

870127

19
2j

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



INVESTIGACION DE ANTICUERPOS (IgG) EN LIQUIDOS
CEFALORRAQUIDEOS CONTRA MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS POR TECNICA INMUNO-ENZIMATICA.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
CLAUDIA PATRICIA MORALES CHAPA

Asesor: Q.F.B. María del Socorro Pulido García
GUADALAJARA, JALISCO 1987

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Pag.
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	3
MATERIAL Y METODOS	31
RESULTADOS	44
CONCLUSIONES	53
BIBLIOGRAFIA	57

INTRODUCCION

El presente trabajo tuvo como objetivo el estudio de la utilidad del ensayo Inmunoenzimático de ELISA como diagnóstico precoz de Meningitis tuberculosa.

Se determinó inmunoglobulina IgG contra el Derivado proteínico purificado de Mycobacterium tuberculosis (PPD).

La detección de anticuerpos antituberculosos ha sido estudiada en múltiples publicaciones tratando de hallar una técnica serológica confiable.

Actualmente existen varias técnicas para este diagnóstico, pero no se ha encontrado ninguna con resultados satisfactorios.

La tuberculosis tiene una elevada prevalencia a nivel mundial en los países con bajo desarrollo, en donde el hacinamiento y la promiscuidad facilitan su transmisión.

En nuestro país la tuberculosis ocupa un lugar importante como causa de mortalidad, fundamentalmente en su manifestación de tuberculosis pulmonar. Bajo estas condiciones de frecuencia, no es de extrañar la presencia de formas extrapulmonares con localizaciones prácticamente en cualquier órgano o sistema.

La prevención de la tuberculosis es un problema médico y social; cualquier medida que ayude a elevar el nivel de vida de la población y que disminuya las aglomeraciones, ayuda a reducirla.

El diagnóstico de Meningitis tuberculosa, la causa más común de muerte en niños tuberculosos, está usualmente

basado en la clínica, radiología y los datos bacteriológicos; estos procedimientos tienen el inconveniente de no ser específicos o son de gran consumo de tiempo.

El reconocimiento temprano de la tuberculosis en el Sistema Nervioso Central por lo tanto permanece como un reto para los clínicos.

Pensando en todo lo anterior se estudió la cantidad de pacientes que presentaban desórdenes en el Sistema Nervioso Central y que al trabajar el líquido cefalorraquídeo de dichos pacientes con la técnica Inmunoenzimática de ELISA conocer cuáles de estos pacientes presentaban anticuerpos contra PPD, tratanto de saber si la prueba es de rápido diagnóstico; en caso de ser provocados los desórdenes del Sistema Nervioso Central por Mycobacterium tuberculosis y si esta prueba es costeable.

Nuestro propósito en base a los resultados que se obtengan es motivar investigaciones para conseguir el perfeccionamiento de esta técnica así como tener un rápido y eficiente diagnóstico.

GENERALIDADES

ASPECTOS GENERALES DEL MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

GENERO: MYCOBACTERIUM

Dentro del género Mycobacterium se incluyen a todos aquellos microorganismos de aspecto bacilar que presentan la propiedad de ser ácido resistentes.

La ácido resistencia es una propiedad tintorial característica de este grupo de bacterias en que difícilmente se tiñen con colorantes básicos, pero una vez teñidas retienen el colorante, resistiendo la coloración con ácidos minerales diluidos, alcohol y otros solventes por lo cual reciben el nombre de bacilos ácido resistentes.

Los miembros del género Mycobacterium están ampliamente distribuidos en la naturaleza; se les puede encontrar viviendo en los suelos o en el agua ya sea como saprotitos o bien produciendo enfermedades en el hombre y otros animales.

En el hombre producen diversos tipos de enfermedades, siendo las más importantes la tuberculosis y la lepra.

CLASIFICACION:

Las micobacterias han sido clasificadas en el orden de los actinomycetales, que a su vez comprende varias familias incluyendo las siguientes:

1) Mycobacteriaceae (micelio ausente o rudimentario); dentro de esta familia se localiza el género Mycobacterium, con una gran variedad de especies (tabla 1).

2) Actinomycetaceae (por lo general presenta formas miceliales); dentro de esta familia se encuentra el género Nocardia que es ácido resistente.

3) Streptomycetacea (formas miceliales con esporas).

En los países donde la frecuencia de la tuberculosis causada por Mycobacterium tuberculosis ha declinado, últimamente ha llamado la atención que se ha elevado el número de casos debidos a micobacterias atípicas. La patología que produce M. tuberculosis es indiferenciable a la producida por este tipo de bacterias. El problema más grande que se tiene con este tipo de micobacterias es que las infecciones producidas responden pobremente a la quimioterapia ya que son resistentes a todas las drogas anti-tuberculosas comunes.

TABLA 1.- CLASIFICACION DE MICOBACTERIAS

Familia: *Mycobacteriaceae*
 Género : *Mycobacterium*

1.- Agentes de la tuberculosis:

Mycobacterium tuberculosis (bacilo tuberculoso humano), agente causal de la tuberculosis en el hombre.

Mycobacterium bovis (bacilo tuberculoso bovino), -- agente causal de la tuberculosis del ganado, puede ser transmitida al hombre.

Mycobacterium avium (bacilo tuberculoso aviario), -- agente causal de la tuberculosis de aves, puede ser transmitida al hombre.

2.- Agentes de la lepra:

Mycobacterium leprae (bacilo de Hansen), agente causal de la lepra humana.

Mycobacterium leprae-murium (bacilo de Stefastsky), agente de la lepra de las ratas.

3.- Grupo de micobacterias no clasificadas. También conocidas como micobacterias anónimas o atípicas, algunos miembros de este grupo pueden producir enfermedad en el hombre, mientras que otros son -- saprofitos.

4.- Grupo de *Mycobacterias* patógenas para animales y -- que difícilmente infectan al hombre, ejem.:

Mycobacterium paratuberculosis (bacilo de Johne), -- agente de la enteritis crónica del ganado.

5.- Grupo de micobacterias de animales de sangre - - - fta.

Se ha dividido a las micobacterias alpicas en cuatro grupos, llamados grupos de Runyon, de acuerdo con la capacidad de esos cultivos a ponerse amarillos al ser expuestos a la luz (grupo I, Fotocromógenos), o de producir color naranja al incubarlos en la oscuridad (grupo II, Escotocromógenos), o permanecer incoloros (grupo III, No - Fotocromógenos), o desarrollarse en tres días (grupo IV, De crecimiento rápido).

TUBERCULOSIS:

La tuberculosis es una enfermedad que se sabe ya -- existía en tiempos prehistóricos. Se encuentra en todo el mundo y afecta no sólo al hombre sino también a diversas -- especies de animales salvajes y domésticos.

Actualmente la tuberculosis es una enfermedad infecciosa muy frecuente y de distribución universal. En la mayoría de los países Ibero-Americanos, la tuberculosis constituye una de las 10 primeras causas más importantes de -- muerte.

ASPECTOS HISTÓRICOS:

Existen datos para suponer que la tuberculosis existió desde la más remota antigüedad como lo demuestra el -- descubrimiento de lesiones en momias de Egipto y la observación de huesos humanos y de animales con secuelas que -- pueden considerarse de origen tuberculoso.

Hipócrates (460-370 A.C.), la denominó con el nombre de tisis. Galeno (130-200), consideró que la tisis --

era contagiosa al afirmar que las personas que duermen con ellos largo tiempo contraen la enfermedad. Fracastoro (1483-1553), sospechó la existencia de un agente etiológico específico para cada enfermedad, sentando así las bases de la teoría del contagio. Laennec (1781-1826), pudo identificar como tuberculosis muchas de sus varias manifestaciones, estableciendo así las bases para un diagnóstico correcto. Willemin (1827-1892), demostró la transmisibilidad de la enfermedad mediante la inoculación de material de lesiones tuberculosas de humanos a conejos, en los que reprodujo la enfermedad. Roberto Koch (1843-1919), pudo observar por primera vez (1882), el bacilo de la tuberculosis al teñirlos por métodos especiales, aisló los bacilos y reprodujo la enfermedad en animales de laboratorio; desde entonces la tuberculosis ha sido una de las enfermedades infecciosas más intensamente estudiadas.

Las pruebas con reacción cutánea de tuberculina han brindado información adicional sobre la frecuencia de la infección. Pirquet introdujo la prueba de tuberculina en 1907.

AGENTE ETIOLOGICO:

Mycobacterium tuberculosis es un bacilo grampositivo, ácido resistente. La ácidorresistencia probablemente sea atribuible al alto contenido de lípidos del bacilo, -- del orden del 50 por 100 del microorganismo. Esta fracción lipídica incluye ceras de cadena larga, grasas neutras y fosfátidos. El grado de ácidorresistencia parece guardar relación con la virulencia.

Como consecuencia de la alta concentración de lípi-

dos, el microorganismo sufre penetración escasa por agentes bactericidas acuosos y es resistente a la desecación y puede sobrevivir y permanecer infectante durante largos períodos en esputo, heces u otras secreciones corporales desecadas.

Es un microorganismo aerobio que se multiplica con rapidez importante sólo entre 35°C y 41°C. Si bien se desarrolla de manera óptima en concentraciones bastante altas de oxígeno, puede evolucionar más lentamente en presiones parciales bajas de oxígeno. Susceptible a muchos materiales orgánicos e inorgánicos de la índole de jabones, metales pesados y fenol.

MORFOLOGIA:

Bacilo delgado, recto o ligeramente curvo, con extremos redondeados; varía en ancho de 0.2 a 0.5 μ m y en longitud de 1 a 4 μ m; son ácidoresistentes, no móviles, no formadores de esporas y no encapsulados.

A menudo tienen los bacilos un aspecto de rosario debido a su contenido en polifosfatos y vacuolas no teñidas.

TINCION:

Comúnmente se utilizan dos tipos de tinciones ácidoresistentes:

- 1.- Tinciones con carbolfucsina: una mezcla de fucsina con fenol (ácido carbólico).

- a. Ziehl-Neelsen ("Tinción caliente")
- b. Kinyoun ("Tinción fría")

2.- Tinciones fluorocrómicas: suramina O, con o sin un segundo fluorocromo, la rodamina.

Cualesquiera que sean las tinciones que se usen sólo indican la presencia de bacilos acidorresistentes pero no diferencian especies.

CULTIVO:

A) Medios de cultivo no selectivos.-

Actualmente se emplean numerosos medios de cultivo a base de huevo para aislamiento de mycobacterias. El medio más comúnmente utilizado es el Löwenstein-Jensen.

El medio de Petragnani es más inhibitor, y se debe utilizar sólo en el caso de muestras muy contaminadas.

Los medios de Middlebrook permiten la detección de desarrollo entre 10 y 12 días, en lugar de los 18 a 24 - - días de incubación requeridos con otros medios.

B) Medios de cultivo selectivos.-

Durante muchos años se han utilizado medios de cultivo con agentes antimicrobianos para suprimir la contaminación de bacterias y hongos. Estos medios selectivos son los siguientes:

- Löwenstein - Jensen, modificado por Gruft

- Mycobactoseel Löwenstein-Jensen
- 7H10 de Middlebrook
- 7H11 Selectivo (medio de Mitchison)

IDENTIFICACION DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS:

Mycobacterium tuberculosis se puede identificar utilizando pocas pruebas sencillas que pueden ser llevadas a cabo por cualquier laboratorista. Las técnicas recomendadas son:

- 1.- Determinación de la temperatura óptima para el aislamiento y velocidad de desarrollo.
- 2.- Pigmentación de colonias.
- 3.- Acumulación de niacina.
- 4.- Reducción de nitratos a nitritos.
- 5.- Producción de catalasa.
- 6.- Inhibición del desarrollo por la hidrazina del ácido tiofeno-2-carboxílico.

MODO DE DIFUSION DE LA TUBERCULOSIS:

Cuando una persona con tuberculosis pulmonar contagiosa tose o estornuda, dispersa en el aire gotitas de cálibres diferentes, algunas de las cuales contienen bacilos tuberculosos. Cuando una gota que contiene gérmenes es inhalada hacia los pulmones, ha de tener unas dimensiones particulares para llegar a un alveolo, donde empieza la infección.

El número de bacilos tuberculosos eliminados en la atmósfera por un enfermo depende del número de bacilos en el esputo, el volumen y carácter de éste, el tipo y fre-

cuencia de la tos.

Como la transmisión por gotitas explica la mayor -- parte de infecciones iniciales, casi todos los complejos -- primarios tienen lugar en los pulmones. En ocasiones, bacilos ingeridos crean un foco primario en el intestino; -- mas rara vez en una amígdala o en las mucosas de la boca . Otras lesiones primarias extrapulmonares como las de la -- piel o la conjuntiva, dependen de contacto local con bacilos tuberculosos.

ESTRUCTURA ANTIGENICA:

Componentes antigénicos de *Mycobacterium*.-

Protelinas.- Las protelinas de los bacilos ácido resistentes ponen de manifiesto la alergia o hipersensibilidad retardada que se presenta en la infección tuberculosa; las protelinas son el principio activo de las tuberculosis.

En enfermos tuberculosos se pueden demostrar anticuerpos, antiprotelinas.

Polisacáridos.- Las micobacterias contienen varios tipos de polisacáridos, como se puede demostrar por pruebas inmunológicas o químicas. No se ha demostrado que los polisacáridos del *Mycobacterium* sean capaces de poner de manifiesto la alergia.

Lípidos.- Las micobacterias tienen un alto porcentaje de lípidos, ácidos grasos y ceras.

PATOGENIA:

La infección granulomatosa prototipo es la producida en la tuberculosis. Cuando los bacilos de la tuberculosis se implantan en el cuerpo suscitan un granuloma característico llamado tubérculo que consiste en conglomerado microscópico de histiocitos recordetes esféricos que guardan semejanza vaga con células epiteliales por lo cual se llaman células epitelioides.

La patogenia del bacilo de la tuberculosis no resulta de toxicidad inherente, sino de su capacidad para suscitar hipersensibilidad en el huésped.

No se conoce al antígeno exacto que produce esta -- hipersensibilidad, pero parece corresponder a tuberculoproteínas que provienen del bacilo.

ESPECTRO CLINICO DE LA TUBERCULOSIS:

1) TUBERCULOSIS PRIMARIA.-

Es la fase de la infección tuberculosa que sigue -- directamente a la implantación inicial de los bacilos de la tuberculosis en los tejidos.

En la infección primaria el microorganismo tiene -- procedencia obligadamente exógena y la vía de entrada es -- el aparato respiratorio; raramente comienza la infección -- en bucofaringe o intestino; por ingestión de leche contaminada por la cepa bovina de M. tuberculosis.

2) TUBERCULOSIS DE REINFECCION O SECUNDARIA.-

Es la fase de infección tuberculosa que sigue a la reactivación de la tuberculosis primaria, o la reinfección de un sujeto previamente expuesto. En consecuencia los bacilos pueden tener procedencia endógena o exógena.

Las manifestaciones clínicas en los pacientes con tuberculosis pulmonar son tan variadas como el carácter, el sitio, la distribución y la extensión de las lesiones anatómicas.

Dentro de este tipo de tuberculosis están:

- Tuberculosis hematógena.
- Tuberculosis miliar aguda.

3) COMPLICACIONES DE LA TUBERCULOSIS.-

Dentro de este tipo de tuberculosis tenemos:

- Tuberculosis pulmonar crónica.
- Tuberculosis con derrame.
- Meningitis tuberculosa.
- Meningitis tuberculosa serosa.
- Tuberculoma.
- Tuberculosis del sistema esquelético.
- Tuberculosis de ganglios linfáticos superficiales.
- Tuberculosis de boca y vías respiratorias altas.
- Tuberculosis de abdomen.
- Tuberculosis de la piel.
- Tuberculosis ocular.
- Tuberculosis de corazón y pericardio.

- Tuberculosis de glándulas endocrinas y exocrinas.
- Tuberculosis de las vías genitales.
- Tuberculosis de las vías urinarias.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO:

El diagnóstico de laboratorio tiene como objetivo fundamental el hallazgo y demostración del agente etiológico.

Los procedimientos básicos más importantes utilizados para lograr esta demostración son tres:

- a) La baciloscopia
- b) El cultivo en medios apropiados
- c) La inoculación en animales de laboratorio

El resultado que se obtenga va a depender no sólo del uso de métodos correctos sino también de una buena selección de los productos que se van a analizar.

MATERIAL CLINICO:

- a) Esputo.- El producto que se expectora en la mañana, es el que se examina con más frecuencia.
- b) Orina.- Se utiliza en casos de tuberculosis renal.
- c) Líquido cefalorraquídeo (LCR).- Se utiliza en casos de Meningitis tuberculosa, etc.

TUBERCULINA:

Cuando un individuo se infecta con bacilos tuberculosos, se hipersensibiliza; para poner de manifiesto la hipersensibilidad se emplean derivados del mismo bacilo conocidos con el nombre de tuberculina. Existen varios preparados pero dos de ellos son los más útiles.

1.- Tuberculina antigua (OT).- Descubierta por Koch, por lo que también se conoce con el nombre de tuberculina de Koch, se prepara a partir del caldo de un cultivo de 2 a 3 meses de bacilo tuberculosos; los bacilos se matan por autoclave o hirviendo, se separan los cuerpos bacilares y el caldo de cultivo libre de gérmenes se concentra 10 veces; esto es lo que se llama tuberculina bruta a partir de la cual se hacen diluciones, que son las que se emplean para las pruebas.

2.- Derivado Proteínico Purificado (PPD).- Es una tuberculina más pura y prácticamente ha sustituido a la tuberculina vieja, se prepara crecimiento tuberculoso en medios sintéticos, después de matar los bacilos por autoclave, se filtra y del medio de cultivo se precipitan las proteínas libres con sulfato de amonio; este precipitado purificado es el PPD.

Pruebas Tuberculinicas.- Entre los diversos procedimientos para hacer las pruebas tuberculinicas se prefiere la intradermorreacción de Mantoux. Existen otros métodos como el de multipuntura o prueba del parche que son menos confiables.

EXAMENES RADIOLOGICOS:

La radiografía es la primera técnica diagnóstica -- que debe emplearse después que se descubre una cutirreacción positiva a la tuberculina.

EXAMENES HISTOPATOLÓGICOS:

El material obtenido siempre debe cultivarse. Incluso si los informes del patólogo indican descubrimientos de tejido de granulación no específico, conocer los resultados de la prueba de tuberculina y del cultivo del tejido obtenido por biopsia muchas veces ayuda a establecer el -- diagnóstico.

PREVENCIÓN Y CONTROL:

Las medidas preventivas son de varios niveles tales como:

Quimioprofilaxis. - La efectividad y la baja toxicidad de la isoniacida ha hecho posible el empleo de la quimioprofilaxis en grupos de alto riesgo, como son aquellas personas que han estado expuestas al contagio o también de niños que han llegado a ser recientemente tuberculino positivos, esto puede conducir a la reducción en la morbilidad o bien de la reactivación futura de la infección.

Inmunización. - Se utiliza una vacuna de bacilos -- bovinos vivos, atenuados por múltiples pases en un medio -- de cultivo pobre, se conoce con el nombre de BCG (Bacilo -- de Calmette y Guérin).

Produce un grado variable de inmunidad para la infección con bacilos tuberculosos. La inmunidad no es completa, y las superinfecciones con bacilos humanos son posibles; sin embargo, rara vez son progresivas.

El beneficio más importante de la vacunación con BCG es que se disminuye el riesgo de complicaciones graves.

La desventaja de BCG es que produce hipersensibilidad a la tuberculina, que disminuye la utilidad de la prueba tuberculina para el diagnóstico de infección por Mycobacterium tuberculosis.

Las medidas preventivas más eficaces sin duda se relacionan aquellas dirigidas a limitar la infección por el bacilo tuberculoso; aquí se incluye el aislamiento de los casos activos, pero fundamentalmente el tratamiento de los individuos bacilíferos y el proporcionar una protección adecuada a los contactos; en países económicamente débiles el tratamiento ambulatorio es factible y reduce considerablemente los costos de hospitalización.

QUIMIOTERAPIA:

La quimioterapia es probablemente la medida más importante en el tratamiento de la tuberculosis activa, aunque ocasionalmente sea necesario combinarla con reposo o cirugía.

Hoy en día se dispone de varios medicamentos antituberculosos muy efectivos, el uso de los cuales se basa en los siguientes principios:

- 1) Siempre debe administrarse al menos una combinación de dos agentes quimioterapéuticos.
- 2) La quimioterapia de la tuberculosis debe ser pro
longada.

Los medicamentos antituberculosos más comúnmente em
pleados son los siguientes:

- Isoniacida
- Estreptomina
- Acido para-aminosalicílico (se emplean sus sales de calcio o de sodio). (PAS)
- Rifampicina

Otros medicamentos útiles son: Etambutol, Etionamida, Thiacetazona, Cicloserina y otros se emplean como fármacos de segunda elección ya que ha aparecido resistencia
del bacilo a los primarios (Isoniacida, Estreptomina, -- PAS).

MENINGITIS CAUSADA POR MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

La complicación más grave de la tuberculosis y la causa más frecuente de muerte en los niños es la meningitis, la cual era casi siempre mortal cuando no disponíamos de terapéutica eficaz.

Actualmente pueden curarse nueve de cada diez pacientes, pero la recuperación física y mental completa depende en gran parte del diagnóstico temprano, seguido de terapéutica inmediata y prolongada.

El conocer la patogenia de la meningitis ayuda al diagnóstico y a la interpretación de los signos físicos tempranos y de los cambios iniciales en el líquido cefalorraquídeo.

PATOGENIA:

En la corteza cerebral se alojan bacilos tuberculosos que siguen la misma conducta que las siembras metastásicas en cualquier otra parte del cuerpo.

No se produce el foco de tuberculosis activa porque en ocasiones no crecen, y en otros casos, los gérmenes se multiplican y se forma una lesión caseosa; aumenta de volumen hasta que alcanza las meninges de revestimiento e invade al espacio subaracnoideo.

En ocasiones el foco tuberculoso puede evacuar bruscamente material caseoso y bacilos hacia el líquido cefalorraquídeo, provocando meningitis fulminante.

El comienzo de la enfermedad es más lento cuando de ordinario la infección de las meninges es gradual. Incluso en esta etapa temprana de participación de meninges el examen del líquido cefalorraquídeo suele mostrar ciertas anormalidades.

Después de que un foco caseoso se ha formado en ocasiones queda encapsulado, constituyendo un tuberculoma, -- que puede quedar indefinidamente inactivo o que finalmente produce síntomas que simulan el tumor cerebral. Una lesión silenciosa puede activarse por traumatismo, por inflamación perifocal o una infección general intercurrente.

El foco caseoso que drena hacia el espacio subaracnoideo puede originarse no sólo en la corteza, meninges, o plexo coroideo, sino también en los huesos que rodean el Sistema Nervioso Central.

Cuando un niño con tuberculosis primaria se trata empleando isoniácida, no suelen desarrollarse focos metastáticos y puede evitarse la meningitis. Cuando ya hay focos establecidos, no originan meningitis difusa, por la presencia de isoniácida en el líquido cefalorraquídeo.

Una complicación temprana de la tuberculosis primaria es la meningitis, que suele desarrollarse en plazo de seis meses después de iniciada la infección.

PATOLOGIA:

La meningitis tuberculosa por examen patológico es una meningoencefalitis. La participación máxima de las meninges es alrededor del tallo cerebral.

El cerebro muchas veces muestra signos externos de una pequeña cantidad de exudado y unos focos tuberculosos - caseosos en los pacientes no tratados.

El exudado en la base del cerebro puede obstruir - las cisternas basales, que a su vez crea hidrocefalia.

Pueden relacionarse muchas veces los signos y síntomas de meningitis tuberculosa con cambios patológicos en - el Sistema Nervioso Central.

MANIFESTACIONES CLINICAS:

La meningitis tuberculosa suele tener un comienzo - incidioso, muchas veces con aumento intermitente de la sintomatología.

Hay fiebre casi siempre, pero al principio puede no ser alta. En la mitad aproximadamente de los pacientes -- hay vómitos al comenzar aunque frecuentemente no recidiva durante varios días.

El síntoma más notable es la apatía; el carácter -- con frecuencia cambia bruscamente, se quejan de cefalea, a veces intermitente los niños de más de cuatro años de edad. El estreñimiento responde temporalmente a los purgantes; - sólo se observa en el 10% aproximadamente de los pacientes.

El dolor abdominal agudo sin síntomas de localiza-- ción a veces se acompaña de otros signos tempranos de me-- ningitis en niños mayores.

El líquido muchas veces es xantocrómico y el conte

nido de proteínas es mayor de 300 mg por 100 ml; puede - - gelificarse inmediatamente después de extraído.

DIAGNOSTICO:

Como los niños con tuberculosis primaria conocida - probablemente han recibido terapéutica específica, la meningitis tuberculosa suele observarse en niños que previamente no hablan sido diagnosticados de tuberculosis.

La mayor parte de niños y adultos que desarrollan - meningitis presentan signos de tuberculosis en la radiografía torácica.

Cuando hay sospecha de meningitis tuberculosa debe - analizarse el líquido cefalorraquídeo.

Los datos característicos del líquido cefalorraquídeo son:

- Líquido claro
- Número de leucocitos variable entre 10 y 350 por milímetro cúbico, predominando los linfocitos.
- La concentración de glucosa puede estar limitada.
- El contenido de proteínas suele ser mayor que el normal y aumenta en exámenes sucesivos.
- El contenido de cloruros suele ser así inferior - al normal en la segunda o tercera etapa de la meningitis.

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL:

La diferenciación de la etapa temprana de la menin-

gitis tuberculosa y las pequeñas enfermedades de la infancia resulta difícil.

Si el paciente ya presentó signos neurológicos, debe pensarse en otras infecciones que afectan el Sistema Nervioso Central. Frecuentemente en niños que reciben terapéutica antimicrobiana para una posible infección bacteriana, se sospecha el diagnóstico de meningitis bacteriana aguda tratada parcialmente. En estas circunstancias, los datos del líquido cefalorraquídeo pueden ser similares a los de la meningitis tuberculosa.

El diagnóstico diferencial puede ser particularmente difícil cuando la meningitis está causada por Haemophilus influenzae de tipo B, especialmente si existe un absceso encapsulado. El cultivo del líquido cefalorraquídeo -- suele demostrar el germen específico.

La criptococosis (Torulosis) se menciona frecuentemente en el diagnóstico diferencial. El líquido cefalorraquídeo en esta infección suele ser difícil de distinguir del líquido de la meningitis tuberculosa con los métodos usuales, pero en la criptococosis un preparado con tinta china demostrará la presencia de *Cryptococcus*.

Muchas veces se pierde tiempo considerando diagnósticos raros fuera de la tuberculosis.

PRONÓSTICO:

Existe estrecha correlación entre el pronóstico y la etapa de la enfermedad en que se inicie el tratamiento. Los niños tratados durante la primera etapa de la meningi-

tis casi invariablemente sobreviven sin ninguna secuela im-
portante.

Así pues, los niños diagnosticados después que ya -
han producido graves trastornos neurológicos tienen mayor
peligro de morir, aunque con terapéutica intensiva la ma-
yor parte sobreviven.

TRATAMIENTO:

Debe iniciarse el tratamiento con isoniacida y ri-
fampina. Hay que añadir otra droga, como etambutol o PAS,
a los seis meses cuando se interrumpe la rifampina.

Tiene importancia el cuidado general de enfermería
y la supervisión médica. Debe conservarse el estado nutri-
tivo.

Los pacientes que se recuperan de la meningitis tu-
berculosa han de seguir una convalecencia espontánea y no
hay que estimularlos en exceso ni mental ni físicamente.

CARACTERISTICAS INMUNOGENICAS DEL MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

INMUNIDAD:

Cuando una persona adquiere la primoinfección con bacilos tuberculosos, adquiere una cierta resistencia, habiendo una mayor capacidad para localizar los bacilos, para retardar su propagación y reducir la diseminación linfática, siendo esto atribuido principalmente a la capacidad de las células mononucleares para limitar la multiplicación de los organismos fagocitados y quizá para destruirlos; las células mononucleares adquieren esta "inmunidad celular" en el curso de la infección inicial del huésped.

Se forman anticuerpos contra diversos constituyentes celulares del bacilo tuberculoso.

Se adquiere hipersensibilidad al bacilo tuberculoso durante la infección primaria del huésped. Esto se hace evidente por el desarrollo de una reacción positiva a la tuberculina.

Puede ser inducida la sensibilidad tuberculínica por bacilos tuberculosos completos o por tuberculoproteínas.

La resistencia del huésped puede modificarse por los factores siguientes:

SEXO.-

El número de casos y la mortalidad en la mayor parte de países son máximos en varones de edad avanzada.

EDAD.-

Los niños pequeños que presentaban tuberculosis tenían menos probabilidades de sobrevivir que los niños mayores antes de que la quimioterapia actual empezara a administrarse.

NUTRICION.-

No podemos separar el efecto de la nutrición inadecuada sobre la resistencia a la tuberculosis del efecto de otros factores socioeconómicos.

SITUACIONES EXTRAORDINARIAS DE ESTRES.-

Los estrés extraordinarios mentales y físicos pueden ser culpables de la disminución de la resistencia a la tuberculosis. Los traumatismos locales indudablemente pueden actuar como factor desencadenante para diseminar la enfermedad.

Este hecho puede documentarse en complicaciones como la meningitis y enfermedades del sistema esquelético. Intervenciones quirúrgicas, no necesariamente en zonas tuberculosas; también se cree que disminuyen la resistencia y favorecen la progresión de la enfermedad.

RESPUESTA INMUNE:

Cuando se inhala o ingiere bacilo tuberculoso, éste se desarrolla en los tejidos y produce una lesión limitada; al poco tiempo los bacilos cesan de reproducirse, la -

lesión se estabiliza probablemente debido a que en este -- tiempo se ha producido una respuesta inmune.

Otro ejemplo de inmunidad adquirida lo encontramos en el llamado Fenómeno de Koch.

El Fenómeno de Koch consiste fundamentalmente en lo siguiente: Cuando se inocula un cobayo con bacilo tuberculoso, por vía subcutánea, después de 10 a 14 días aparecerá en el sitio de la inoculación un nódulo que posteriormente se transforma en una úlcera permanente; los bacilos enseguida pasan a los ganglios regionales y posteriormente a bazo, pulmón, hígado, riñón, etc.; es decir, que en el cobayo se produce una tuberculosis progresiva, pero cuando al cobayo ya tuberculoso se le aplica una inyección similar en otro sitio, la respuesta es diferente; se observará la aparición de una reacción indurada violenta que en el transcurso de 2 a 3 días puede ulcerar, pero la úlcera -- tiende a cerrar pronto y los bacilos prácticamente no se -- diseminan a los ganglios regionales y ni por supuesto a -- otros órganos, es decir que los bacilos de reinfección son mejor localizados, por lo que se considera que el animal -- ha adquirido resistencia o inmunidad parcial.

MECANISMO DE INMUNIDAD:

La inmunidad está mediada por anticuerpos humorales en muchas enfermedades; en la tuberculosis los anticuerpos séricos no parecen participar en la inmunidad.

La formación de anticuerpos puede ser inducida por el bacilo tuberculoso contra sus componentes proteicos y -- polisacáridos; teniendo dichos anticuerpos las siguientes --

características:

- a) No existe ninguna correlación entre la presencia de anticuerpos y el curso de la enfermedad, produciéndose los anticuerpos a títulos bajos.
- b) Los anticuerpos probablemente ayudan a que los bacilos sean fagocitados más rápidamente, pero no evitan su multiplicación intracelular.
- c) La resistencia a la infección no puede transferirse pasivamente en suero.

Se considera que la inmunidad en la tuberculosis está mediada por células por los siguientes hechos:

- a) Puede ser transferida por intermedio de células linfoides viables la resistencia a la infección; cuando se transfieren linfocitos de un animal tuberculoso a un animal sano, este último aumenta su resistencia a la infección.
- b) Los bacilos tuberculosos se reproducen bien dentro de los macrófagos de animales sanos y son destruidos dentro de los macrófagos de animales tuberculosos.

Los macrófagos de animales tuberculosos contienen un número mayor de lisosomas, por lo tanto se ha sugerido que el aumento de su capacidad bactericida puede depender del incremento de las enzimas lisosomales.

Los macrófagos de animales infectados con M. tuber-

culosis, son capaces de destruir no sólo el bacilo tuberculosis sino que también otros microorganismos tales como -- Brucella melitensis, por lo tanto se puede concluir que la capacidad bactericida de los macrófagos activados no parece ser específica, puesto que no sólo se manifiesta el microorganismo que indujo la activación sino otros no relacionados con él.

RELACION ENTRE LA HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA E INMUNIDAD CELULAR:

Se ha observado que al mismo tiempo que aparece la inmunidad celular aparece la hipersensibilidad retardada, pareciendo estos dos fenómenos parte de un mecanismo común como lo demuestran los siguientes hechos:

- 1) En los animales infectados aparece al mismo tiempo la inmunidad celular y la hipersensibilidad.
- 2) Se presenta la hipersensibilidad de tipo retardado y la inmunidad celular al mismo tiempo cuando se transfieren linfocitos de animales tuberculosos a sanos.

Parte importante de los mecanismos de resistencia contra la infección o reinfección es la hipersensibilidad de tipo retardado, pero también puede conducir a la producción de daño tisular; la dosis del alérgeno es lo que va a determinar que este mecanismo se comporte de una u otra manera; se ha mencionado que los bacilos de reinfección son localizados en el sitio mismo de inoculación, como sucede también con los bacilos que son inhalados, probablemente porque éstos alcanzan los espacios alveolares en poco número

ro, de 1 a 3 bacilos.

Por otro lado cuando la cantidad de bacilos de reinfección o de sus productos se eleva, entonces se produce daño tisular, se considera que la producción de los focos caseosos en tuberculosis y las cavidades que se forman en los pulmones están asociados con la hipersensibilidad retardada.

De la misma manera, cuando se inyecta una cantidad grande de tuberculina a un animal hipersensible, puede provocarse un choque sistémico severo o bien reactivación de lesiones tuberculosas e incluso la muerte.

MATERIAL

y

METODO

Se investigó la presencia de Inmunoglobulina IgG en tres grupos diferentes:

Grupo de Sexo Femenino

Grupo de Sexo Masculino

Grupo de Recién Nacidos (ambos sexos)

De estos grupos se obtuvo como muestra biológica para el estudio, Líquido cefalorraquídeo.

Dichas muestras se obtuvieron de diferentes hospitales, tratando de que las muestras fueran representativas de toda el área metropolitana.

Una vez obtenidas las muestras se procedió a su estudio en la Unidad de Patología Clínica.

A los líquidos cefalorraquídeos se les determinó -- la presencia de Inmunoglobulina IgG contra PPD de Mycobacterium tuberculosis como se mencionó anteriormente.

Las muestras utilizadas en este estudio no fueron tratadas con ningún procedimiento previo, tomándose la cantidad de muestra a estudiar directamente del tubo de ensayo que la contenía, procediéndose a hacer la dilución correspondiente.

No se descartaron los líquidos Xantocrómicos pues -- resultó interesante observar su comportamiento en este tipo de análisis y obtener conclusiones respecto a su empleo.

A continuación se menciona el fundamento de la técnica empleada donde se aprecia ampliamente la forma de uti

lización de las muestras obtenidas así como de los demás -
inmunorreactantes.

Es importante señalar que se debe tener cuidado en
la preparación y conservación de los reactivos utilizados_
y de las muestras empleadas a fin de mantener éstos lo más
apropiadamente posible para el estudio.

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA DE ANALISIS INMUNOLOGICO LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

En los últimos tiempos hemos tenido una gran popularización de esta técnica ya que se ha visto que es muy sensible y que no requiere de equipo especializado como es el utilizado en otro tipo de análisis.

Existen diferentes variedades de ELISA; ya que dependiendo su aplicación para buscar el antígeno o el anticuerpo será método indirecto o método del doble anticuerpo también llamado de sandwich.

En esta tesis el ensayo de ELISA se utilizó para la cuantificación de anticuerpos específicos contra el antígeno derivado proteínico purificado (PPD) de Mycobacterium tuberculosis (método indirecto).

INTRODUCCION:

La técnica de análisis inmunológico ligado a enzimas fue propuesta por primera vez por Van Weemen y Schuurs (1971) y Engvall y Perlman (1971), quienes vieron que combinando el uso de antígeno o anticuerpo inmóviles sobre una fase sólida con un antígeno o anticuerpo estando este conjugado a una enzima se obtenía un análisis con alta sensibilidad y especificidad.

Este análisis tiene como principio básico que el antígeno o el anticuerpo sea adherido a un soporte en el cual se lleva a cabo la reacción antígeno-anticuerpo y esta reacción se pone de manifiesto por medio de una reacción de tipo enzimático.

Este análisis se puede separar en los diferentes as
pectos:

- 1.- Fase sólida
- 2.- Aspectos del recubrimiento
- 3.- Conjugados
- 4.- Sustratos

1.- FASE SOLIDA.-

La fase sólida se realizó con una placa formada con material plástico (polipropileno) pudiéndose haber utilizado también placas hechas de poliestireno, polivinilo o de otros materiales como partículas de celulosa, poliacrilamidas, dextranos, silicon y vidrio microcristalino.

2.- ASPECTOS DEL RECUBRIMIENTO.-

La unión de nuestro antígeno a la fase sólida se -- realizó por medio de interacciones hidrófobas que son esencialmente irreversibles.

Se utilizó para lavar y para las diluciones un detergente no iónico que fue el Tween-20; previno las uniones inespecíficas de los inmunorreactantes naturalmente -- sin afectar la reacción antígeno-anticuerpo.

La concentración óptima para el forramiento de la -- fase sólida con el antígeno fue de 200 μ l. No se debe -- agregar antígeno de más ya que esto provocaría la desorción de los inmunorreactantes durante los tiempos de incubación.

El tiempo que se dejó el antígeno en la fase sólida

para su unión fue de toda la noche a temperatura ambiente.

Se utilizó una sustancia bloqueadora no relacionada con el sistema antígeno-anticuerpo que fue ASB (albúmina sérica bovina) después del forramiento de la placa con antígeno, ya que se vio que esto impide en gran medida las reacciones inespecíficas, a las cuales algunos autores nombran como reacciones de fondo o ruido de la prueba, que recubren los sitios que hayan quedado libres.

3.- CONJUGADOS.-

La sensibilidad de nuestra técnica dependió en gran parte del conjugado enzima-antígeno.

El conjugado que se utilizó consistió en una anti-inmunoglobulina a la cual se le adhirió una enzima que fue la fosfatasa alcalina.

Todas las reacciones de acoplamiento efectuadas proveen conjugados heterogéneos; al decir esto nos referimos a que contienen uniones enzima-antígeno y uniones enzima-enzima y antígeno-antígeno.

El conjugado producido por la unión de la enzima con el antígeno tiene como objetivo el retener la mayor parte de la actividad enzimática e inmunitaria; esto quiere decir que la actividad enzimática no va a ser inhibida durante la reacción antígeno-anticuerpo.

Para unir la enzima a la proteína, hay una amplia gama de agentes ligantes los cuales pueden ser mono, bi o multifuncionales; por ejemplo Cloruro Cianhdrico, p,p'di-

fluoro m',m'dinitrofenil sulfona (FNPS), disocianato de tolueno, carbodimidias solubles, periyodato de sodio y glutaraldehído.

El agente utilizado en nuestro sistema fue glutaraldehído el cual se encuentra dentro de los agentes ligantes considerados como bifuncionales.

Se debe tener cuidado de que el conjugado siempre esté en óptimas condiciones; para esto siempre se mantiene concentrado y se diluye en el regulador de fosfatos (PBS) antes de usarlo.

4.- SUSTRATO.-

En el caso de la fosfatasa alcalina el sustrato más conveniente es p-nitrofenil fosfato. El cual es fácil de encontrar comercialmente en forma de tabletas.

El tiempo de incubación de los inmunorreactantes durante el análisis fue de toda la noche a temperatura ambiente para el conjugado y 30 minutos a 37°C para el sustrato.

Productos completamente solubles y de alto coeficiente de extinción (densidad de calor por unidad degradada), fueron obtenidos con este sustrato.

La reacción enzimática fue detenida por medio de NaOH concentrado 3 M y el producto de esta reacción fue de color amarillo.

OBTENCIÓN DE RESULTADOS:

Los resultados pueden ser obtenidos por visualiza--

ción directa del color dado por la reacción enzimática - - cuando la muestra sea positiva a la presencia de IgG, ya - que en caso de ser ésta negativa no habrá desarrollo de - - color.

La lectura visual suele ser una manera rápida de saber si la muestra problema es positiva o negativa.

Otra forma de obtener los resultados positivos o negativos a la presencia de IgG fue por medio de una lectura espectrofotométrica utilizando un filtro de 405 μ m.

Siendo este método más confiable que el método visiual, ya que siendo una muestra positiva mostrará una intensidad de coloración muy tenue, pudiera dar visualmente falso negativo.

DETERMINACION DE ANTICUERPOS IgG PARA PPD

METODO

- 1.- Recubrir los pozos con 2.5 microgramos (200 ul) del antígeno PPD (disuelto en regulador de recubrimiento), incubar toda la noche a temperatura ambiente.
- 2.- Al día siguiente se lavan los pozos tres veces con solución reguladora salina de fosfatos adicionada con -- 0.05% de Tween 20 (PBS-T).
- 3.- Agregar 300 ul de suero bovino fetal (FBS) a todos -- los pozos e incubar 1 hora a temperatura ambiente. -- luego el FBS es removido lavando los pozos tres veces con PBS-T. Las placas pueden ser usadas inmediatamente o pueden almacenarse a 4°C durante varias semanas.
- 4.- Las muestras de líquido cefalorraquídeo se diluyen 1:15 en 5% FBS; agregar a los pozos por duplicado 200 ul de la dilución. Incubar durante tres horas a temperatura ambiente; después se lavan los pozos tres veces con PBS-T.
- 5.- Agregar 200 ul de IgG antihumano diluido 1:500 en 5 % de FBS, incubar por dos horas a temperatura ambiente; después de este tiempo los pozos se lavan tres veces con PBS-T.
- 6.- Agregar 200 ul de conejo IgG anticabra acoplado con fosfatasa alcalina diluido 1:320 en 5% de FBS a todos los pozos e incubar toda la noche a temperatura ambiente.

- 7.- Al siguiente día lavar los pozos tres veces con PBS - T y agregar a todos los pozos 100 μ l del sustrato - - p-nitrofenilfosfato.
- 8.- Después de 30 minutos de incubación a 37°C la reacción se detiene añadiendo 100 μ l de NaOH 3M. La densidad óptica se determina con un espectrofotómetro, calibrando con el sustrato y leerse a 450 nm.

MATERIAL UTILIZADO PARA LA REALIZACION DEL METODO
UTILIZADO PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS IgG

ANTIGENO PPD:

El derivado proteínico purificado se prepara del crecimiento de bacilos tuberculosos en medios sintéticos; después de matar a los bacilos por autoclave, se filtra y del medio de cultivo se precipitan proteínas libres con sulfato de amonio.

El PPD utilizado se obtuvo de:
Connaught Laboratories Limited
Willowdale, Ontario Canada
Lot A 28
Concentración 2 mg/ml

Obtenido a través de la Universidad de Baylor de Houston Texas.

MICROPLACAS:

Se utilizaron las microplacas de tiras removibles y microplacas de tiras fijas, Immunolon II. Conteniendo las tiras removibles 12 pozos cada una de ellas y las tiras fijas con 96 pozos.

Las microplacas utilizadas fueron de:
Dynatech Laboratories, Inc.

MUESTRA:

Líquido cefalorraquídeo obtenido de pacientes de

versos hospitales y con desórdenes en el Sistema Nervioso Central (meninges). A los cuales se les determinó la presencia de Inmunoglobulina IgG contra PPD.

Las muestras obtenidas no tenían ninguna característica específica y fueron tomadas al azar; de edades variables y de ambos sexos.

IgG CABRA ANTIHUMANO:

Se utilizó IgG de cabra antihumano procedente de:

Cappel Laboratories
Lot # 042181

IgG CONJUGADO DE CONEJO ANTICABRA:

Se utilizó de:

Cappel Laboratories
Lot # 21097

TWEEN 20:

(Polyxythylene sorbitan monolaurate), se utilizó:

Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.
Lot # 085 F 0393

DIETANOLAMINA:

Fue obtenido a través de la Universidad de Baylor - de Houston Texas.

Lot # D 8885

SUBSTRATO P-NITROFENIL FOSFATO:

Solución de substrato p-nitrofenil fosfato. Se --
utilizó:

Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.
Sigma 104
Lot # 64F - 6105

Una tableta (5 mg) se disuelve en 5 ml de 10% del -
buffer de dietanolamina.

PBS (pH 7.4):

8.0 g NaCl
0.2 g KH_2PO_4
0.2 g KCl
2.9 g $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ (6 1.15 g Na_2HPO_4 anhidro)

Se prepara en un matraz aforado a un litro con agua
destilada.

PBS-TWEEN:

Se utiliza PBS (pH 7.4)

0.5 ml Tween 20
0.2 ml NaN_3

Se prepara en un matraz aforado a un litro con agua
destilada.

10% DIETANOLAMINA BUFFER:

97.0 ml dietanolamina
0.2 g NaN_3

0.1 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
 800 ml agua destilada

Se añade HCL 1 M para ajustar el pH a 9.8. Se afora todo en un matraz aforado a un litro con agua destilada.

HIDROXIDO DE SODIO (NaOH 3 M):

120 g NaOH

La reacción enzimática del sustrato de fosfatasa alcalina es detenida con NaOH 3 M. Los gramos de NaOH se agregan a un matraz aforado a un litro con agua destilada.

RESULTADOS

Se investigó la presencia de Inmunoglobulina IgG -- en 3 grupos diferentes como ya se mencionó anteriormente:

Grupo de Sexo Femenino

Grupo de Sexo Masculino

Grupo de Recién Nacidos (ambos sexos)

Todas las densidades ópticas que se obtuvieron se trabajaron en tablas que muestran valores de estadística diferencial, los cuales tienen como objeto extraer conclusiones útiles sobre la totalidad de todas las observaciones posibles de que se trata, basándonos en la información que se recolectó.

En la Tabla I se indica el número de muestras investigadas en cada uno de los grupos, así como el número de muestras positivas y negativas y el porcentaje de positividad de cada uno de dichos grupos.

También se muestra una tabla II con medidas de tendencia central, las cuales nos muestran el valor típico -- representativo del conjunto de densidades ópticas que se obtuvieron; éstas fueron obtenidas trabajando por separado las muestras con presencia positiva de Inmunoglobulina IgG y las muestras con presencia negativa de Inmunoglobulina IgG.

Se obtuvo una tabla III de medidas de dispersión en la cual se muestra el grado en que los datos obtenidos de las densidades ópticas de las diferentes muestras, se dispersan alrededor de un valor medio; al igual que las tablas anteriores se trabajaron por separado muestras positivas y las muestras negativas.

Todos los grupos investigados muestran tabla de frecuencia obtenida para facilitar la observación de las densidades ópticas acomodadas según las veces en que en un intervalo determinado, se vio la misma densidad óptica teniendo la representación gráfica de la misma.

En general se tuvo una positividad de 7.4% sacando este porcentaje de todas las muestras trabajadas independientemente de los diferentes grupos estudiados.

TABLA I

RESULTADOS DEL METODO DE ELISA USADO PARA
DETECTAR LA ACTIVIDAD DEL ANTICUERPO
IgG PARA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
EN LIQUIDOS CEFALORRAQUIDEOS.

GRUPOS	NUMERO DE MUESTRAS	NUMERO DE MUESTRAS POSITIVAS	NUMERO DE MUESTRAS NEGATIVAS	PORCENTAJES POSITIVOS
Grupo I.-				
Pacientes masculinos	70	7	63	10 %
Grupo II.-				
Pacientes femeninos	64	5	59	7.8%
Grupo III.-				
Pacientes Recién Nacidos	29	1	28	3.4%
Total de Pacientes	163 = 100%			

TABLA II

DISTRIBUCION DE LOS VALORES INDIVIDUALES PARA
LA DENSIDAD OPTICA DE 405 NM PARA LOS DIFE-
RENTES GRUPOS ESTUDIADOS

GRUPOS	RANGO DE DENSIDAD	RECORRIDO O RANGO	MEDIA	MEDIANA	MODA
PNGN	(.021 - .287)	.266	.101	.095	.149
PNGP	(.420 - .976)	.556	.545	.605	.698
PFGN	(.020 - .268)	.248	.107	.096	.094
PFGP	(.423 - .855)	.432	.603	.603	.639
PRNGN	(.024 - .205)	.181	.090	.070	.039

- PMGN = Pacientes Masculinos sin presencia de IgG.
 PMGP = Pacientes Masculinos con presencia de IgG.
 PFGN = Pacientes Femeninos sin presencia de IgG.
 PFGP = Pacientes Femeninos con presencia de IgG.
 PRNGN = Pacientes Recién nacidos sin presencia de IgG.

TABLA III.

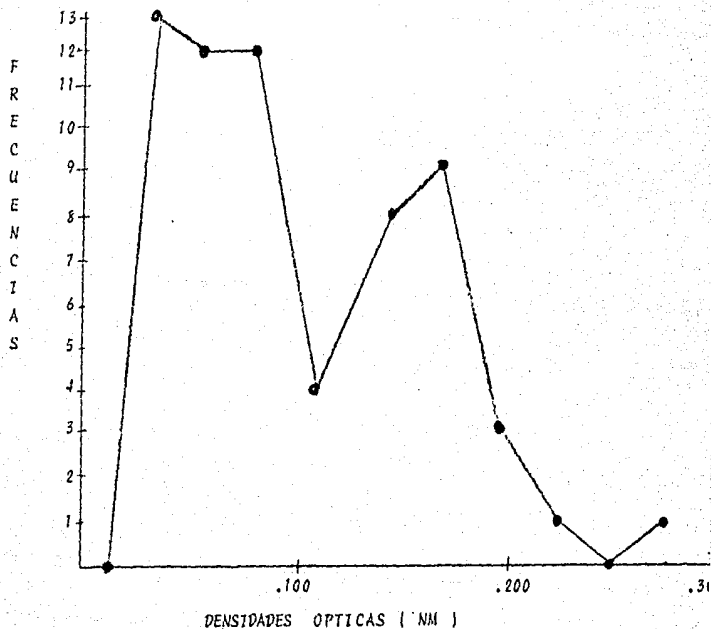
MEDIDAS DE DISPERSION OBTENIDAS DE LOS DIFERENTES GRUPOS ESTUDIADOS CON EL METODO DE ELISA - DETERMINANDO IgG

GRUPOS ESTUDIADOS	DESVIACION MEDIA	DESVIACION TIPICA	COEFICIENTES DE VARIACION
PMGN	.003	.059	16 %
PMGP	.025	.159	29.1 %
PFGN	.003	.057	53.3 %
PFGP	.019	.138	22.9 %
PRNGN	.003	.052	57.8 %

A) TABLA DE FRECUENCIA PACIENTES MASCULINOS
GRUPO SIN PRESENCIA DE IgG

INTERVALO	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR	MARCA DE CLASE	FRECUENCIA
1)	.019	.046	.033	13
2)	.046	.073	.060	12
3)	.073	.100	.087	12
4)	.100	.127	.114	4
5)	.127	.154	.141	8
6)	.154	.181	.168	9
7)	.181	.208	.195	3
8)	.208	.235	.222	1
9)	.235	.262	.249	0
10)	.262	.289	.276	1
				63

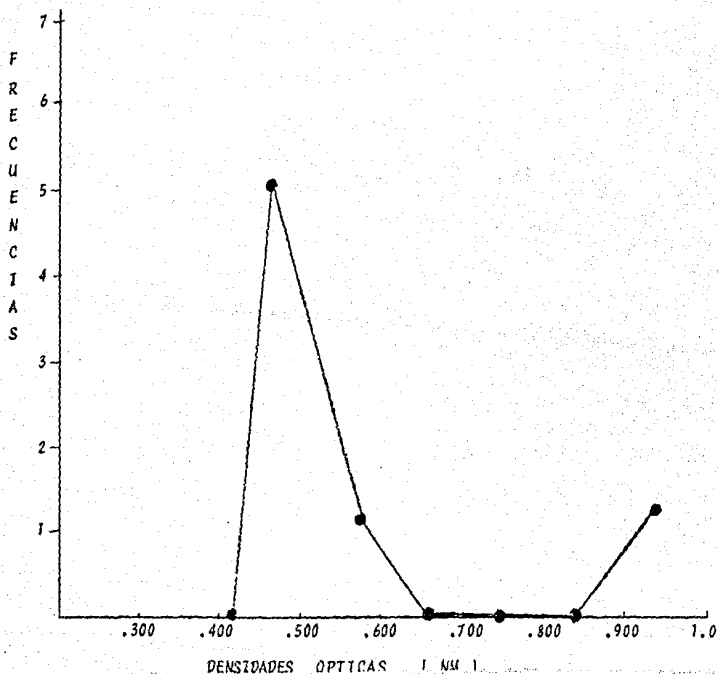
REPRESENTACION GRAFICA DE LA TABLA DE FRECUENCIA
PACIENTES MASCULINOS SIN PRESENCIA DE IgG



B) TABLA DE FRECUENCIA PACIENTES MASCULINOS GRUPO
CON FRECUENCIA DE IgG

INTERVALO	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR	MARCA DE CLASE	FRECUENCIA
1)	.419	.512	.466	5
2)	.512	.605	.559	1
3)	.605	.698	.652	0
4)	.698	.791	.745	0
5)	.791	.884	.838	0
6)	.884	.997	.931	1
				7

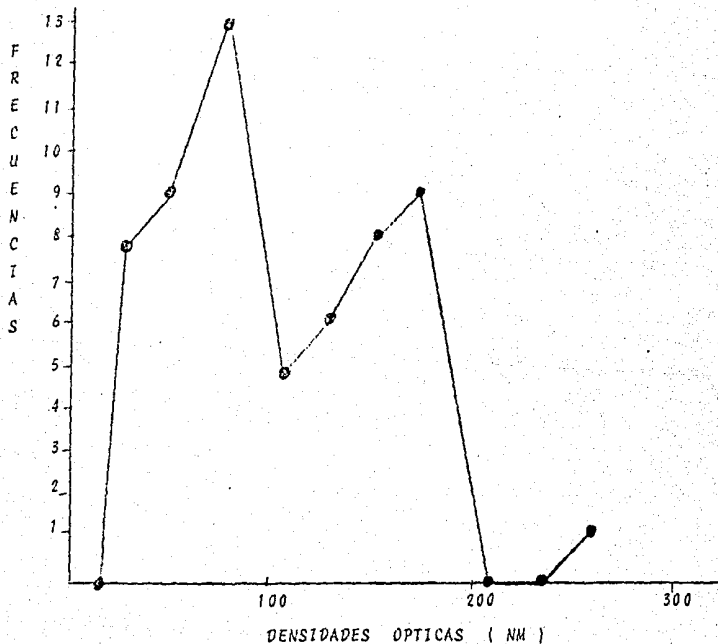
REPRESENTACION GRAFICA DE LA TABLA DE FRECUENCIA
PACIENTES MASCULINOS CON PRESENCIA DE IgG



C) TABLA DE FRECUENCIA PACIENTES FEMENINOS GRUPO
SIN PRESENCIA DE IgG

INTERVALO	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR	MARCA DE CLASE	FRECUENCIA
1)	.019	.044	.032	8
2)	.044	.069	.057	9
3)	.069	.094	.082	13
4)	.094	.119	.107	5
5)	.119	.144	.132	6
6)	.144	.169	.157	8
7)	.169	.194	.182	9
8)	.194	.219	.207	0
9)	.219	.244	.232	0
10)	.244	.269	.257	1
				59

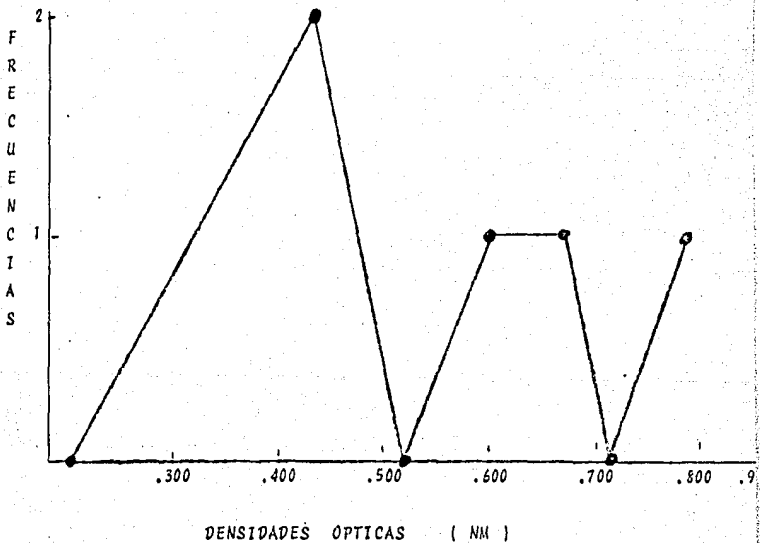
REPRESENTACION GRAFICA DE LA TABLA DE FRECUENCIA
PACIENTES FEMENINOS SIN PRESENCIA DE IgG



D) TABLA DE FRECUENCIA PACIENTES FEMENINOS GRUPO
CON PRESENCIA DE IgG

INTERVALO	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR	MARCA DE CLASE	FRECUENCIA
1)	.420	.493	.457	2
2)	.493	.566	.530	0
3)	.566	.639	.603	1
4)	.639	.712	.679	1
5)	.712	.785	.749	0
6)	.785	.858	.822	1
				5

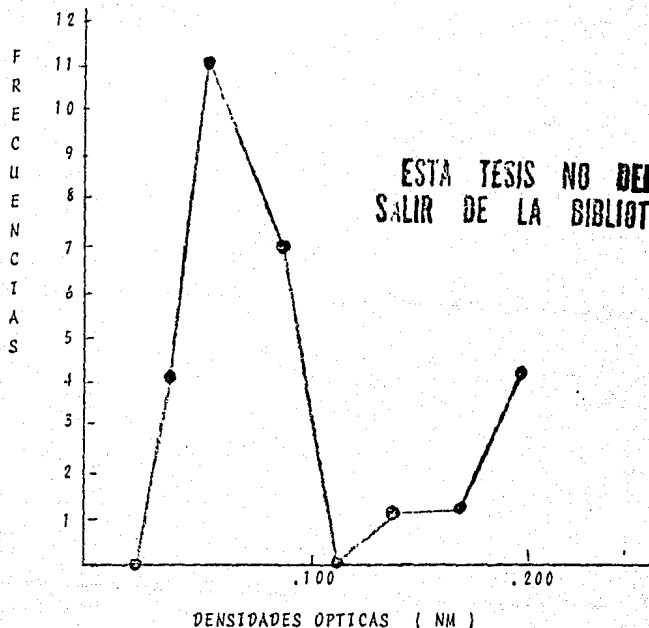
REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA TABLA DE FRECUENCIA
PACIENTES FEMENINOS CON PRESENCIA DE IgG



E) TABLA DE FRECUENCIA PACIENTES RECIEN NACIDOS
GRUPO SIN PRESENCIA DE IgG

INTERVALO	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR	MARCA DE CLASE	FRECUENCIA
1)	.020	.047	.034	4
2)	.047	.074	.061	11
3)	.074	.101	.088	7
4)	.101	.128	.115	0
5)	.128	.155	.140	1
6)	.155	.182	.169	1
7)	.182	.209	.196	4
				28

REPRESENTACION GRAFICA DE LA TABLA DE FRECUENCIA. PACIENTES RECIEN NACIDOS GRUPO SIN PRESENCIA DE IgG



CONCLUSIONES

Usualmente el diagnóstico de Meningitis tuberculosa causada por Mycobacterium tuberculosis, se basa en la historia de exposición, cuadro clínico, características del líquido cefalorraquídeo, prueba tuberculina positiva, BAAR y el cultivo de Mycobacterium tuberculosis.

Sólo 55 a 75% de los pacientes presentan la baciloscopia y el cultivo positivos.

Para llegar al rápido diagnóstico de los diferentes tipos de tuberculosis se ha tratado de emplear otro tipo de métodos; pero aún siendo estos útiles tienen problemas para realizarse, ya que requieren de reactivos e instrumentos muy sofisticados; no teniendo éstos disponibles en la mayoría de los laboratorios o siendo éstos de difícil adquisición.

Se comprobó que el método Inmunoenzimático (ELISA) ha resultado ser un método simple y rápido en la detección de anticuerpos contra el derivado proteínico purificado -- (PPD) de Mycobacterium tuberculosis.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la importancia de la utilización del método de ELISA para la identificación en líquidos cefalorraquídeos de Inmunoglobulina IgG para poder identificar cuáles de los líquidos cefalorraquídeos pertenecían a pacientes que hubieran estado en contacto con la bacteria o que estuvieran cursando con la enfermedad activa; así mismo se pudiera decir que los pacientes con presencia positiva de IgG sólo presentarán un foco aislado sin tener la enfermedad activa.

De 163 muestras analizadas se encontró la presencia

de IgG en 13 muestras pertenecientes a los diferentes grupos estudiados.

Dentro de las 70 muestras de los pacientes del grupo de sexo masculino se encontraron 7 muestras con presencia de IgG; en este grupo se tuvieron tres líquidos cefalorraquídeos controles de pacientes en que su historia clínica mostraba comprobación de otra enfermedad y no mostraron antecedentes de tuberculosis; el rango de densidad óptica de estos pacientes fue (0.030 - 0.033) encontrándose este rango muy por debajo del rango dado por los líquidos cefalorraquídeos con presencia de Inmunoglobulina IgG pertenecientes a este grupo y que fue de (0.425 - 0.976).

El control positivo fue obtenido de un paciente al cual se le comprobó una tuberculosis.

Se estudiaron 65 muestras de pacientes del sexo femenino; en este grupo solamente 5 muestras mostraron positividad a la presencia de IgG.

Al igual que en el grupo anterior, en este grupo se contó con 3 muestras que mostraron por su historia clínica ser controles negativos teniendo estos pacientes un rango de densidad óptica de (0.020 - 0.033) encontrándose este rango muy por debajo del rango dado por los líquidos cefalorraquídeos con presencia de IgG que fue de (0.423 - 0.855).

En los recién nacidos sólo en una muestra de las 29 estudiadas se encontró la presencia de IgG en el líquido cefalorraquídeo, pero se pudo comprobar que éste fue un falso positivo debido al color xantocrómico del mismo; pudiéndose concluir que un líquido cefalorraquídeo con un al

to color xantocrómico causa un falso positivo debido a que la reacción enzimática muestra una coloración amarilla y si al hacer la dilución de nuestra muestra, está ya de por sí esta coloreada, es lógico que su lectura en el espectrofotómetro sea arriba de nuestros valores de corte; inclusive, podría esta muestra darnos una lectura arriba de la -- que se encontró con el control positivo.

De lo anterior se concluye que en el grupo de las -- muestras pertenecientes a los pacientes masculinos hubo -- una mayor presencia de Inmunoglobulina IgG que en el grupo de pacientes del sexo femenino.

También se concluye que en los recién nacidos no -- hay presencia de Inmunoglobulina IgG; a pesar de que en -- algunos artículos se habla de que una madre tuberculosa -- puede transmitirle al producto esta Inmunoglobulina por vía placentaria; en este estudio no se demostró ningún caso de este tipo.

También se concluyó que los líquidos cefalorraquí-- deos xantocrómicos son causa de falsos positivos, ya que -- dado que la reacción enzimática que se efectúa es de color amarillo y estando la muestra de este color altera la densidad óptica aumentando el valor real de la lectura.

Se demostró que la técnica ELISA muestra ser rápida y sencilla en la detección de anticuerpos.

En este trabajo sólo se determinó la Inmunoglobuli-- na IgG, la cual sólo nos dice su presencia positiva que el paciente estuvo en contacto con la bacteria, así como tam-- bién nos dice que posiblemente el paciente tenga un foco --

aislado o también pudiera ser que el paciente cursara con la enfermedad activa.

Se tiene bibliografía en la cual hay trabajos realizados con ambas Inmunoglobulinas (IgG e IgM) siendo éstos representativos de que se ha determinado que efectivamente ELISA en un momento no muy lejano se podrá poner como técnica diagnóstica ya que en dichas investigaciones no muestra gran porcentaje de reacciones cruzadas y muestra una alta sensibilidad y especificidad, pero desgraciadamente - como se dijo anteriormente, sigue mostrando reacciones cruzadas por lo que no se ha podido llegar a una sensibilidad y especificidad del 100%.

Este trabajo demostró que la técnica puede estar al alcance de cualquier laboratorio; teniendo como único inconveniente el que los reactivos se obtienen del extranjero.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Arellano R.M.T., Calderón J.E., Sánchez M.R.M.
Tuberculosis y Embarazo
Infectología (1983),
- 2.- Bal V., Kamat R.S., Kamat J., Kandoth P.
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay For Mycobacterial --
Antigens.
Indian J. Med. Res. 78, October 1983, pp. 477-483.
- 3.- Benjamin R.G., Daniel T.M.
Serodiagnosis of Tuberculosis Using The Enzyme-Linked
Immunosorbent Assay (ELISA) of Antibody to Mycobac-
terium Tuberculosis Antigen 5¹⁻³
American Review of Respiratory Disease 1982; 126:1013-
1016.
- 4.- Benjamin R.G., Debanne S.M., Daniel T.M.
Evaluation of Mycobacterial Antigens in an Enzyme-Lin-
ked Immunosorbent Assay (ELISA) for The Serodiagno--
sis of Tuberculosis.
Journal of Clinical Microbiology. Vol. 18 (1984). 309-
318.
- 5.- Bortolussi Robert
Diagnóstico Inmediato de Meningitis
Diciembre de 1984
Tribuna Médica.
- 6.- Bu E., Cate R.T., Six R.H.
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in the Diagnosis of
Tuberculosis Meningitis.
1986 ASM Annual Meeting. Washington, D.C. 23-28 March 1986.

- 7.- Calderón Jaime Ernesto
Tuberculosis y Riesgo Perinatal
Infectología, Año IV, Num. 8, Agosto (1984).
- 8.- Daniel T.H., Balestrino E.A., Balestrino O.C., Davidson P.T., Debanne S.H., Kataria S., Kataria Y.P., and Scocozza J.B.
The Tuberculin Specificity of Humans of Mycobacterium Tuberculosis Antigen 5¹⁻³.
American Review of Respiratory Disease 1982; 126:600 - 606.
- 9.- Hernández L.J., Santos A.L.
Aspectos Relevantes del Inmunoanálisis Enzimático (ELISA)
Infectología, Año V, Num. 2, Febrero (1985). 52
- 10.- Hernández R., Muñoz O., Guiscafre H.
Sensitive Enzyme Immunoassay for Early Diagnosis of Tuberculosis Meningitis.
Journal of Clinical Microbiology. Sep.1984.
- 11.- Kalish S.B., Radin R.C., Phair J.P., Levitz D., Zeiss C.R., and Metzgar E.
Use of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Technique in the Differential Diagnosis of Active Pulmonary Tuberculosis in Humans.
The Journal of Infectious Diseases. Vol. 147, No. 3. - March 1983.
- 12.- Kanetsuma Fuminori
Bactericidal Effect of Fatty Acids on Mycobacteria, -- with Particular Reference to the Suggested Mechanism of Intracellular Killing.
Microbiology and Immunology. Vol.29 (2), 127-141, 1985.

- 13.- Kleinhens M.E., Eliner J.J.
Immunoregulatory Adherent Cells in Human Tuberculosis: Radiation Sensitive Antigen-Specific Suppression by Monocytes.
The Journal of Infectious Diseases. Vol. 152, No. 1 .
July 1985.
- 14.- Neu H.C.
CNS Infection First Things First
Hospital Practice. November 30, 1985.
- 15.- Radin R.C., Zeiss C.R., Phair J.P.
Antibodies to Purified Protein Derivative in Different Immunoglobulin Classes in the Diagnosis of Tuberculosis in Man.
Int. Archs Allergy appl. Immunology 70:25-29 (1983).
- 16.- Reggiardo Z., Aber V.R., Mitchison D.A., Devi S.
Hemagglutination Tests of Tuberculosis with Mycobacterial Glycolipid Antigens.
American Review of Respiratory Disease 1981. 124: 21-25.
- 17.- Sada E., Ruiz P.G.M., López V.V., Ponce de L. E.
Detection of Mycobacterium Antigens in Cerebrospinal Fluid of Patients with Tuberculosis Meningitis by - - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.
The Lancet. Septiembre 17, 1983.
- 18.- Santos A.L., Hernández L.J., Quezada P.F., Estrada P.S.
Estandarización del Inmunoanálisis Enzimático
Infectología, Año VI, Num. 1 Enero (1986).

- 19.- Viljanen M.K., Eskola J., Tala E.
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Antibodies to Purified Protein Derivative of Tuberculin - - (PPD). IgM-, IgA-, and IgG- anti PPD Antibodies in -- Active Pulmonary Tuberculosis.
European Journal of Respiratory Diseases. 1982. 63 : 257-262.
- 20.- Zeiss C.R., Kalish S.B., Erlich K.S., Levitz D., - - Metzger E., Radin R., Phair J.P.
IgG Antibody to Purified Protein Derivative by Enzyme Linked Immunosorbent Assay in the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis
American Review of Respiratory Disease 1984. 130: 845-848.
- 21.- Sojalil J.L.F., Santoseoy G.G., Rodriguez H., Sosa -- M.J.
Microbiología Médica Tomo II
México, D.F., Francisco Méndez Oteo, 1981.
- 22.- Davis D.B., Dulbecco R., Eisen N.H., Ginsber H.S., - - Wood W.B.
Microbiology Including Immunology and Molecular Genetics
Third Edition
United States of America
Harper Row, Hagerstown, 1980.
- 23.- Davidson K., Bernard H.J.
Todd-Sanford Diagnóstico Clínico por el Laboratorio
Sexta Edición
Barcelona, España
Editorial Salvat, 1978.

- 24.- Jawetz E., Melnick J.L.
Manual de Microbiología Médica
Novena Edición
México
Editorial El Manual Moderno, 1981.
- 25.- Koneman E.W., Allen S.D., Dowell (H.) V.R., Sommers H.M.
Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas Color
Primera Edición
Buenos Aires, Argentina
Editorial Médica Panamericana S.A. de C.V., 1983.
- 26.- Krugmen S., Katz S.L.
Enfermedades Infecciosas
Séptima Edición
México, D.F.
Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V., 1985.
- 27.- Lynch M.J., Raphael S.S., Mellor L.D., Spare P.D.,
Inwood M.J.H.
Métodos de Laboratorio
Segunda Edición
México, D.F.
Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V., 1982.
- 28.- Pelczar H.J., Reid R.D., Chan E.C.S.
Microbiología
México, D.F.
Mc Graw Hill S.A. de C.V., 1982.

- 29.- Robbins Stanley L.
Patología Estructural y Funcional
Segunda Edición
México, D.F.
Editorial Panamericana, 1984.
- 30.- Zinsser, Hans
Microbiología
Decimoséptima Edición
México, D.F.
Editorial Panamericana S.A. de C.V., 1980.