cuantificación del antígeno polisacárido capsular contenido en la vacuna PULMOVAX MSU.- Se usó como antígeno la vacuna antineumocócica polisacárida polivalente, ésta vacuna inactivada "PULMOVAX" (obtenida de los laboratorios Merck Sharp & Dohme) contiene 14 tipos de antígenos polisacáridos capsulares de Streptococcus pneumoniae tipo I, II, III, IV, VIII, IX, XII, XIII, XIII, XXIV, LI, LVI, en solución isotónica de cloruro de sodio con 0.25% de fenol, éstos polisacáridos fueron cuantificados con el método de Daboia (32), ácido sulfúrico-fenol que a continuación se describe: se preparó una curva de calibración usando una solución estándar de polisacárido, preparando una solución stock conteniendo 200 ug de polisacárido Dextrán por ml. Se pipeteó, por duplicado, diferentes cantidades variando de 20 ug a 100 ug por ml en diferentes tubos, el volumen se ajustó a 500 ml. con agua destilada, las soluciones se trataron de la misma manera que el problema (500 ml) como sigue: en varios tubos de 15x125 se adicionaron cantidades aumentadas de solución stock de Dextrane (200 ug/ml) y se llevó

con agua destilada a 500 ul, agregando 5 ul. de fenol al 5% a cada tubo, posteriormente ácido sulfúrico concentrado 2.5 ul a cada tubo y se dejaron reposar 60 min. a temperatura ambiente. Se leyó a U.O. de 490 nm de cada solución y problema. Se hizo una curva de concentración de polisacárido contra U.O. a 490 nm y la lectura obtenida del problema se extrapoló en la gráfica obtenida. La concentración obtenida en la gráfica es la concentración del antígeno polisacárido capsular que hay en la vacuna PULOVAX VSJ.

3.- Determinación de la actividad del Conjugado.- La actividad del conjugado (anticuerpo de conejo contra los 83 tipos de antígeno polisacárido capsular de ~~*Streptococcus pneumoniae*~~ unido a la enzima fosfatasa alcalina) se determinó en microplacas de poliestireno (Cooke Laboratory Products a Division of Dynatech Laboratories Incorporated) que contenían 96 pozos con fondo en forma de "U" y con capacidad de 0.3 ml cada pozo. Las placas fueron previamente sensibilizadas con antígeno polisacárido capsular de ~~*Streptococcus pneumoniae*~~ (PULOVAX VSJ) usando 1 ml de la vacuna a la cual se le agregó 1 ml de solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M pH 9.6 y a cada pozo se le adicionó 100 ul de solución de antígeno a una concentración final de 3 ug por pozo. Las placas se dejaron inocular por 2 hrs. a temperatura ambiente y después a 4°C toda la noche. Posteriormente se lavaron las placas con PBS Tween 20 0.05%, el conjugado se diluyó 1:12.5 y de ésta concentración se hicieron diluciones dobles sobre los mismos pozos quedando las diluciones finales del conjugado como sigue: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800. Los controles que se hicieron para medir la

actividad del conjugado fueron pozos donde había: a) antígeno más P+S Tween 20 BSA, b) conjugado solamente, c) P+S Tween 20 BSA solamente. Las placas se incubaron durante 1 hr. a 37°C, en ambiente húmedo. El sustrato utilizado se preparó con 5 ug de p-nitrofenil fosfato (laboratorios SIGMA) en 5 ml de solución amortiguadora de dietanolamina al 10% pH 9.8 (dietanolamina 97%, NaH₂PO₄ 0.02%, MgCl₂ 0.01%), bajo éstas condiciones el sustrato se adicionó a todos los pozos a razón de 100 ul por pozo. Las placas fueron incubadas a 37°C en ambiente húmedo durante 30 min. La reacción se detuvo por la adición de 50 ul de NaOH 3 N. Los resultados se observaron visualmente y la dilución mayor donde hubo mayor coloración fué la que se usó para hacer las siguientes pruebas.

Técnica de ELISA. - Primeramente se obtuvo la concentración de anticuerpo necesaria para sensibilizar las microplacas y posteriormente se evaluó dicha técnica de acuerdo a la sensibilidad y especificidad resultante.

1.- Obtención de la concentración óptima de anticuerpo pegado a las placas para la técnica de ELISA.- Con el objeto de saber qué concentración de anticuerpo era necesario pegar a los pozos para que las pruebas de ELISA dieran buenos resultados, las placas se sensibilizaron con diferentes cantidades de anticuerpo contra el antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae a concentraciones de 1 ug, 5 ug, 10 ug, 50 ug, 100 ug y se dejó incubar 2 hrs. a temperatura ambiente, y a 4°C toda la noche. Se lavaron las microplacas tres veces con P+S Tween 20. Posteriormente se le agregaron a todos los pozos 3 ug del antígeno (PUL⁺QVAX 43u) por

pozo y se incubaron 2 hrs. a 37°C. A cada pozo se le adicionó 100 ul del conjugado (anticuerpo contra los 83 tipos de antígenos-polisacáridos capsulares de Streptococcus pneumoniae ligado a fosfatasa alcalina), se dejó incubar a 37°C durante 1 hr y se lavó tres veces con PBS Tween 20. El sustrato preparado con 5 ug de p-nitrofenil fosfato (lap. SIGMA) en 5 ul de solución amortiguadora de dietanolamina al 10% pH 9.8, fúe adicionado a cada pozo. Se incubaron las microplacas 30 min. a 37°C deteniendo la reacción por adición de 50 ul de NaOH 3 N. Los resultados se determinaron visualmente tomando en cuenta la cantidad de anticuerpo que pegado a la placa dió una coloración.

2.- Curva estándar de concentración del antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae por la técnica de ELISA.- Las microplacas se sensibilizaron con anticuerpo contra el antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae y solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M pH 9.6 adicionando a cada pozo 10 ug de anticuerpo. Las placas se incubaron 2 hrs. a temperatura ambiente y después a 4°C toda la noche. Se hicieron tres lavados con PBS Tween 20, posteriormente se agregaron diferentes concentraciones de antígeno (PULMOVAX MSD) en cada pozo como se indicó anteriormente. Los controles fueron pozos conteniendo anticuerpo, pero no el antígeno, y se procedió a trabajar de la misma forma que los pozos conteniendo el antígeno. Se incubaron las microplacas 2 hrs. en ambiente húmedo a 37°C, se lavaron tres veces con PBS Tween 20 y se agregó a cada pozo 100 ul del conjugado diluido 1:50, se incubó durante 1 hr. a 37°C y ambiente húmedo. Se lava-

ron las microplacas tres veces con PBS Tween 20, se le adicionó 100 ul del sustrato p-nitrofenil fosfato, preparado con anterioridad con solución amortiguadora de dietanolamina 1% p/ 9.8. Se incubó 30 min. a 37°C y en ambiente húmedo. La reacción fue detenida por adición de 50 ul de NaOH 3 N. El contenido de cada pozo se diluyó 10 veces y se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro a 400 m μ . Se hizo una curva graficando D.O. obtenida de los pozos contra concentración de antígeno, usando como blanco, el contenido de los pozos de control negativo.

3.- Técnica de ELISA aplicada a líquidos cefalorraquídeos de pacientes con padecimientos del Sistema Nervioso Central.- Las microplacas fueron sensibilizadas con 10 ug de anticuerpo por cada pozo, bajo las mismas condiciones descritas en la curva standard. Las cantidades usadas de líquido cefalorraquídeo problema fueron de 100 ul de líquido sin diluir en el primer pozo de cada hilera, en los siguientes pozos se hicieron diluciones dobles de cada líquido teniendo así 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32. Se usó como control negativo un líquido cefalorraquídeo de un paciente con absceso cerebral el cual se trabajó igual que los otros líquidos. Las placas se lavaron tres veces con PBS Tween 20. A cada pozo se le adicionó 100 ul del conjugado (anticuerpo contra antígeno poliacrílico capsular de Streptococcus pneumoniae unido a fosfatasa alcalina) diluido 1:50, se dejó incubar 1 hr. a 37°C y ambiente húmedo, se lavaron las microplacas y se adicionó a cada pozo 100ul del sustrato preparado con p-nitrofenil fosfato en dietanolamina, se incubó y se procesó como ha sido mencionado anteriormente.

El contenido de cada pozo se diluyó diez veces con agua destilada y se leyó la absorbancia a 400 nm en el espectrofotómetro. Para determinar la concentración la lectura se extrapoló, en la curva estándar del antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae.

R E S U L T A D O S

Obtención de Antisueros. - Con el objeto de preparar el conjugado (anticuerpo-enzima) y para sensibilizar las microplacas se obtuvo un antisuero de conejo contra los 83 tipos de antígenos polisacáridos capsulares de Streptococcus pneumoniae.

La lectura de la solución de albúmina bovina diluida 1:50 - fué 0.119 que multiplicado por el coeficiente de extinción de albúmina ovina (1.515 ug/ml) da una concentración de 180 ug/ml:

$$\begin{aligned} 0.119 \times 1.515 &= 0.180 \text{ ng/ml} \\ &= 180 \text{ ug/ml de albúmina bovina} \\ &\text{diluida 1:50} \end{aligned}$$

Se tomaron diferentes alícuotas de ésta solución y la muestra problema se diluyó 10 veces tratándose de acuerdo a la técnica de Polin (22) descrita en material y métodos, los resultados se muestran en la tabla 1. Con éstas lecturas se hizo una curva estándar de concentración contra D.O. a 700 nm que se muestra en la figura 5. Con dicha curva se pudo conocer la concentración de la muestra problema, ya que ésta curva cumple la ley de Lambert y Beer se extrapola la D.O. obtenida de la muestra problema (0.270) obteniéndose en la curva una concentración de 135 ug/ml que multiplicado por el factor de dilución (10), se obtiene la cantidad de -- 1.35 ng/ml de proteína contenida en el antisuero de conejo contra los 83 tipos de antígenos capsulares de Streptococcus pneumoniae.

Tubo No.	al de Albumina dil. 1:50	I ₂ O ml	^a R. C. ml	^b M. P. ml	Conc. ug/ml	D.O. 700 mμ
1	0.0	1	5	1	--	0.0
1'	0.0	1	5	1	--	0.0
2	0.2	0.8	5	1	36	0.074
2'	0.2	0.8	5	1	36	0.078
3	0.4	0.6	5	1	72	0.141
3'	0.4	0.6	5	1	72	0.143
4	0.6	0.4	5	1	108	0.215
4'	0.6	0.4	5	1	108	0.215
5	0.8	0.2	5	1	144	0.276
5'	0.8	0.2	5	1	144	0.278
^c P ₁	-	-	5	1	135	0.270
P ₂	-	-	5	1	135	0.270

^aReactivo colorante de Polin

^bReactivo de Polin Fenol

^cTubos conteniendo la muestra problema (anticuerpo de conejo contra los 83 tipos de antígenos poli-acérido capsular - de Streptococcus pneumoniae) diluido 1:10

FIGURA I.- Curva estándar para cuantificación de proteína, - contenida en el antisuero de conejo contra los 83 tipos de antígenos capsulares de Streptococcus pneumoniae.

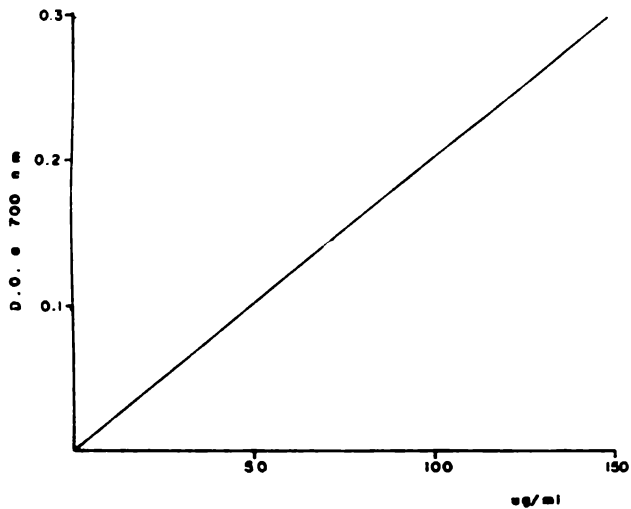


FIGURA 5.- Curva estándar para cuantificación de proteínas contenidas en el antisero de conejo contra los 63 tipos de antígenos polisacárido de *Streptococcus pneumoniae*.

Obtención del Conjugado.- El conjugado (anticuerpo de conejo contra los 85 tipos de antígenos polisacáridos capsulares de Streptococcus pneumoniae unido a la enzima fosfatasa alcalina), se preparó de acuerdo a la técnica de Avrameas de "un paso glutaraldehído" (19,20,22). Para realizar la técnica de ELISA primeramente se probó la actividad del conjugado, por lo que fué necesario cuantificar el antígeno polisacárido capsular del neumococo contenido en la vacuna PULMONAX MSD con el fin de sensibilizar las microplacas con la concentración óptima de antígeno. Posteriormente se realizó la técnica de ELISA, bajo las condiciones encontradas.

La cuantificación de dicho antígeno capsular se realizó de acuerdo a la técnica de Dubois. Las condiciones de trabajo y resultados se muestran en la tabla II, con dichos resultados se trazó una curva de concentración del antígeno polisacárido contra la D.O. a 490 nm que se muestra en la fig. 6.

La lectura obtenida en la muestra problema fué de 0.62 que extrapolando en la curva de la fig. 6 dió una concentración de 30 ug/500ul de antígeno polisacárido capsular del Streptococcus pneumoniae. Cada frasco ampula de vacuna PULMONAX MSD contiene 500 ul por lo que en cada frasco ampula se tienen 30 ug del antígeno polisacárido capsular del neumococo.

Determinación de la actividad del conjugado.- Para saber si el conjugado preparado tenía actividad y saber la dilución adecuada para que se realizara la técnica de ELISA se realizó la prueba con diferentes diluciones del conjugado como ha sido mencionado en

Tubo no.	Dextrans 200 ug/ml	I ₂ O ml	^a Conc. ug/500ml	Fenol 5%	H ₂ SO ₄ ml	D.O. 400 nm
1	0.1 ml	0.4	20	0.5	2.5	0.494
1'	0.1 ml	0.4	20	0.5	2.5	0.48
2	0.2 ml	0.3	40	0.5	2.5	0.84
2'	0.2 ml	0.3	40	0.5	2.5	0.85
3	0.3 ml	0.2	60	0.5	2.5	1.4
3'	0.3 ml	0.2	60	0.5	2.5	1.3
4	0.4 ml	0.1	80	0.5	2.5	1.8
4'	0.4 ml	0.1	80	0.5	2.5	1.8
5	0.5 ml	0.0	100	0.5	2.5	2.15
5'	0.5 ml	0.0	100	0.5	2.5	2.15
Boo.	-	0.5	-	0.5	2.5	0.00
b _p	-	-	-	0.5	2.5	0.62
P'	-	-	-	0.5	2.5	0.62

^aConcentración de la dilución de Dextrans

^bNuestra problema

TABLE II.- Curva estandar de concentración del polisacárido dextrán con el método de Dabois.

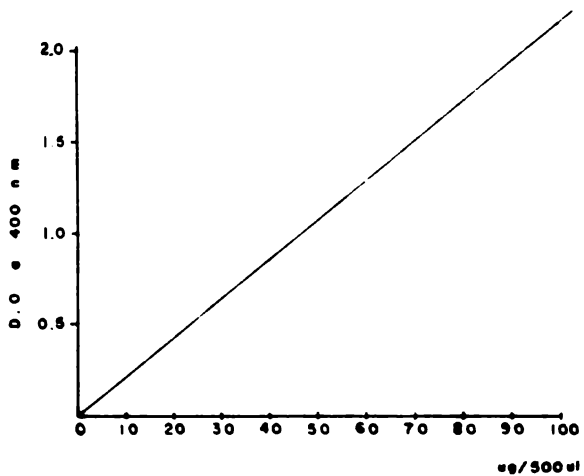


FIGURA 6.- Curva estándar para la cuantificación del penicilínico en suero PULMOVAX MSD

en material y métodos pág.25. Los resultados se evaluaron visualmente por el cuadro de coloración en todos los pozos. La dilución 1:50 fué la que mostró una coloración adecuada (con mayor intensidad) por lo que se tomó en cuenta para realizar las técnicas de ELISA, a mayores diluciones la intensidad de la coloración fué -- muy tenue.

Obtención de la concentración óptima de anticuerpo pegado a microplacas para realizar la técnica de ELISA doble anticuerpo sandwich.- Para conocer la concentración del anticuerpo que se necesita para sensibilizar las microplacas y poder desarrollar la técnica de ELISA, fué necesario obtener las condiciones adecuadas y así bajo dichas condiciones realizarlas. Se sensibilizaron las microplacas con diferentes concentraciones de anticuerpo en cada pozo como ha sido mencionado en material y métodos pág. 26. La dilución del conjugado marcado fué de 1:50 como ha sido mencionado, los pozos que tuvieron mayor coloración fueron los que se sensibilizaron con 10 ug, 50 ug. en 100 ul, tomando en cuenta la dilución de 10 ug/100 ul para sensibilizar las microplacas.

Curva estandar de la concentración de antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae (vacuna PULMUNAX MSB) por la técnica de ELISA.- Con el fin de evaluar la sensibilidad de la prueba de ELISA para determinar al antígeno capsular del Streptococcus pneumoniae y de determinar la cantidad de antígeno que se encuentra en los líquidos cefalorraquídeos de pacientes con meningitis bacteriana por Streptococcus pneumoniae se realizó la técnica de ELISA con diluciones dobles del antígeno capsular (vacuna --

PIJMOVAX M30), como ha sido mencionado en material y métodos. -- Los resultados obtenidos bajo dichas condiciones se encuentran en la tabla III. Con dichas lecturas y concentraciones se trazó una curva estándar de concentración del antígeno contra la D. O. . - obtenida, la curva así obtenida se muestra en la gráfica de la figura 7. Estos resultados nos indican que la cantidad de antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae que se alcanzó a detectar fué de 9 ng/ml y a cantidades mayores de 500 ng/ml la D.O. tiende a ser similar en todas las concentraciones de antígeno siguientes. A partir del punto B los resultados tienden a ser horizontales como se hace notar en la misma figura 7. Así del punto A al punto B, los resultados dan una máxima confiabilidad, por lo que fué en ésta zona donde se extrapoló.

Técnica de ELISA aplicada a líquidos cefalorraquídeos de pacientes con padecimientos del Sistema Nervioso Central.- Para evaluar la sensibilidad y especificidad de la técnica de ELISA, ésta se hizo a líquidos cefalorraquídeos de 25 pacientes con padecimientos del Sistema Nervioso Central. Los resultados obtenidos y léidos a 400 nm, son mostrados en la tabla IV. De los 25 líquidos cefalorraquídeos procesados seis fueron positivos lo cual concuerda con los resultados del cultivo, ya que se logró el aislamiento de Streptococcus pneumoniae. De éstos seis líquidos, tres de ellos fueron positivos hasta dilución 1:32, cuatro hasta dilución 1:16, cinco hasta dilución 1:8 y los seis fueron positivos a dilución 1:4, éstos resultados son mostrados en la tabla IV. En éstos resultados obtenidos se hace ver que la técnica de ELISA ha detecta-

^a Antígeno ng/ml	U. O. 400 nm
0.28	0.01
0.57	0.04
1.14	0.2
2.28	0.3
4.5	0.4
9	0.4
18	0.55
36	0.7
73	0.89
146	1.0
290	1.14
580	1.26
1170	1.39
2340	1.4
4680	1.4
9300	1.44

^a Antígeno polisacárido de Streptococcus pneumoniae, vacuna PU-UVAX PSD.

Tabla III.- Se muestran los resultados obtenidos al realizar la técnica de ELISA doble anticuerpo ó sandwich con diferentes concentraciones de antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae.

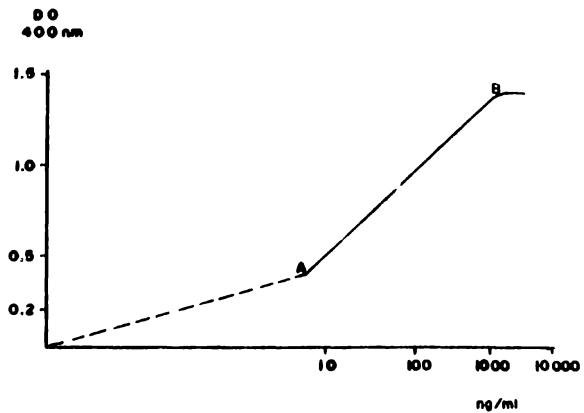


FIGURA 7- Curva de sensibilidad de la técnica de ELISA
de tipo anticuerpo \dot{a} sandwich para la detección del antígeno -
proteína capsular de *Streptococcus pneumoniae*.

LCR del caso no.	Diluciones del LCR					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	-
5	+	+	+	+	-	-
6	+	+	+	-	-	-

+ Reacción Positiva
 - Reacción Negativa

TABLA IV.- Sensibilidad de la técnica de ELISA
 doble anticuerpo ó sandwich para la detección
 del antígeno polisacárido capsular de Strepto-
coccus pneumoniae en seis LCR, de pacientes con
 diagnóstico confirmado por Streptococcus pneumo-
niae.

do el antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae.

Las lecturas de las diluciones de un líquido cefalorraquídeo del cuál se aisló Streptococcus pneumoniae, se extrapolaron en la curva de la figura 7, las concentraciones obtenidas se muestran en la tabla V, en donde detectó hasta 9 ng/ml del antígeno polisacárido capsular, lo cuál demuestra ser sensible dicha técnica.

Con respecto a la especificidad de la técnica de ELISA doble anticuerpo ó sándwich, con líquidos cefalorraquídeos de pacientes con infecciones de otras etiologías. En la tabla VI se muestran los resultados en dicha comparación, obteniéndose así que los líquidos cefalorraquídeos de diferente etiología no dieron lectura en el espectrofotómetro a 470 nm, en líquido sin diluir y en líquidos diluidos, los líquidos con etiología de Streptococcus pneumoniae dieron lectura hasta la dilución 1:32, obteniéndose concentración de antígeno de 9 ng/ml éstos resultados son abstractos en la tabla VII, donde el grupo miscelanea consta de 7 líquidos cefalorraquídeos donde no se aisló germen, de uno se aislaron bacterias Gram negativas, de otro con absceso cerebral, 5 con tuberculosis y uno viral.

La técnica de ELISA que se practicó a los 25 líquidos cefalorraquídeos se evaluó visualmente, dichos resultados se muestran en la tabla VIII, dando coloración intensa los líquidos sin diluir de pacientes con infecciones de Streptococcus pneumoniae en las primeras diluciones, disminuyendo la intensidad de color conforme se diluye el líquido.

Dilución de LCR	Concentración de Antígeno total medido (ng/ml)
1:1	450
1:2	300
1:4	200
1:8	150
1:16	35
1:32	9

*Líquido cefalorraquídeo que a diluciones mayores
dio lectura a 400 nm.

TABLA V.- Sensibilidad de la técnica de ELISA doble -
anticuerpo ó sandwich a diluciones de un líquido cefa-
lorraquídeo problema.

Diagnóstico por cultivo	D. O.					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Meningitis purulenta	1.09	1.08	1.04	0.8	0.3	-
	1.1	0.9	0.7	0.4	0.2	-
<u>Streptococcus pneumo-</u>	1.01	0.9	0.8	0.7	0.6	0.3
<u>nias</u>	1.2	1.1	1.08	1.04	0.9	0.4
	1.2	1.12	1.09	1.06	0.9	0.3
	0.6	0.3	0.3	-	-	-
Mp-Hi	-	-	-	-	-	-
Mpger	-	-	-	-	-	-
MpGneg	-	-	-	-	-	-
AC	-	-	-	-	-	-
MV	-	-	-	-	-	-
MT	-	-	-	-	-	-

^aSe muestran las D.O. obtenidas, después de la realización de la técnica de ELISA.

TABLE VI.- En éste cuadro se muestran los diferentes resultados obtenidos leyendo con espectrofotómetro a 400 m μ y en grupos de acuerdo al diagnóstico por cultivo, de los 25 líquidos cefalorraquídeos probados por la técnica de ELISA en diferentes diluciones. Los LCR son de las siguientes etiologías: Mp-Hi Meningitis purulenta por d. influensae; Mpger --- meningitis purulenta por germen no aislado; MpGneg meningitis por Gram negativo; AC absceso cerebral; MV meningitis viral MT meningitis tuberculosa.

^a Grupo estudiado	^b Dilución	Concentración ng/ml
<u>Streptococcus pneumoniae</u> (veinte casos estudiados)	1:32	9
<u>Haemophilus influenzae</u> (cuatro casos estudiados)	S. D.	S. L.
^c Miscelanea	S. D.	S. L.

^aLíquido cefalorraquídeo de afecciones que dan cuadro de meningitis.

^bDilución hasta donde fué positiva la prueba.

^cEste grupo consta de varios líquidos obtenidos de pacientes con diferentes padecimientos del Sistema Nervioso Central.

TABLE VII.- En éste cuadro se muestra la especificidad de la técnica de ELISA doble anticuerpo ó sandwich por comparación de líquidos cefalorraquídeos de 25 pacientes con diversos casos de meningitis.

Grupo estudiado	Diluciones de IGR					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
<u>Meningitis puru-</u>	++++	+++	+++	++	+	-
<u>lenta por Stre-</u>	++++	++	++	++	-	-
<u>ptococcus men-</u>	++++	++	++	+	-	-
<u>noniae</u>	++++	+++	+++	+++	++	-
	++++	+++	+++	+++	++	+
	++	+	-	-	-	-
<u>Mp-Hi</u>	-	-	-	-	-	-
<u>Mpger</u>	-	-	-	-	-	-
<u>Mpóneg</u>	-	-	-	-	-	-
<u>AC</u>	-	-	-	-	-	-
<u>MV</u>	-	-	-	-	-	-
<u>MT</u>	-	-	-	-	-	-

TABLA VIII.- En éste cuadro se muestra la detección del - antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae por la técnica de ELISA doble anticuerpo sandwich, los resultados se obtuvieron por observación visual del cambio de coloración en la técnica de ELISA a varias diluciones de los diversos líquidos cefalorraquídeos estudiados. Las + son en proporción a la intensidad del color resultante siendo +++++ máximo color, +++ menor coloración, ++ coloración regular, + casi no hay coloración y - sin coloración. Los IGR son de las siguientes etiologías: Mp-Hi Meningitis puru lenta por H. influenzae; Mpger meningitis purulenta por germen no aislado; Mpóneg meningitis por bacterias Gram negativos; AC absceso cerebral; MV meningitis viral; MT meningitis tuberculosa.

D I S C U S I O N

El diagnóstico de meningitis bacteriana es de gran importancia ya que, la tardanza de éste puede causar la muerte ó afecciones en el Sistema Nervioso Central. En nuestro medio, los agentes que con mayor frecuencia causan meningitis bacteriana son -- Streptococcus pneumoniae y Haemophilus influenzae.

Debido a la importancia en la rapidez del diagnóstico, se probó que la técnica de ELISA doble anticuerpo ó sandwich para la detección del antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae en líquido cefalorraquídeo de pacientes con meningitis bacteriana es sensible y específica y que las condiciones necesarias para dar sensibilidad son similares a las usadas por Voller y col. (16), con algunas modificaciones. El tiempo necesario para el ensayo, teniendo las placas sensibilizadas con el anticuerpo anti-antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae, fué de 4 hrs. Este tiempo es similar al usado por Wetherall y col. (18) en el ensayo de ELISA doble anticuerpo ó sandwich en la detección del antígeno de Haemophilus influenzae tipo b, quien también usó las condiciones descritas por Voller y col. Harding y cols. (6), en la detección del antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae, usaron mayor tiempo.

El tiempo que se necesita para realizar ésta técnica, es menor al requerido en otros ensayos, para la identificación de éste microorganismo como lo es el aislamiento y su identificación.

Para evaluar la sensibilidad de la técnica de ELISA doble se

ticuerpo ó sandwich en la detección del antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae, se hizo una curva estándar para detectar la cantidad de éste antígeno y probar su sensibilidad con líquidos cefalorraquídeos de pacientes con meningitis bacteriana cuya etiología es de Streptococcus pneumoniae. La curva estándar de la concentración del antígeno polisacárido capsular - (vacuna PULMONAL 48U) contra la D.O. contenida en la técnica de ELISA resultó una recta del punto A al B (figura 7) donde el punto A le corresponde la concentración de 9 ng/ml que fué la mínima concentración detectable, y el punto B de 580 ng/ml en las concentraciones de antígeno menores a 9 ng/ml (A), los puntos se desvían demasiado de la recta, este comportamiento tal vez se debió a que a éstas D.O. no se leen estas concentraciones de antígeno. A cantidades mayores de 580 ng/ml, la lectura tiende a ser similar por lo que resulta una recta que tiende a ser horizontal, debido a que se pone un exceso de antígeno al cuál, no es unido a los anticuerpos y es eliminado en los lavados. Esta recta (del punto A al B) se puede usar como patrón para detectar casi de forma cuantitativa la concentración del antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae presente en el líquido cefalorraquídeo. Así podemos decir que la técnica de ELISA fué sensible para detectar 9 ng/ml de antígeno polisacárido capsular y a cantidades mayores de 580 ng/ml, no es necesario cuantificar.

Las lecturas de las diluciones, de un líquido cefalorraquídeo, del cuál se aisló Streptococcus pneumoniae se extrapolaron en la gráfica de la fig. 7, obteniéndose así diferentes concentraciones de antígeno, hasta una dilución de 1:32 con una concen-

ción de 9 ng/ml.

Los resultados de los 25 líquidos cefalorraquídeos probados con la técnica de ELISA doble anticuerpo ó sandwich se evaluaron visualmente, detectando de ésta forma el antígeno polisacárido - capsular de Streptococcus pneumoniae (Tabla VIII) por diferencia de intensidad del color obtenido, alcanzando a detectar leve diferencias de color de acuerdo a la dilución utilizada y al LCR - probado. La interpretación visual de un resultado positivo ó negativo fué exacta en todos los casos. De tal forma que la técnica de ELISA se hace más sencilla leyendo los resultados visualmente sin dejar de detectar el antígeno.

Para evaluar la especificidad de la técnica, se compararon las lecturas de los LCR con afección causada por Streptococcus pneumoniae con las de otras etiologías dando como resultado que en los líquidos de diferentes afecciones no hubo cambio de coloración, ni lectura mientras que los afectados por Streptococcus pneumoniae si hubo cambio de coloración detectado visualmente y en D.O. En la tabla VI se puede evaluar dicha especificidad de la técnica ya que de los líquidos cefalorraquídeos a los cultivos se les aisló Streptococcus pneumoniae dieron lectura hasta la dilución 1:32 y los líquidos de diferente etiología no dieron lectura. En la tabla VIII se evalúa también la especificidad de la técnica, la interpretación de los resultados fué visual y las reacciones positivas y negativas fueron exactas en todos los casos. Hay que hacer notar que los controles que se utilizaron no eran los óptimos, ya que no se puede sacar líquido cefalorraquídeo a -

a personas sanas por ética profesional.

Se han reportado ensayos de ELISA para la detección del antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae similar al presente trabajo; Doria L. y col. (27) que aplicaron la técnica de ELISA doble anticuerpo sandwich para la detección del antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae tipo III en líquido cefalorraquídeo, suero y esputo, usando perlas de poli-stireno como fase sólida y como enzima fosfatasa alcalina, alcanzando a detectar hasta 1 ng/ml del antígeno. Harding y col. (6) desarrollaron la técnica de ELISA doble anticuerpo ó sandwich para la detección de antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae en líquido cefalorraquídeo, suero y orina usando microplacas de poliestireno y como enzima peroxidasa de rávano, alcanzando a detectar 1-3 ng/ml de antígeno. La diferencia de dichos resultados y los obtenidos en éste trabajo se puede deberse a las condiciones en que se realizó la técnica como es la fase sólida, enzima y tiempo de incubación fueron diferentes.

La técnica de ELISA aunque requiere de más tiempo que otras técnicas inmunológicas, tiene ventajas sobre éstas como lo es, el equipo que no es sofisticado y de manejo especial, los reactivos son de fácil acceso, el tiempo de vida del conjugado es largo hasta de 6 meses, por lo que ésta técnica es más práctica que Radioinmunoensayo ó Contrainmunolectroforesis.

CONCLUSIONES

Como se muestra en éste trabajo la técnica de ELISA no requiere de equipo sofisticado, los reactivos son de fácil acceso y estables por lo que la técnica es más práctica y rápida que otras técnicas de diagnóstico, pudiendo concluir lo siguiente:

I.- Los resultados muestran que la técnica de ELISA es sensible para detectar el antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae, ya que alcanzó a detectar hasta 9 ng/ml del antígeno en líquido cefalorraquídeo de un paciente al cual se le aisló Streptococcus pneumoniae.

II.- La técnica de ELISA es específica ya que no da reacción cruzada con otros microorganismos causantes de meningitis, pudiéndose detectar específicamente Streptococcus pneumoniae.

III.- La interpretación visual de una reacción positiva ó negativa en la técnica de ELISA doble anticuerpo ó sandwich que se aplicó a los líquidos cefalorraquídeos de pacientes con diferentes padecimientos del SNC, coincidió de acuerdo al germen aislado en cada caso, por lo que la interpretación visual de la técnica es similar a la interpretación con el espectrofotómetro, siendo más sensible con éste último.

IV.- La técnica de ELISA para la detección del antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae puede ser usada como una técnica inicial de diagnóstico ya que es rápida, específica y sensible, seguida por otras técnicas de diagnóstico.

V.- En éste trabajo se encontró un método para obtener foto-colorimetricamente la concentración del antígeno polisacárido -- capsular de Streptococcus pneumoniae, por lectura de D.O. y extrapolación en la gráfica de la figura 7.

VI.- Debido a que ésta técnica es fácil en su desarrollo, que no requiere de material y equipo especial, que los reactivos son de fácil acceso, por su especificidad y sensibilidad se podría -- pensar en aplicar ésta técnica como se rutina, además que por sus propiedades antes descritas se puede realizar en laboratorios de diagnóstico clínico, para otros padecimientos no nada más para - Streptococcus pneumoniae, ni únicamente en LCR sino para otros líquidos corporales.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Calderón E., Conceptos clínicos de infectología; Editorial Mendes Cervantes. 4^a edición, 197-201; 1977.
- 2.- Saul K., Robert S. y Samuel L.: Infectious diseases of children, The C.V. Mosby Company, Saint Louis, 6^a edición; 155-159; 1977.
- 3.- Kumate J. y Gutiérrez J.: Manual de Infectología; ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, 2^{da} edición 157-165;
- 4.- Griffith F.: The significance of pneumococcal types; J. Hyg Camb. 27:113; 1928.
- 5.- Bernard D., Benate D., Herman W., Harold S. y Barry W.: Frata de de Microbiología; editorial Salvat S. A. 2^{da} edición; 716-728; 1978.
- 6.- Fossieck B., Craig R. y Paterson P.: Counterimmunoelectroferesis for Rapid Diagnosis of Meningitis due to Diplococcus pneumoniae; J. Infect dis., Vol. 127, No. 1 106-109; 1973.
- 7.- Harding S., Schel W., Mc Gowan K y Sande N.: Enzyme Linked - Assay for Detection of Streptococcus pneumoniae Antigen; J. -
- 8.- Leinenen M., Detection of pneumococcal Capsular Polysaccharide Antigens, and Radioimmunoassay in Middle Ear Exudate in Acute Otitis Media; J. Clin. Microbiol. Vol. 11, No. 2; 135-140; 1980.
- 9.- Jawetz S., Melnick J., Adelberg E.; Manual de Microbiología - Médica; Editorial El Manual Moderno; 6^a edición, 111-124, - 4000-405; 1975.
- 10.- Aventin W., Nancy N. y Bessell S.: Bacteriología y Micología Médica; Editorial Interamericana S. A.; 1^a edición 111-124; 1977.
- 11.- Sydney W., William J. y Elvyn G.: Diagnostic Microbiology; Editorial C. V. Mosby Company. 5^a edición; 91-93, 142-145; 1978.
- 12.- Daguet G. y Chabbert Y.: Técnicas en bacteriología; Editorial JIPS, 1^a edición; 219-221; 1979.

- 13.- Hugh H., Stites D., Cadwell J., y Welis V.: *Inmunología Clínica*, editorial; *El Manual Moderno*, 2^{da} edición 412-413, 387; 1978.
- 14.- Bartram Ch., Crowder J., Beeler B y White A.: Diagnosis of serum antigens by counterimmunoelectrophoresis, sensitivity and specificity of detecting; *J. Lab. Clin. Med.*: 591-598; 1974.
- 15.- Voller A., Bartlett A. y Bidwell D.: Enzyme Immunoassays with special reference to ELISA techniques; *J. Clin. Pathol.* vol. 31, 507-520; 1978.
- 16.- Voller A., Bartlett A. y Bidwell D.: The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Editorial Plewlin publications: 1^a - edición; 3-45; 1977.
- 17.- Engvall y Perlmann P.: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA, *J. Immunol.*: Vol. 100 No. 1; 129-135; 1972.
- 18.- Weeman V. y Johnson A.: Immunoassays using antigen enzyme conjugates; *FAES Lett.* Vol. 15, 232-236; 1971
- 19.- Detherall B., Hallsworth P. y Mc Donald P.: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Haemophilus influenzae type b, *J. Clin. Microbiol.*, Vol. 11, No. 6, 573-580; 1980.
- 20.- Ruitenberg B. y Jaapan F.: The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and its Application to parasitic Infections; *J. Infect. Dis.*; Vol. 136, No. 1; 267-273; 1977.
- 21.- Avrameas S., Ternynck T. y Gueeden J.: Coupling of Enzyme to Antibodies and Antigens; *Scand. J. Immunol.*: Vol. 8, 7-23; - 1978.
- 22.- Buxton F. y Hissing J.: The Antibody and Antigen ELISA; Future Applications; Research products, Miles Division: No. 2. 5-7; 1980.
- 23.- Kabat S., Mantred Ph. y Mayer M.: *Inmunología experimental* Editorial la Prensa Médica Mexicana, 2^{da} edición; 527-528; - 1968.
- 24.- Barry M.: ELISA methodology for polysaccharide antigens: Protein coupling of polysaccharides for adsorption to plastic tubes; *J. Immunol. N.*, No. 28, 187-192; 1979.
- 25.- Leinonen P. y Vlijanen Y. : Antigen Attachment in ELISA; *J. Immunol. N.*; No. 34, 61-70; 1980.

- 26.- Garren R., Whit L., Moran S., y Richardson M.: The occurrence and treatment of false positive reactions in Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) for the presence of fungal antigens in clinical samples; *J. Immunol. M. No. 28*, 177-186; 1979.
- 27.- Voller A., Bartlett A. y Midwell C.: Enzyme Immunoassays - with special reference to ELISA techniques, *J. Clin. Pathol. Vol. 31* 507-520; 1978.
- 28.- Deris L., Dean D.: Indirect Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Rapid Detection of *Streptococcus pneumoniae* type 3 Antigen; *J. Clin. Microbiol. Vol. 11 No. 6*; 641-648; 1980.
- 29.- Baker P., Moroe H., Staszak y Prescott B.: Maturation of Regulatory Factors Influenzae, Magnitude of Antibody Response to Capsular Polysaccharide of type III; *J. Infect. - Dis. Vol. 136*, 520-523; 1977.
- 30.- Kelleck S. y Walls K.: Evaluation of Some of the parameters of the Enzyme-Linked Immunespecific Assay; *J. Infect. Dis., Vol. 36*, 279-285; 1979.
- 31.- Hiesing P., Buxton F., Tallado R. y Spinkie F.: Comparison of Two Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Antigen -- Quantitation Direct Competition and Anticbody Inhibition; *Infect. Imm. Vol. 27, No. 2*, 405-410, Feb. 1980.
- 32.- Dubois M., Guilles K., Hamilton K., Hubers P., Smith P.; *Anal. Chem. 28*, 350, 1956.
- 33.- Nakane P. and Pierce G.B., *J. Histochem Cytochem. Vol. 14* 929, 1967.