



*Universidad Nacional Autónoma
de México*

*Escuela Nacional de Estudios Profesionales
Iztacala*

*“DIAGNOSTICO DE MENINGITIS TUBERCULOSA
POR EL METODO DE “ELISA”*

T E S I S
Que para obtener el título de
B I O L O G O
presenta

Sofia Rebeca Hernández Alvarado

Los Reyes Iztacala

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Trabajo realizado en el Departamento de Enferme-
dades Infecciosas y Parasitarias. Laboratorio de
Virología. Hospital Infantil de México "Dr. Federi-
co Gómez"; bajo la asesoría del Dr. Jesús Casasola
Flores.

AL MIS PADRES:

Con un gran amor, Respeto y Admiración
a quienes en mi forjaron con su ejemplo, el
deseo de lucha y superación.

AL MIS HERMANOS:

Con un inmenso cariño a quienes
confían en mi y han logrado mantener
una unión familiar donde se alberga
el amor y apoyo que impulsan a alcan-
zar cualquier meta.

AL ING. MARUL ALFONSO GONZALEZ GONZALEZ:

Por su gran ayuda, pacien-
cia y dedicación a este traba-
jo.

R. Q.E.P. FERNANDO GUERRA INFANCE:

Quien ha sido en mi ejemplo y
gula del quehacer científico.

De quien aprendí que la ciencia
no admite corrupción y al trabajarla
con honestidad nos lleva siempre a la
verdad.

Que el verse y sentirse vencido
es fracasar.

Que el caer y levantarse es
triunfar.

Expongo mi más profundo agradecimiento a:

Dr. Jesús Casasola Flores por su asesoría en la realización de este trabajo.

Q.F.B. María del Pilar García Roca.

Q.F.B. Saul Torres Alcantara.

Biol. Gloria Celaya Esurto.

Todo el personal que labora en el Departamento de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital Infantil de México "Dr. Federico Gómez".

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Instituto Nacional de Higiene.

EL JURADO:

M. en C. Martha Ofelia Salcedo Alvarez.

Q.B.P. Bulmaro Correa Meza.

Dr. Jesus Casasola Flores.

Biol. Agustín Vargas Vera.

Biol. Jaime Escobar Herrera.

INDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCION.....	2
2. ANTECEDENTES:	
2.1. EPIDEMIOLOGIA.....	4
2.2. CARACTERISTICAS PRINCIPALES DEL BACILO DE LA TUBERCULOSIS.....	4
2.3. ANTIGENICIDAD.....	5
2.4. VIRULENCIA.....	6
2.5. INMUNOLOGIA.....	6
2.6. PATOGENIA Y CUADRO CLINICO DE LA MENINGITIS TUBERCULOSA.....	7
2.7. DIAGNOSTICO DE LA MENINGITIS TUBERCULOSA.....	8
2.7.1. METODOS INDIRECTOS.....	9
2.7.2. METODOS DIRECTOS.....	11
3. OBJETIVOS.....	14
4. METODOLOGIA:	
4.1. CULTIVO BACTERIOLOGICO.....	15
4.2. EXTRACTO ANTIGENICO SOLUBLE.....	15
4.3. PACIENTES.....	16
4.4. DETECCION DE ANTICUERPOS.....	17
4.5. OBTENCION DE SUERO HIPERINMUNE.....	18
4.6. DETECCION DE ANTIGENO.....	21
5. RESULTADOS.....	24
6. DISCUSION.....	49
7. CONCLUSION.....	57
8. APENDICE:	
APENDICE I: MEDIOS DE CULTIVO.....	59
APENDICE II: REACTIVOS.....	62
APENDICE III: PROCEDIMIENTOS.....	65

APENDICE IV: FIGURAS.....	69
9. BIBLIOGRAFIA.....	72

RESUMEN:

La meningitis tuberculosa representa un serio problema de salud pública a nivel mundial, afectando principalmente a niños en edad pediátrica y personas de edad avanzada. En nuestro trabajo se pretende la detección de antígenos específicos y anticuerpos dirigidos a mycobacterias presentes en líquido cefalorraquídeo (LCR) de individuos con meningitis tuberculosa.

El análisis inmunoenzimático ELISA es un método adecuado para el diagnóstico de la meningitis tuberculosa. Esta prueba tiene una alta sensibilidad y especificidad, la cual depende del antígeno empleado. En nuestro trabajo se utilizaron extractos antigénicos de M. tuberculosis y M. bovis, reportando una eficacia del 79% y 95.8% respectivamente.

La determinación de anticuerpos del isotipo IgG permite establecer un diagnóstico certero de la enfermedad, mientras que IgM puede llevar a la confusión con resultados falsos positivos o negativos.

La ELISA directa permite la detección de antígenos mycobacteriales presentes en LCR, mostrando una especificidad del 100% al ser comparados grupos de pacientes con cuadro clínico presuntivo de meningitis tuberculosa, piógena y viral.

1. INTRODUCCION

En México la Meningitis es un padecimiento con altos índices de morbilidad y mortabilidad, siendo muy frecuentes en niños menores de cinco años. Son varios los microorganismos causantes de dicha enfermedad; pueden ser tanto virus y rickettsias, así como bacterias, protozoarios y hongos. Dentro de los microorganismos causales más frecuentes encontramos a Haemophilus influenzae tipo B, Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis, Streptococcus tipo B, Mycobacterium tuberculosis, Escherichia coli y Criptococcus neoformans (Nuñez, O.L. 1986).

De acuerdo con los últimos estudios epidemiológicos (1982-1986) la Meningitis causada por Mycobacterias presenta un porcentaje muy alto de mortalidad en México, alcanzando alrededor de un 34.2% de las defunciones causadas por tuberculosis en niños de edad pediátrica (Calderón, A.V. 1987).

Las manifestaciones clínicas de la Meningitis tuberculosa varían y a veces no existen síntomas meníngeos hasta el estadio terminal de parálisis y coma. Son muy frecuentes las secuelas físicas y mentales, como son el retardo mental, trastornos en la conducta y regresión psicomotriz, así como lesiones en la región basal por calcificaciones. Estas secuelas pueden permanecer y en algunos casos provocar la muerte del individuo (Waldo, E. y col. 1971). Por lo que se requiere de un diagnóstico rápido y preciso que permita establecer un tratamiento adecuado y dar un mejor manejo al paciente. Actualmente el diagnóstico se

apoya en parámetros clínicos y bioquímicos así como en el cultivo bacteriológico, el cual requiere de periodos de cuatro semanas mínimo de incubación, de la misma manera se utilizan técnicas de tinción que permiten la identificación del agente causal, sin embargo los resultados positivos a las pruebas es tan solo de un 75% y 55% respectivamente, por lo que el diagnóstico es impreciso y tardío.

Por ello se requiere de una prueba de laboratorio que sea rápida y confiable. Hasta el momento diversos grupos de investigadores han desarrollado un gran número de pruebas de diagnóstico rápido tales como: precipitación en tubo capilar, aglutinación pasiva en latex, división de bromuro, radioinmunoanálisis, contraimmunoelectroforesis e inmunofluorescencia, pero tienen la desventaja de tener algunas baja especificidad y sensibilidad o bien requerir de equipo sofisticado por lo que se eleva su costo.

La prueba de ELISA (Enzyme Linke Immunosorbent Assay) puede ser empleada como un método de diagnóstico rápido y específico para la detección de antígenos o anticuerpos en contra de Mycobacterium tuberculosis o Mycobacterium bovis causantes de la Meningitis tuberculosa.

2. ANTECEDENTES

2.1. EPIDEMIOLOGIA:

La meningitis tuberculosa es una enfermedad que ha sido representada como un serio problema de salud pública a nivel mundial. De acuerdo con los últimos estudios epidemiológicos (1982-1986) la meningitis causada por mycobacterias presenta un porcentaje muy alto de morbilidad y mortalidad en México, alcanzando alrededor de un 34.2% de las defunciones causadas por tuberculosis en menores de cinco años de edad, mientras que la proporción de muerte por tuberculosis meníngea entre los demás grupos de edad es solo de 4.2% y en menores de un año a descendido dos veces siendo mucho ms frecuente en personas de edad avanzada y existiendo una mayor incidencia en el sur y el Golfo de México, (Cárdenas,A.V. 1987).

2.2. CARACTERISTICAS PRINCIPALES DEL

BACILO DE LA TUBERCULOSIS:

La meningitis tuberculosa es causada principalmente por dos especies bacterianas, Mycobacterium tuberculosis y Mycobacterium bovis que son bacilos ácido alcohol resistentes y se desarrollan usualmente en medios sintéticos como Lowenstein Jensen y Proskawer & Beck, presentando un crecimiento lento. Como se sabe M. tuberculosis presenta un tiempo generacional entre 10 y 15h en medios favorables y de 20 a 24 h en medios sintéticos, (Yuman,M.D. 1979).

Las reacciones bioquímicas de los bacilos de la tuberculosis son pocos seguros, ya que debido a incubaciones tan prolongadas tienden a dar resultados contradictorios, posiblemente debido a la liberación y descomposición de ácidos orgánicos (Burrows,W. 1968).

Su pared celular presenta un grosor de 20nm y está constituida por tres fracciones; una fracción de proteínas unida a una fracción cerea; una segunda fracción de polisacáridos y una última fracción de lípidos la cual conforma el 60% del peso seco de la pared celular y el 40% del peso seco del bacilo. Uno de los componentes más importantes de la fracción lipídica es el ácido arabinogalactosa-mucopeptido que conforma una barrera que le da el caracter hidrofóbico de las mycobacterias, así como la tendencia a adherirse entre si durante su crecimiento en medios acuosos y flotar en la superficie, al igual que la impermeabilidad a los ácidos y alcalis y su difícil crecimiento debido a la dificultad que tienen para el paso de nutrientes, (Yuman,M.D. 1979; Davis,B. y Col. 1973).

2.3. ANTIGENICIDAD:

La antigenicidad del bacilo de la tuberculosis se refiere a los constituyentes antigénicos de las células mycobacteriales, los cuales pueden ser tanto polisacáridos, proteínas y peptidos de la pared celular, así como proteínas citoplasmáticas. Algunos de estos son antígenos específicos y otros son encontrados en

diversas especies bacterianas patógenas para el hombre, constituyendo así las llamadas reacciones cruzadas, (Yuman, M.D. 1979).

Se han publicado una gran cantidad de trabajos sobre la separación, identificación y aislamiento de antígenos mycobacteriales (Editorial, 1973; Daniel, T. y Jawck, B. 1978), reportando una elevada heterogenicidad antigénica entre las mycobacterias y algunos otros géneros de bacterias como Salmonella, Streptococcus, Nocardia y Haemophilus, al igual que algunos hongos como Histoplasma, Coccidioides y Criptococcus, (Hernández y Col. 1984).

Se han encontrado componentes antigénicos de M. tuberculosis formando complejos inmunes circulantes en el suero de pacientes tuberculosos y se ha observado que tienen efectos reguladores de la respuesta inmune humoral.

2.4. VIRULENCIA:

La virulencia o la capacidad del bacilo de la tuberculosis para producir una enfermedad progresiva involucra factores como: la presencia de productos tóxicos como es el factor Cuerda, algunos lípidos, el requerimiento de oxígeno, la presencia de catalasa y la habilidad de solubilizar el hierro, (Yuman, M.D. 1979).

2.5. INMUNOLOGIA:

La respuesta inmune de la tuberculosis se inicia por el contacto con el antígeno de M. tuberculosis manifestándose por

la producción de anticuerpos específicos y linfocitos sensibilizados derivados de linfocitos timodependientes. El predominio de estas células en esta enfermedad define la importancia del mecanismo de defensa celular sobre la respuesta humoral. Por lo que se deduce que simultáneamente a una respuesta celular se desencadena una respuesta humoral. Sin embargo, parece que las inmunoglobulinas tienen un papel secundario en la defensa contra M. tuberculosis por ser un parásito intracelular, pero aunque no participen directamente en la eliminación del bacilo, juegan un papel como moléculas reguladoras de la respuesta inmune celular de diferentes formas; 1) Evitando que el antígeno estimule las células inmunocompetentes por enmascaramiento de sus determinantes antigénicos. Cuando el anticuerpo es catabolizado, el antígeno puede nuevamente estimular al sistema inmune resultando así, la producción cíclica del anticuerpo. 2) Por interacción idiotipo-anti-idiotipo. 3) Previniendo la diferenciación exhaustiva de linfocitos competentes que pudieran resultar de una estimulación constante por el anticuerpo, (Vaca,G.O. 1985).

2.6. PATOGENIA Y CUADRO CLINICO DE

MENINGITIS TUBERCULOSA:

Una de las complicaciones más severas de la tuberculosis es la meningitis la cual es una inflamación de las membranas limitantes del espacio subaragnoideo.

El mecanismo por el cual se infectan las meninges puede ser

de caracter hematógono a partir del foco primario mediante el cual, el bacilo llegaría al espacio subaracnoideo y desencadenaría la respuesta inflamatoria aguda, o bien por un mecanismo de invasión de las leptomeninges a partir de pequeños focos tuberculosos implantados en las meninges mismas o en zonas adyacentes al espacio subaracnoideo en la corteza cerebral durante la fase de bacilemia en la primoinfección, (Calderón, J.E. 1979).

En general, la meningitis tuberculosa presenta un cuadro clínico caracterizado por tres periodos: 1) Un estadio prodrómico de irritación; 2) Un estadio transicional de hipertensión craneal y síntomas meníngeos; 3) Un estadio terminal de parálisis y coma, (Waldo, E. y Col. 1971).

La frecuencia de infecciones se encuentra más elevada en niños entre los primeros 10 años de vida y personas de edad avanzada. Esto es probablemente debido a que son individuos que presentan un estado socioeconómico bajo, desnutrición, vejez, o bien, una respuesta inmune disminuida en individuos inmunocomprometidos, inmunodeficientes, agammaglobulínicos, etc. Muy frecuentemente la meningitis tuberculosa es seguida por complicaciones que ocasionan la presencia de secuelas físicas y mentales, o bien sobreviene la muerte del individuo, por lo que es necesario establecer el diagnóstico rápido de la enfermedad.

2.7. DIAGNOSTICO DE MENINGITIS TUBERCULOSA:

Actualmente el diagnóstico de la meningitis tuberculosa

está basado en parámetros clínicos, bioquímicos y bacteriológicos: que permiten la identificación de mycobacterias en el líquido cefalorraquídeo.

En México donde se utiliza la vacuna de BCG (Bacilo de Calmette y Guerin), algunas pruebas como la tuberculina han perdido utilidad como métodos de diagnóstico ya que un resultado positivo demuestra contacto con el bacilo tuberculoso, más no una infección activa, mientras que el aislamiento e identificación de mycobacterias por cultivo en medios específicos, además de ser un procedimiento tedioso y lento, en donde por lo general transcurren entre 6 y 12 semanas para dar un resultado certero, la probabilidad de obtener resultados positivos va de un rango de 45% a 90% de los casos, (Daniel, M.T. 1987).

Se han empleado diversos métodos como alternativa para el diagnóstico temprano de la infección. Dichas pruebas pueden ser consideradas como métodos indirectos cuando se determina la respuesta del hospedero a la infección y métodos directos, cuando se determina la presencia del organismo infectante, (Daniel, M.T. 1987).

2.7.1. METODOS INDIRECTOS:

a) METODOS DE DETECCION ENZIMATICA: Está basado en la detección de enzimas como la Adenosina desaminasa que es producida por los linfocitos T sensibilizados que presentan los pacientes con meningitis tuberculosa en aumento (Valores nor-

males de 6-8U/l), así como la enzima Lisozima la cual eleva sus niveles en presencia del bacilo tuberculoso en LCR, o en condiciones características de granulomas de células epiteliales. Dichas pruebas son muy sensibles, sin embargo, en el primer caso se ha encontrado un 16% de falsos positivos con otros microorganismos de etiología no tuberculosa (Daniel, M.T. 1987; Rivera, E. y col. 1987) y en el segundo una inespecificidad del 31% de los casos. (Selvakumar, y col. 1985).

b) PARTICION DEL ION BROMURO: Es una prueba basada en la detección del radio del bromuro en muestras simultaneas de suero y LCR a base de trazadores isotópicos o por mediciones químicas directas. En estudios subsecuentes se han determinado una sensibilidad del 90% al 92% presentándose resultados falsos positivos con meningitis aséptica y piógena. (Daniel, M.T. 1987).

c) ELISA: (Enzime Linked Immuno Sorbent Assay) Es utilizada para la detección de la reacción antígeno- anticuerpo, manifestándose por medio de una reacción enzima-sustrato. Dicha prueba ha sido utilizada en gran medida para el diagnóstico de la tuberculosis cuantificando anticuerpos circulantes dirigidos a mycobacterias. Se ha reportado sensibilidades entre del 61% al 89% y especificidad del 87% al 89%. Sin embargo, la mayoría de los estudios están enfocados a la detección de anticuerpos en suero, mientras que en LCR ha sido poco estudiado, (Krambovitis, E. 1986).

Hernández y Col. (1984) utilizando el método de ELISA,

reporta niveles de anticuerpos IgG e IgM presentes en LCR de pacientes con meningitis tuberculosa, determinando un 100% de sensibilidad y especificidad en su sistema.

d) RIA: (Radioinmunoanálisis) Está basado en la detección de la reacción antígeno-anticuerpo por medio de marcadores radioactivos, Samuel y Col. (1983) analizaron muestras de LCR de pacientes con meningitis tuberculosa encontrando un 83% de sensibilidad y ausencia de falsos positivos en sujetos con meningitis de etiología no tuberculosa.

2.7.2. METODOS DIRECTOS:

a) AGLUTINACION EN LATEX: En ella se detectan antígenos mycobacteriales presentes en LCR basándose en una aglutinación de partículas de latex adsorbidos con anticuerpos dirigidos a antígenos mycobacteriales. Kambrovitis y col, (1984) reportan una sensibilidad del 94.4% y especificidad del 99.3%, encontrando falsos positivos con Haemophilus influenzae.

b) HEMAGLUTINACION PASIVA: Chandramuki y col. (1985) han utilizado esta prueba para la detección de antígenos mycobacteriales presentes en LCR de pacientes con meningitis tuberculosa, y reporta una sensibilidad del 88% encontrando falsos positivos con meningitis piógena y viral.

c) ELISA: Sada y col, (1983) utilizó el método de ELISA para detectar antígenos mycobacteriales en LCR de pacientes con meningitis tuberculosa encontrando una sensibilidad del 81.25% y

una especificidad del 95%. Kadival y col. (1983) reporta una sensibilidad del 100% e especificidad del 77%. Vinneta Bal, y col. (1983). Encuentra que de 9 casos de meningitis tuberculosa estudiados, solo 7 presentan reacción ante el antígeno mycobacterial utilizando el método de ELISA.

d) RIA: Samuel y col. (1983) Utilizando el RIA para detectar antígeno mycobacterial en pacientes con meningitis tuberculosa encontraron niveles de antígeno de 4.16 ± 3.69 ng/ml, y observando que 18 pacientes alcanzaron valores superiores a 18 ng/ml de antígeno, mientras que en individuos control se presentaron niveles de 3.1 ± 1.2 ng/ml, considerándose como un límite normal.

Kadival y col. (1987) reportan una elevada sensibilidad del método de RIA usando una biotina para la detección de antígenos presentes en LCR, encontrando que el 18% de pacientes con meningitis tuberculosa fueron positivos a la prueba y el antígeno no fue detectado en pacientes con enfermedades neurológicas y meningitis aséptica.

Aún cuando diversos grupos de investigadores han desarrollado varias pruebas de diagnóstico rápidas algunas tienen la desventaja de ser de baja especificidad y sensibilidad, o bien, de requerir de un equipo sofisticado por lo que se eleva su costo. En algunos casos las manifestaciones clínica de meningitis varían dependiendo de la susceptibilidad del paciente o la

virulencia del bacilo, por lo que pueden ser enmascarados los síntomas meníngeos y continuar hasta el estadio terminal de parálisis y coma, presentando secuelas físicas y mentales o sobrevenir la muerte del paciente.

Actualmente la meningitis tuberculosa sigue siendo un grave problema de salud pública por lo que se hace necesario un mayor estudio para establecer un tratamiento adecuado y dar un mejor manejo al individuo.

La prueba de ELISA puede ser empleada como un método de diagnóstico rápido y preciso para la detección de antígenos y anticuerpos (hasta concentraciones de ng/ml) dirigidos en contra de M. tuberculosis y/o M. bovis causantes de la meningitis tuberculosa.

3. OBJETIVOS:

3.1. Determinación de anticuerpos de los isotipos IgM e IgG, así como antígenos específicos de mycobacterias presentes en LCR procedentes de individuos con meningitis tuberculosa.

3.1.1. Obtención de antígenos proteicos de M. tuberculosis y M. bovis.

3.1.2. Obtención de anticuerpos IgG de conejo dirigidos en contra de M. bovis.

4. METODOLOGIA:

4.1. **CULTIVO BACTERIOLOGICO:** La cepa de M. tuberculosis H37Rv proporcionada por el Laboratorio Clínico del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) fué mantenida en medios de Lowenstein Jensen y Proskawer & Beck (PBY) por periodos de cuatro semanas a 37°C y conservada en refrigeración a 4°C.

La masa bacilar de M. bovis cepa Danesa 1331 original del Instituto de Sueros de Dinamarca, Copenhague, fué proporcionada por el Instituto Nacional de Higiene.

4.2. **EXTRACTO ANTIGENICO SOLUBLE:** La extracción del antígeno de M. tuberculosis y M. bovis se realizó mediante el método propuesto por García y Gutiérrez (1982), de la siguiente manera: La masa bacilar obtenida a partir de cultivos puros de cuatro semanas de desarrollo en medios de PBY, fué cosechado por centrifugación a 3015g durante 30 min en una centrífuga Sorvall RC-5, realizando 3 lavados con solución salina estéril 0.85% (SSF). La masa bacilar así obtenida fué resuspendida en una mezcla de acetona-metanol en proporción de 1:1 durante 24h, al cabo de las cuales se realizaron 3 lavados por centrifugación con acetona-metanol repitiendo este proceso durante tres días. La masa bacilar tratada se lavó por centrifugación a 3015g durante 30 min en tres ocasiones con SSF estéril. Se realizó una suspensión que contenía por cada gramo peso húmedo de masa bacilar im de

SSF, dicha suspensión fué sonicada en un Sonipret 150, a una amplitud de 8 micrones (pico a pico) durante ciclos de 5 min de sonicación por 5 min de reposo aplicando 90 min efectivos de sonicación. El extracto obtenido se centrifugó a 12062g durante 90 min y el sobrenadante se dializó contra 500ml de solución salina de boratos pH 8.4 a temperaturas de 4 C durante 78h con cambios de solución cada 24h. Finalmente se determinaron proteínas por el método de Lowry, (Lowry,H.O. y col. 1957).

4.3. PACIENTES: El presente trabajo fué realizado con sueros y líquidos cefalorraquídeos (LCR) de pacientes en edad pediátrica procedentes del Hospital Infantil de México "Federico Gómez" (HIM), en los cuales se estableció un diagnóstico clínico presuntivo de tuberculosis pulmonar o meningitis tuberculosa.

Se tomaron como controles positivos a 24 sueros de pacientes adultos con Tuberculosis Pulmonar Activa corroborada por baciloscopía. Dichos sueros fueron proporcionados por el INER. Los controles negativos fueron tomados de 9 individuos aparentemente sanos y vacunados con BCG a los cuales se les extrajo 4ml de sangre para la separación de suero; un tercer grupo control fué constituido por LCR de 27 pacientes con meningitis de etiología no tuberculosa, 7 de ellos correspondían a una meningitis viral y 20 con una meningitis piógena, diagnosticada por pruebas de coagulación e identificando Haemophilus influenzae o Pneumococo. Dicha prueba fué realizada en el Laboratorio de

Infectología del HIM.

Un cuarto grupo de sueros y/o LCR de pacientes en edad pediátrica del HIM con un diagnóstico clínico presuntivo de tuberculosis pulmonar o meningitis tuberculosa, conforman nuestro grupo problema.

4.4. DETECCION DE ANTICUERPOS: La detección de anticuerpos IgM e IgG tanto en suero como LCR, fué realizada mediante el inmunoensayo enzimático (ELISA INDIRECTA). Dicha prueba se describe a continuación:

a) Adherencia del antígeno a placas de poliestireno inmunolon II utilizando amortiguador de boratos pH 8.4 e incubando a 4 °C por toda la noche.

b) Se realizaron 4 lavados de 2 min cada uno con PBS-Tween 20 0.05%.

c) Se adicionó a cada pozo 100ul de la solución bloqueadora incubando por 1h a 37 °C.

d) Repetir el paso b.

e) Se adicionó a cada pozo 100ul de suero o LCR diluidos previamente en PBS-Tween 20 y se incubó por 1h a 37 °C.

f) Repetir el paso b.

g) Se adicionó a cada pozo 100ul de conjugado anti-IgM humana (Tago) o anti-IgG humana (Cappel) unidas a peroxidasa diluido previamente en PBS-Tween. Se incubó 1h a 37 °C.

h) Repetir el paso b.

i) Se adicionaron 100ul de sustrato^{*} y se mantuvo a temperatura ambiente por 30 min en obscuridad.

j) Se adicionó una gota de H_2SO_4 8N para detener la reacción.

k) La lectura de absorbancia se efectuó en un lector para ELISA. Berhing a 490nm.

4.5. OBTENCION DE SUERO HIPERINMUNE: El extracto antigénico soluble de M. bovis fué utilizado para inmunizar dos conejos cepa Nueva Zelanda de aproximadamente 2.500 kg y 7 ratas cepas Wistar de aproximadamente 0.850 Kg. El cuadro de inmunización es mostrado en la tabla 4.1.

Las concentraciones antigénicas fueron obtenidas a partir del extracto antigénico soluble de M. bovis diluido en solución salina 0.85% estéril y se adicionó adyuvante completo de Freud en proporción de 3:1.^{*}

El suero hiperinmune anti-M. bovis tanto de rata como de conejo fué sometido a una prueba de precipitación en capillary por ELISA indirecta para la detección de anticuerpos dirigidos contra el antígeno empleado en su inmunización.

Posteriormente se purificaron gammaglobulinas (IgG) de conejo anti-M. bovis; se concentraron las gammaglobulinas por el método de sulfato de amonio (con el fin de obtener la mayor^{*}

* Ver apéndice.

concentración en el menor volumen posible), posteriormente fueron separadas por columna de sepharosa-proteína A, y finalmente se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (Lowry, H.O. y col. 1957).

Tabla 4.1: CUADRO DE IMMUNIZACION

NUMERO INOCULACION	DIA	CONCENTRACION ANTIGENICA	DOSIS CONEJO	DOSIS RATA
1	0	0.47mg/ml	2IM/ID	1IM/ID
2	7	0.47mg/ml	2IM/ID	1IM/ID
3	14	0.94mg/ml	2IM/ID	1IM/ID
4	21	0.94mg/ml	2IM/ID	1IM/ID
5	28	4.70mg/ml	2IM/ID	1IM/ID
6	35	4.70mg/ml	2IM/ID	1IM/ID
	42	SANGRIA DE PRUEBA		
7	65	0.94mg/ml	2IM/ID	1IM/ID
8	72	0.94mg/ml	2IM/ID	1IM/ID
	79	SANGRIA A BLANCO		

IM: Intramuscular

ID: Intradérmica

4.6. DETECCION DE ANTIGENO: La detección de antígeno presente en LCR fué determinado mediante el método de ELISA directa, dicha prueba se describe a continuación:

a) Adherencia de anticuerpos IgG anti-M. bovis de conejo a placas de inmunolon II utilizando amortiguador de boratos pH 8.4 e incubando a 4 °C por toda la noche.

b) Se realizaron 4 lavados de 2 min cada uno con PBS-Tween 20 0.05%.

c) Se adicionó a cada pozo 100ul de solución bloqueadora incubando 1h a 37 °C.

d) Se repite el paso b.

e) Se adicionó a cada pozo 100ul de LCR (o antígeno de M. bovis a concentraciones conocidas)^{**}, se incubó 1h a 37° C.

f) Se repite el paso b.

g) Se adicionó a cada pozo 100ul de suero hiperinmune de rata anti-M. bovis y se incubó 1h a 37° C.

h) Se repite el paso b.

i) Se adicionó a cada pozo 100ul de conjugado anti-IgG de rata (Cappel) unido a una peroxidasa incubando 1h a 37° C.

j) Se repite el paso b.

k) Se adicionaron 100ul de sustrato y se mantuvo a temperatura ambiente por 30 min en oscuridad.

** Se adicionó extracto antigénico soluble de M. bovis para la obtención de una curva patrón, que tiene como fin establecer un control en la realización de la prueba.

l) Se adicionó una gota de H_2SO_4 8N para detener la reacción.

m) Las lecturas de absorbancia se efectuaron en un lector para ELISA Berhing a 490nm.

Los resultados obtenidos al probar los dos extractos antigénicos de M. tuberculosis y M. bovis en la prueba de ELISA indirecta fueron manejadas estadísticamente por una prueba de "t" de student con el fin de establecer una significancia entre estos, en relación a los distintos grupos estudiados.

Se obtuvo una curva antigénica patrón para la ELISA directa utilizando concentraciones conocidas de M. bovis, los valores de densidad óptica obtenidos fueron linealizados por medio de la prueba de mínimos cuadrados a partir de la cual se calcularon las concentraciones antigénicas presentes en LCR, en base a la expresión $Y = aX + b$.

5. RESULTADOS:

El diagnóstico de la meningitis tuberculosa fué realizado mediante el método de ELISA, por el cual se determinó la presencia de anticuerpos de los isotipos IgM e IgG dirigidos en contra de mycobacterias presentes tanto en suero como en LCR. Para la realización de dicha prueba fué necesario la obtención de extractos antigénicos solubles de M. tuberculosis y M. bovis por medio de su deslipidación y sonicación. Dichos extractos presentaron una concentración de proteínas de 4.7mg/ml y 3.3mg/ml respectivamente.

Fueron observadas interacciones inespecíficas al intentar la adsorción de proteínas a la fase sólida utilizando el extracto completo (sin deslipidizar).

Las condiciones estandarizadas para la realización de la ELISA indirecta son mostradas en el cuadro 1, en donde se observa los pasos que se siguieron para la identificación de anticuerpos IgM e IgG tanto en LCR como en suero. Para ello se utilizaron tres tipos de fase sólida: Immunolon II, Dermak y Limbro, encontrando una disminución notable de reacciones inespecíficas en las tiras removibles de Immunolon II. Así mismo, fueron probadas dos soluciones bloqueadoras: Albúmina sérica bovina al 2% y glicina al 2%, siendo la glicina la mejor solución bloqueadora.

Para establecer la concentración de proteínas antigénicas solubles adecuadas en la adsorción a la fase sólida, fueron

CUADRO 1. CONDICIONES ADECUADAS PARA LA REALIZACION DEL ELISA INDIRECTA.

ANTIGENO	<u>M. bovis</u>	10ug/ml.
	<u>M. tuberculosis</u>	20ug/ml.
SOLUCION BLOQUEADORA	GLICINA	2 %
ANTICUERPOS	DILUCION DE SUERO	1:200
	DILUCION DE LCR.	1:50
CONJUGADO UNIDO A PEROXIDASA	PARA SUERO: CHIVO ANTI-IgM HUMANA (TAGO)	1:10000
	CHIVO ANTI-IgG HUMANA (CAPPEL)	1:25000
	CHIVO ANTI-IgG CONEJO (CAPPEL)	1:15000
	CHIVO ANTI-IgG RATA (CAPPEL)	1:15000
	PARA LCR: CHIVO ANTI-IgM HUMANA (TAGO)	1:5000
	CHIVO ANTI-IgG HUMANA (CAPPEL)	1:10000
LECTURA DE D.O.		490nm.

realizados ensayos a distintas concentraciones que van de 2.5ug/ml a 20ug/ml de proteína, encontrando una mayor sensibilidad y reproducibilidad al sistema con las concentraciones de 10ug/ml al utilizar el antígeno de M. bovis y de 20ug/ml utilizando M. tuberculosis.

La tabla 1, muestra los valores de absorbancia promedio obtenidos de pruebas por cuadruplicado realizadas en suero de pacientes con tuberculosis pulmonar activa, siendo corroborado su diagnóstico por baciloscopia y presentando de 3 a 4 cruces de positividad. El isotipo IgG reporta valores promedio de absorbancia de $1.137 \pm 2(0.360)$ utilizando a M. tuberculosis como antígeno y valores de $0.453 \pm 2(0.183)$ utilizando a M. bovis.

La tabla 2, muestra los valores promedio de absorbancia obtenidos de 7 sueros de individuos sanos y vacunados con BCG, a partir de los valores de absorbancia reportados para el isotipo IgG se obtuvo un límite de positividad para cada antígeno ($x \pm 2$ D.S.), siendo de 0.497 para el antígeno de M. tuberculosis y 0.122 para M. bovis. Considerando dichos valores fueron encontrados 5 falsos negativos de 24 sueros probados procedentes de individuos con tuberculosis pulmonar activa lo que da una eficacia al sistema del 79%, mientras que para el antígeno de M. bovis se encontró solo un falso negativo estableciendo así una eficacia del 95.8% en el sistema (Ver figuras 1 y 2).

Si comparamos los valores promedio de absorbancia reportados para el isotipo IgM en suero de pacientes con tuberculosis

**TABLA 1. VALORES DE ABSORBANCIA PARA LOS ISOTIPOS
IgM E IgG PRESENTES EN SUERO DE INDIVIDUOS
CON TUBERCULOSIS PULMONAR.**

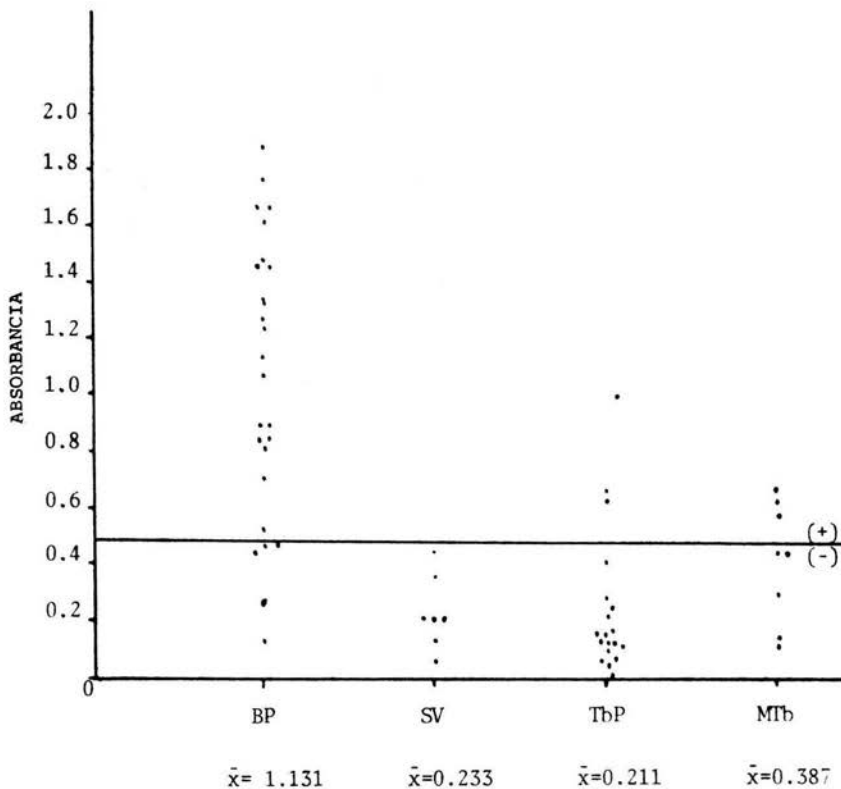
PACIENTE	BACILOS/ COPIA.	Ag. <i>M. tuberculosis</i>		<i>M. bovis</i>	
		IgM	IgG	IgM	IgG
1	+++	0.470	1.607	0.026	0.581
2	+++	0.103	1.216	0.033	0.403
3	+++	0.261	0.705	0.127	0.333
4	+++	0.056	0.470*	0.032	0.180
5	+++	0.224	1.667	0.337	0.851
6	+++	0.110	0.871	0.074	0.380
7	+++	0.095	0.804	0.041	0.287
8	++++	0.292	0.879	0.082	0.506
9	++++	0.203	0.274*	0.059	0.096*
10	+++	0.202	0.857	0.130	0.374
11	+++	0.128	0.128*	0.027	0.225
12	++++	0.214	1.269	0.065	0.630
13	++++	0.263	1.145	0.098	0.342
14	++++	0.314	1.671	0.148	0.630
15	++++	0.166	1.152	0.059	0.440
16	+++	0.081	1.058	0.051	0.411
17	++++	0.134	0.475*	0.037	0.226
18	++++	0.225	0.509	0.088	0.176
19	++++	0.131	1.764	0.053	0.655
20	+++	0.069	1.330	0.049	0.386
21	++++	0.083	1.840	0.023	0.199
22	+++	0.104	0.821	0.043	0.231
23	+++	0.030	1.455	0.038	0.746
24	+++	0.124	0.455*	0.055	0.179
\bar{x}		0.170	1.137	0.092	0.453
D.S.		0.101	0.368	0.110	0.183

* VALORES FALSOS NEGATIVOS.

**TABLA 2. VALORES DE ABSORBANCIA PARA LOS ISOTIPOS
IgM E IgG PRESENTES EN SUERO DE INDIVIDUOS
SANOS Y VACUNADOS CON BCG.**

INDIVIDUO	<u>Ag. M. tuberculosis</u>		<u>M. bovis</u>	
	IgM	IgG	IgM	IgG
1	0.031	0.128	-0.070	-0.047
2	0.051	0.070	-0.049	-0.090
3	0.161	0.207	-0.049	-0.026
4	0.042	0.205	-0.049	-0.066
5	0.099	0.376	-0.080	-0.003
6	0.042	0.445	-0.067	-0.026
7	0.142	0.206	-0.052	-0.032
\bar{x}	0.081	0.233	-0.067	-0.041
D.S.	0.054	0.132	0.064	0.041

FIGURA 1. VALORES DE ABSORBANCIA PARA EL ISOTIPO IgG PRESENTES EN SUERO. UTILIZANDO ANTIGENO DE M. tuberculosis.



Cada punto representa el valor promedio de absorbancia a 490nm, de un solo individuo.

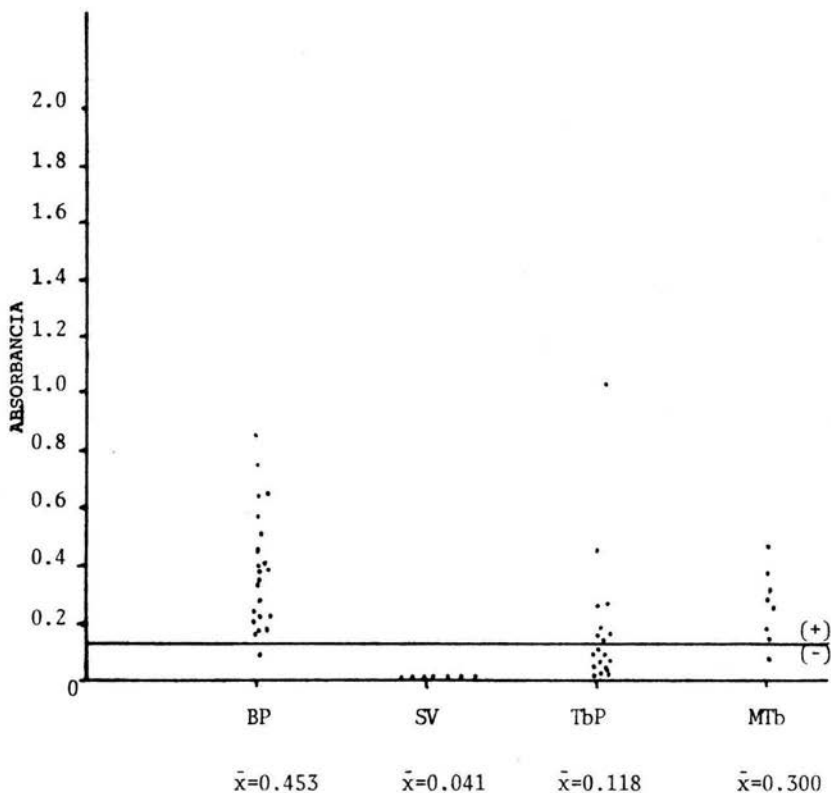
BP: Individuos con Tuberculosis Pulmonar Activa.

SV: Individuos aparentemente sanos y vacunados con BCG.

TbP: Individuos con diagnóstico clínico presuntivo de Tuberculosis Pulmonar.

MTb: Individuos con diagnóstico clínico presuntivo de Meningitis Tuberculosa.

FIGURA 2. VALORES DE ABSORBANCIA PARA EL ISOTIPO IgG PRESENTE EN SUERO. UTILIZANDO ANTIGENO DE M. bovis.



Cada punto representa el valor promedio de absorbancia a 490nm, de un solo individuo.

BP: Individuos con Tuberculosis Pulmonar Activa.

SV: Individuos aparentemente sanos y vacunados con BCG.

TbP: Individuos con diagnóstico clínico presuntivo de Tuberculosis Pulmonar.

MTb: Individuos con diagnóstico clínico presuntivo de Meningitis Tuberculosa.

pulmonar activa e individuos sanos y vacunados con BCG, encontramos una gran semejanza entre ambos, ya que en el primer grupo se reportan rangos de absorbancia que van de 0.030 a 0.470 y en el segundo grupo de 0.031 a 0.142 utilizando el antígeno M. tuberculosis y para M. bovis se reportan datos similares, por lo que no se permite establecer un límite de positividad ya que no existe una diferencia notable entre los distintos grupos estudiados (Ver figuras 3 y 4).

La tabla 3, muestra los valores de absorbancia para los anticuerpos IgM e IgG presentes en sueros de 18 individuos en edad pediátrica con diagnóstico clínico presuntivo de tuberculosis pulmonar, de ellos solo se encontró 2 individuos positivos haciendo uso del antígeno de M. tuberculosis mientras que con M. bovis se detectaron 8. La historia clínica de dichos pacientes indica que habían recibido la inmunización con BCG, e ingresaron al hospital con una desnutrición de 2o. y 3er. grado y solo uno de ellos presentaba antecedentes de un posible contagio de tuberculosis por un Combe positivo. Los valores medios de absorbancia para el isotipo IgG utilizando el antígeno de M. tuberculosis fué de $0.211 \pm 2(0.185)$, mientras que al utilizar M. bovis los valores fueron de $0.118 \pm 2(0.111)$.

En las tablas 4 y 5, comparamos los valores de absorbancia de suero y LCR de individuos con diagnóstico clínico presuntivo de meningitis tuberculosa detectando anticuerpos de los isotipos IgM e IgG respectivamente. Al igual que en el grupo ante-

TABLA 3. VALORES DE ABSORBANCIA PARA LOS ISOTIPOS IgM E IgG PRESENTES EN SUERO DE INDIVIDUOS CON DIAGNOSTICO CLINICO PRESUNTIVO DE TUBERCULOSIS PULMONAR.

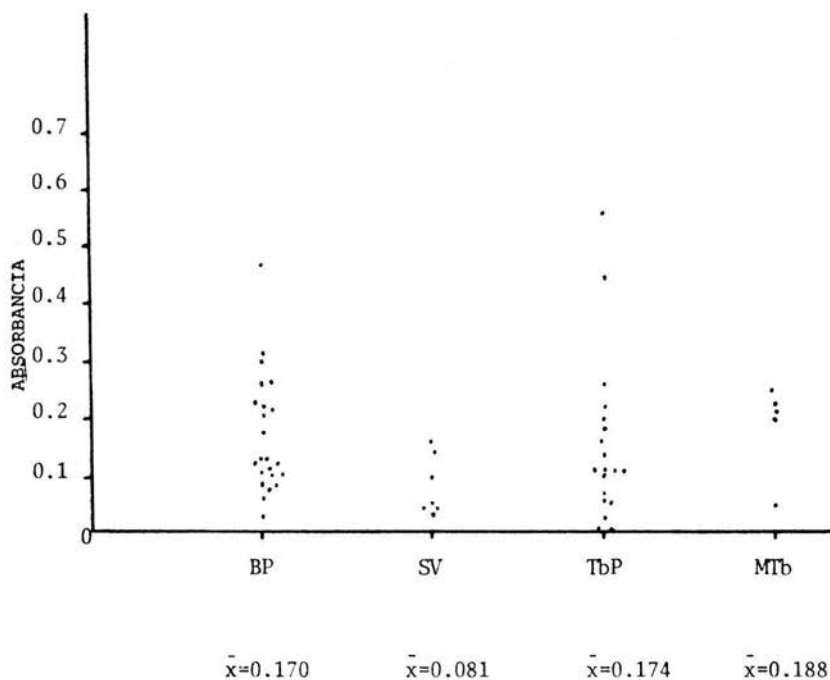
PACIENTES	Ag. <u>M. tuberculosis</u>		<u>M. Dovis</u>	
	IgM	IgG	IgM	IgG
1	0.269	0.404	0.112	0.151*
2	0.226	0.296	0.171	0.108*
3	0.118	0.126	0.034	0.030
4	0.182	0.127	0.070	0.029
5	0.116	0.160	0.052	0.067
6	0.122	0.104	0.035	0.038
7	0.068	0.118	0.011	0.035
8	0.140	0.058	0.010	0.084
9	0.122	0.218	0.009	0.016
10	0.025	0.067	0.038	0.011
11	0.005	0.005	0.070	0.081
12	0.556	0.662*	0.414	0.441*
13	0.196	0.257	0.113	0.135*
14	0.104	0.185	0.050	0.178*
15	0.062	0.078	0.025	0.048
16	0.004	0.133	0.088	0.248*
17	0.052	0.162	0.128	0.166*
18	0.162	0.638*	0.065	0.266*
\bar{x}	0.174	0.211	0.081	0.118
D.S.	0.178	0.185	0.094	0.111

* VALORES POSITIVOS.

**TABLA 4. VALORES DE ABSORBANCIA PARA EL ISOTIPO
IgM PRESENTE EN SUERO Y LCR DE INDIVI-
DUOS CON CUADRO CLINICO PRESUNTIVO DE
MENINGITIS TUBERCULOSA.**

PACIENTES	<u>Ag.M.tuberculosis</u>		<u>M. bovis</u>	
	SUERO	LCR	SUERO	LCR
1	0.229	0.050	0.166	0.076
2	0.047	0.057	0.053	0.121
3	0.212	0.003	0.231	0.019
4	0.200	0.046	0.029	0.129
5	0.256	0.041	0.306	0.006
\bar{x}	0.188	0.039	0.157	0.069
D.S.	0.081	0.021	0.117	0.055

FIGURA 3. VALORES DE ABSORBANCIA PARA EL ISOTIPO IgM PRESENTES EN SUERO. UTILIZANDO ANTIGENO DE M. tuberculosis.



Cada punto representa el valor promedio de absorbancia a 490nm, de un solo individuo.

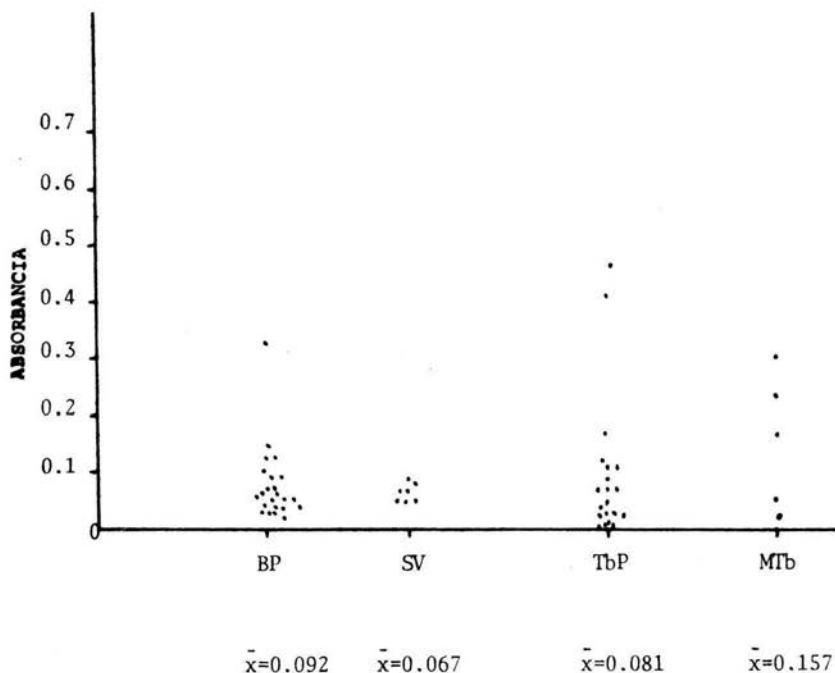
BP: Individuos con Tuberculosis Pulmonar Activa.

SV: Individuos aparentemente sanos y vacunados con BCG.

TbP: Individuos con diagnóstico clínico presuntivo de Tuberculosis Pulmonar.

MTb: Individuos con diagnóstico clínico presuntivo de Meningitis Tuberculosa.

FIGURA 4. VALORES DE ABSORBANCIA PARA EL ISOTIPO IgM PRESENTE EN SUERO. UTILIZANDO ANTIGENO DE M. bovis.



Cada punto representa el valor promedio de absorbancia a 490nm, de un solo individuo.

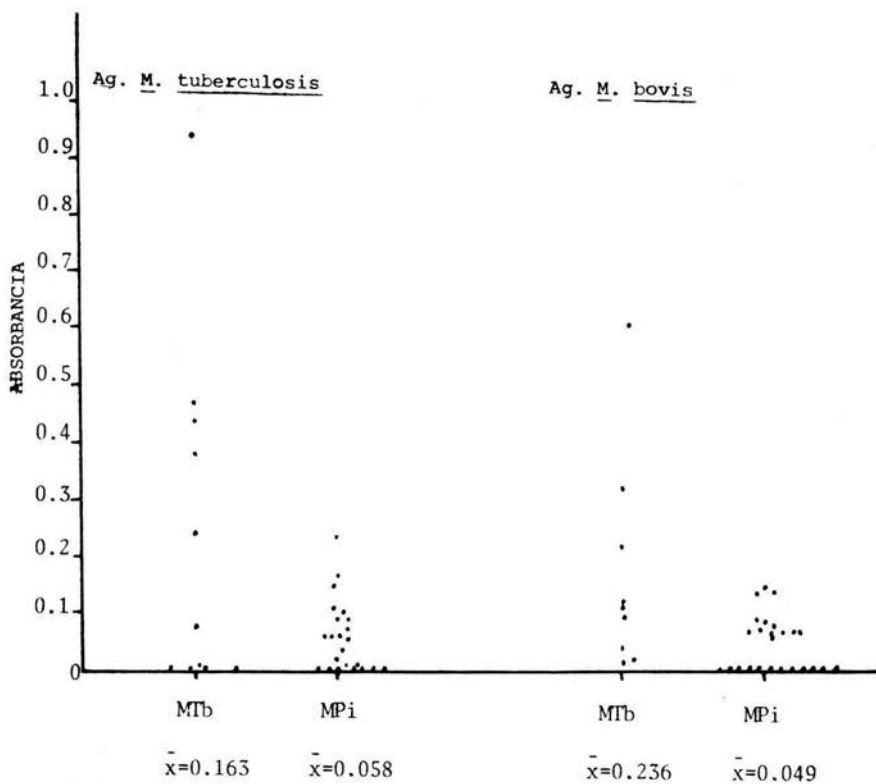
BP: Individuos con Tuberculosis Pulmonar Activa.

SV: Individuos aparentemente sanos y vacunados con BCG.

TbP: Individuos con diagnóstico clínico presuntivo de Tuberculosis Pulmonar.

MTb: Individuos con diagnóstico clínico presuntivo de Meningitis Tuberculosa.

FIGURA 5. VALORES DE ABSORBANCIA PARA EL ISOTIPO IgG PRESENTE EN LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO. UTILIZANDO ANTIGENO DE M. tuberculosis Y M. bovis.



Cada punto representa el valor promedio de absorbancia a 490nm, de un solo individuo.

MTb: Individuos con diagnóstico clínico presuntivo de Meningitis Tuberculosa.

MPi: Individuos con Meningitis piógena, causada por H. influenzae y Str. pneumoniae.

rior, se reportan historias clínicas semejantes indicando en este segundo grupo la presencia de un problema meníngeo, el cual fué tratado en un gran número de casos con antibióticos fímicos, sin embargo, en ningún caso fué aislado el agente causal. En base a la presencia de IgG en suero, se determinaron 3 valores positivos de 9 sueros analizados con el antígeno de M. tuberculosis y solo un suero negativo con el antígeno de M. bovis.

Puede observarse que llega a existir una correspondencia entre los valores altos de D.O. tanto en suero como en LCR, alcanzando valores promedio en LCR de 0.381 al utilizar el antígeno de M. tuberculosis y hasta de 0.941 al utilizar el antígeno de M. bovis.

La tabla 6, muestra los valores de absorbancia para IgM e IgG presentes en LCR de 24 pacientes con meningitis piógena. En 3 de ellos se detectó a H. influenzae como el agente causal por pruebas de coagulación y cultivo, mientras que en otros 5 fué detectado Str. pneumoniae. En los restantes no fué identificado el agente causal. Los valores de absorbancia promedio para el isotipo IgG al utilizar el antígeno de M. tuberculosis fué de $0.058 \pm 2(0.061)$ y de $0.049 \pm 2(0.049)$ al utilizar M. bovis como antígeno. (Ver figuras 5 y 6).

La prueba de ELISA directa fué utilizada para la detección de antígenos mycobacteriales presentes en LCR de pacientes con un diagnóstico presuntivo de meningitis tuberculosa. Para ello fué necesario la obtención de sueros hiperinmunes de dos espe-

**TABLA 5. VALORES DE ABSORBANCIA PARA EL ISOTIPO
IgG PRESENTE SUERO Y LCR DE INDIVI-
DUOS CON CUADRO CLINICO PRESUNTIVO DE
MENINGITIS TUBERCULOSA.**

PACIENTES	Ag. <u>M.tuberculosis</u>		<u>M. bovis</u>	
	SUERO	LCR	SUERO	LCR
1	0.452	0.004	0.277*	0.015
2	0.447	0.004	0.392*	0.041
3	0.300	0.010	0.186*	0.022
4	0.143	0.078	0.075	0.095
5	0.620*	0.249	0.471*	0.326
6	0.566*	0.381	0.269*	0.224
7	0.125	-0.470	0.145*	0.115
8	0.632*	0.112	0.317*	0.941
9	---	---	---	0.443
10	---	0.162	---	0.166
11	---	---	---	0.067
12	---	---	---	0.350
13	---	---	0.162*	0.000
14	---	---	---	0.300
15	0.202	---	0.708*	0.375
\bar{x}	0.387	0.163	0.300	0.236
D.S.	0.201	0.170	0.186	0.279

*VALORES POSITIVOS.

-- NO FUE REALIZADA LA PRUEBA.

**TABLA 6. VALORES DE ABSORBANCIA PARA LOS ISOTIPOS
IgM E IgG PRESENTES EN LCR DE INDIVI-
DUOS CON CUADRO CLINICO PRESUNTIVO DE
MENINGITIS PIOPENA.**

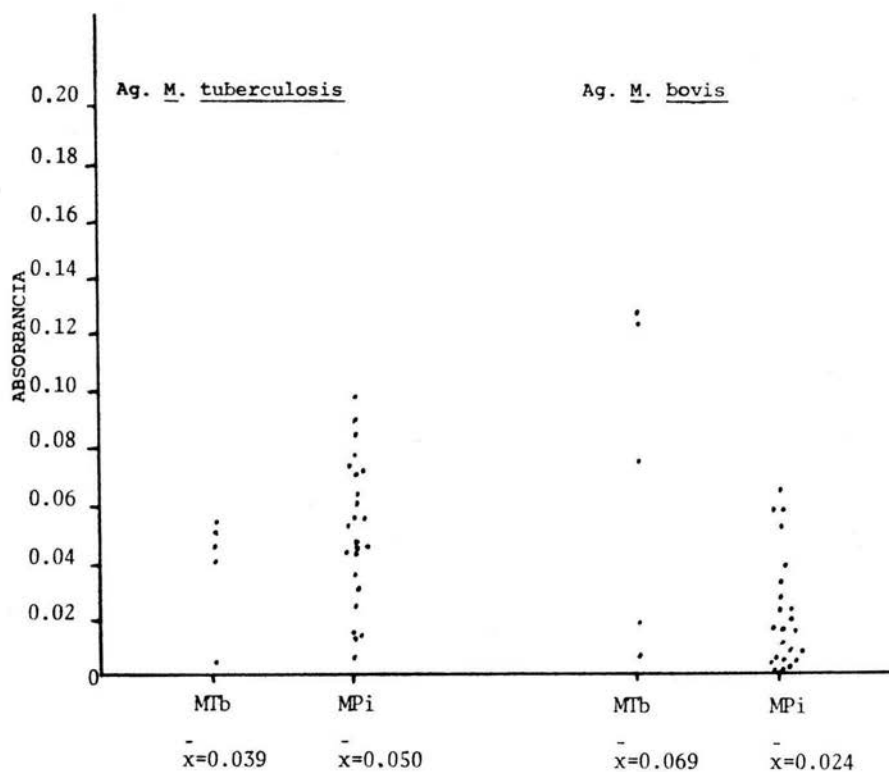
PACIENTE	Ag. <u>M. tuberculosis</u>		<u>M. bovis</u>	
	IgM	IgG	IgM	IgG
1°	0.016	0.157	0.005	0.088
2°	0.031	0.098	0.023	0.089
3°	0.026	0.003	0.007	0.001
4*	0.006	0.012	0.004	0.002
5°	0.060	0.005	0.001	0.001
6°	0.014	0.014	0.002	0.001
7"	0.046	0.003	0.012	0.005
8*	0.056	0.001	0.027	0.003
9°	0.051	0.000	0.009	0.004
10°	0.030	0.037	0.005	0.004
11°	0.070	0.010	0.003	0.001
12°	0.063	0.001	0.005	0.002
13°	0.045	0.061	0.026	0.084
14°	0.037	0.004	0.005	0.000
15°	0.043	0.236	0.069	0.077
16°	0.085	0.057	0.063	0.056
17"	0.015	0.094	0.009	0.067
18°	0.088	0.061	0.018	0.013
19"	0.072	0.147	0.051	0.149
20°	0.079	0.105	0.058	0.131
21"	0.097	0.062	0.058	0.067
22°	0.056	0.072	0.039	0.068
23*	0.056	0.112	0.016	0.140
24*	0.067	0.057	0.022	0.067
\bar{x}	0.050	0.058	0.024	0.049
D.S.	0.025	0.061	0.021	0.049

° NO SE ENCONTRO AGLUTINACION

* Str. pneumoniae

" H. influenzae

FIGURA 6. VALORES DE ABSORBANCIA PARA EL ISOTIPO IgM PRESENTES EN LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO. UTILIZANDO ANTIGENOS DE M. tuberculosis Y M. bovis.



Cada punto representa el valor promedio de absorbancia a 490 nm, de un solo individuo

MTb: Individuos con diagnóstico clínico presuntivo de Meningitis Tuberculosa.

MPi: Individuos con Meningitis piógena, causada por H. influenzae y Str. pneumoniae.

cies, siendo inmunizados conejos y ratas con extractos antigénicos de M. bovis y adyuvante completo de Freud. (Preparado con arlacel y drakeol 1:9 y bacilo seco de M. bovis). Los sueros así obtenidos fueron sometidos a una prueba de precipitación por capilar y ELISA indirecta con el fin de detectar anticuerpos dirigidos en contra de el antígeno empleado en su inmunización. Dichos sueros reportaron un título superior a 1:128 ante la prueba de precipitación por capilar y una absorbancia en la prueba de ELISA de 0.123 para el suero de rata y 0.287 para el suero de conejo antes de su inmunización y después de ella se elevó a 1.015 y 1.616 respectivamente.

A partir del suero hiperinmune de conejo se obtuvieron inmunoglobulinas IgG en un columna de sepharosa-proteína A. La concentración de proteínas que presentó el extracto de IgG anti-M. bovis fué de 2.6mg/ml.

Las condiciones adecuadas para la realización de la ELISA directa son mostrados en el cuadro 2, en donde se observa que el suero hiperinmune anti-M. bovis de rata es utilizado para la detección de los epitopes restantes del antígeno mycobacterial unido al anticuerpo y la reacción antígeno-anticuerpo es revelada por medio de una reacción enzima-sustrato, siendo utilizado para esto un conjugado anti-IgG de rata unido a una peroxidasa (Cappel).

La figura 7, muestra curvas antigénicas aplicadas en la ELISA directa, con las cuales se determinó la concentración de

**CUADRO 2. CONDICIONES ADECUADAS PARA LA REALIZACION
DEL ELISA DIRECTA.**

IgG ANTI-<u>M. bovis</u> DE CONEJO.		10ug/ml.
SOLUCION BLOQUEADORA	GLICINA	2 %
LCR		CONCENTRADO
SUERO HIPERINMUNE	ANTI-<u>M. bovis</u> DE RATA.	1:150
CONJUGADO UNIDO A PEROXIDASA	CHIVO ANTI-IgG RATA (CAPPEL)	1:15000
CURVA PATRON ANTIGENICA	DILUCIONES DEL ANTIGENO <u>M. bovis</u>	20ug/ml a 0.312ug/ml.
LECTURAS DE D.O.		490nm.

IgG anti-M. bovis más apropiada para la sensibilización de las placas de microtitulación. Para esta prueba fueron utilizados concentraciones antigénicas conocidas que van de un rango de 2.5ug/ml a 20ug/ml. La concentración de IgG apropiada para la determinación de antígenos mycobacteriales fué de 10ug/ml.

La tabla 7, muestra los valores de absorbancia obtenidos en la detección de antígenos mycobacteriales en LCR de pacientes que presentaron un cuadro clínico presuntivo de meningitis tuberculosa, dichos valores fueron interpolados en la curva antigénica patrón, linealizada por mínimos cuadrados y fueron obtenidos valores de $a = 0.062$; $b = 0.138$ y un índice de determinación de 0.977 (Ver figura 9).

En base a dichos valores se detectaron solo 3 valores positivos de 15 LCR analizados, reportando concentraciones de 3.096 ug/ml y 4.838 ug/ml. Estos mismos valores son graficados en la figura 8 y son comparados con los valores de absorbancia obtenidos de LCR de un grupo de pacientes con meningitis piógena y otro grupo de pacientes con meningitis viral, estos últimos dos grupos presentaron valores negativos.

TABLA 7. VALORES DE ABSORBANCIA DE LA DETERMINACION DE ANTIGENO EN LCR DE INDIVIDUOS CON DIAGNOSTICO CLINICO PRESUNTIVO DE MENINGITIS TUBERCULOSA.

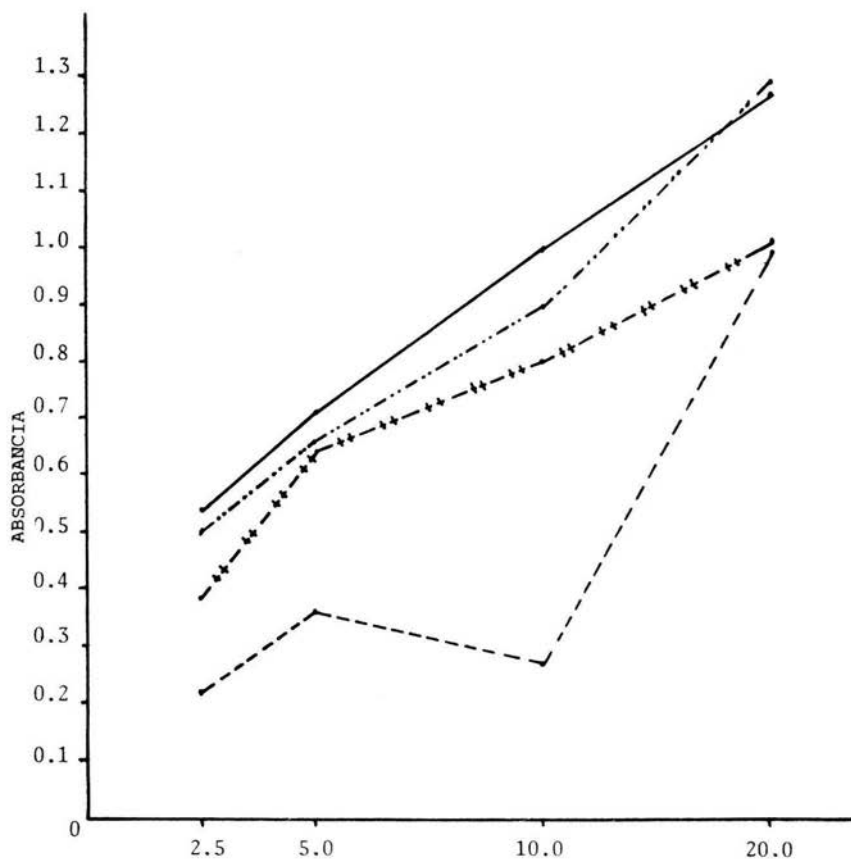
PACIENTES	ABSORBANCIA	CONCENTRACION ANTIGENICA mg/ml
1	0.000	0.000
2	0.000	0.000
3	0.000	0.000
4	0.000	0.000
5	0.000	0.000
6	0.014	0.000
7	0.000	0.000
8	0.330	3.096
9	0.431	4.838
10	0.069	0.000
11	0.085	0.000
12	0.050	0.000
13	0.000	0.000
14	0.000	0.000
15	0.431	4.838

TABLA 8. VALORES DE ABSORBANCIA PARA EL ISOTIPO IgG PRESENTE EN SUERO Y LCR DE PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLINICO PRESUNTIVO DE MENINGITIS TUBERCULOSA COMPARADA CON SU CONCENTRACION ANTIGENICA.

PACIENTE	<u>Ag. M. tuberculosis</u>		<u>M. bovis</u>		<u>CONCENTRACION ANTIGENICA</u>
	SUERO	LCR	SUERO	LCR	LCR
1	0.452	0.004	0.277*	0.015	0.000
2	0.447	0.004	0.392*	0.041	0.000
3	0.300	0.010	0.075	0.022	0.000
4	0.143	0.078	0.471*	0.095	0.000
5	0.620*	-0.249	0.269*	0.326	0.000
6	0.566*	-0.381	0.145*	0.224	0.000
7	0.125	-0.470	0.317*	0.115	0.000
8	0.635*	0.112	---	0.941	3.095
9	---	---	---	0.443	4.838
10	---	0.162	---	0.166	0.000
11	---	---	---	0.067	0.000
12	---	---	---	0.350	0.000
13	---	---	0.162*	0.000	0.000
14	---	---	---	0.300	0.000
15	0.202	---	0.708*	0.375	4.838

-- No se realizó la prueba.

FIGURA 7. CURVA PATRON ANTIGENICA APLICADA EN ELISA DIRECTA.



Ag. M. bovis (ug/ml)

Fue utilizado antigén de M. bovis y anticuerpos anti-IgG de conejo a concentraciones conocidas.

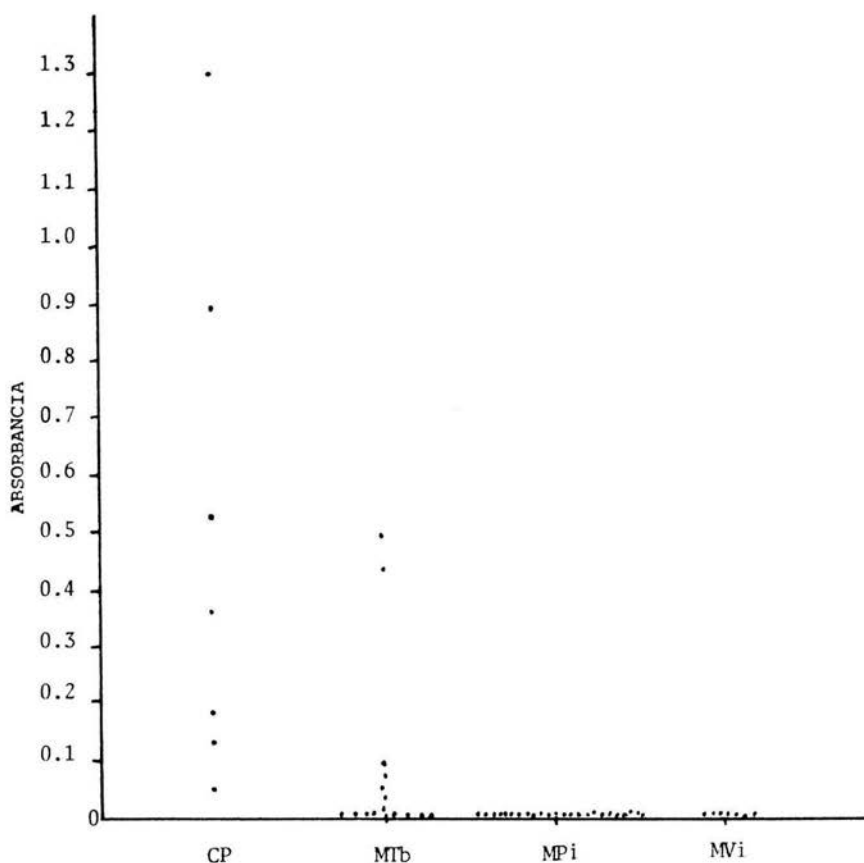
— IgG anti-M. bovis 20ug/ml.

--- IgG anti-M. bovis 10 ug/ml.

-+- IgG anti-M. bovis 5ug/ml.

---- IgG anti-M. bovis 2.5ug/ml.

FIGURA 8. VALORES DE ABSORBANCIA PARA LA DETERMINACION DE ANTIGENO EN LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO.



Cada punto representa el valor promedio de absorbancia a 490nm, de un solo individuo.

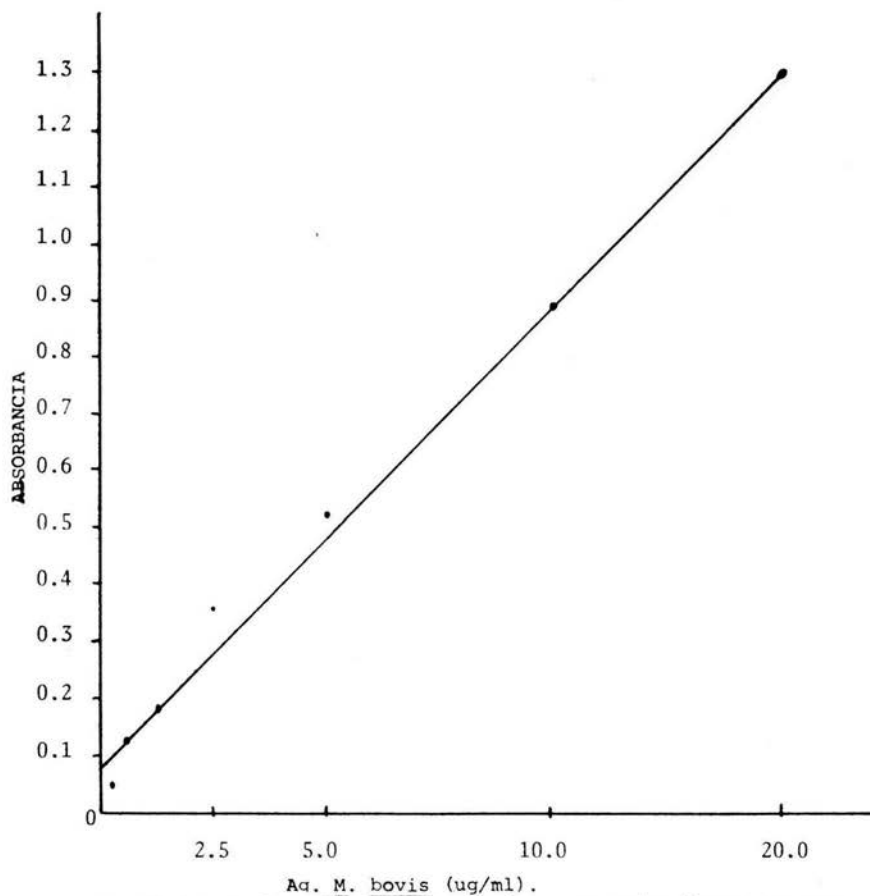
CP: Curva patrón. (Utilizando concentraciones conocidas de antígeno de *M. bovis*).

MTb: Individuos con diagnóstico clínico presuntivo de Meningitis Tuberculosa.

MPi: Individuos con Meningitis Piógena, causada por *H. influenzae* y *Str. pneumoniae*.

MVi: Individuos con Meningitis Viral.

FIGURA 9. CURVA PATRON ANTIGENICA APLICADA EN ELISA DIRECTA.



Aq. M. bovis (ug/ml).
Fue utilizado el antígeno de M. bovis a concentraciones que van de 0.3ug/ml a 20ug/ml. Linealizando por mínimos cuadrados.

6. DISCUSION:

Establecer pruebas de diagnóstico rápidas y sensibles en infecciones del sistema nervioso central causadas por mycobacterias, es determinante para el manejo adecuado a cada paciente. Los problemas inherentes a las diferentes pruebas de diagnóstico hasta hoy utilizadas, se relacionan principalmente con su sensibilidad y especificidad. El análisis inmunoenzimático ELISA se ha considerado por su costo, facilidad y alta sensibilidad como un método adecuado a nuestro país, en el diagnóstico de diversas enfermedades infecciosas (Santos,A.L, y col. 1986).

En el caso de la meningitis tuberculosa los estudios hasta ahora realizados por ELISA han referido márgenes muy amplios de especificidad y sensibilidad (Hernández,R. y col. 1984; Sada,E. y col. 1983; Vinneta,E. y col. 1983). Sin embargo, el diagnóstico sigue basado principalmente en parámetros clínicos y bioquímicos así como la confirmación bacteriológica.

Llega a ser frecuente que el médico se confunda ante un caso de meningitis piógena o viral y la establezca como de etiología tuberculosa, ya que el inicio de ésta es insidioso y caracterizado por síntomas inespecíficos (Calderón,J.E. 1979). Por lo que establecer un diagnóstico temprano y certero es determinante para el pronóstico del enfermo.

Esto viene a justificar la búsqueda de concentraciones antigénicas y títulos de anticuerpos IgM e IgG dirigidos a mycobacterias presentes en suero o LCR, que permitan establecer una

evidencia contundente para el diagnóstico de este padecimiento.

Debido a la alta sensibilidad del inmunoanálisis enzimático ELISA, uno de los problemas más frecuentes en su empleo es la adsorción inespecífica a la fase sólida de alguno o varios componentes del sistema, lo que provoca resultados falsos (positivos o negativos dependiendo del sistema empleado) (Santos, A.L. 1986; Hernández, L.J. 1985).

La adsorción de las proteínas al fondo de placas de microtitulación está basado en una reacción hidrofóbica entre las proteínas y el plástico, lo cual podría llegar a indicar el hecho de que grandes cantidades de lípidos formen una capa que impida la unión entre estas y se manifieste por medio de interacciones inespecíficas. Estas mismas interacciones pueden presentarse dependiendo de la afinidad de unión que exista entre las cargas iónicas de las proteínas y el material con que está fabricada la fase sólida. Las tiras removibles de inmunolon II son fabricadas con poliestireno. Según estudios anteriores han reportado una disminución notable de reacciones inespecíficas al utilizar este material (Voller, A. y col. 1979).

La adsorción inespecífica es disminuida también por la utilización de detergentes no iónicos como el Tween 20 y soluciones bloqueadoras como la glicina, esta última, ayuda a recubrir los espacios que quedan vacíos e impide que en ellos se implante un componente no específico de la reacción, permitiendo así, que se de en el sistema una intensidad de color que sea directamente

proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra problema (Iglesias, L. y col. 1985).

El diagnóstico serológico de la meningitis tuberculosa usando el método de ELISA dependerá del antígeno empleado. Algunos estudios utilizan antígenos altamente purificados incluyendo proteínas y lípidos y algunos más solo mezclas antigénicas, siendo más utilizados extractos antigénicos solubles de M. bovis en primer término y de M. tuberculosis en segundo (Benjamín, S.M. y col. 1984).

En este trabajo fueron empleados extractos antigénicos solubles de M. bovis y M. tuberculosis unidos a la fase sólida por medio de un amortiguador de boratos pH 8.4, encontrando una diferencia suficientemente significativa entre la sensibilidad de los dos sistemas ($p < 0.001$). El extracto antigénico de M. bovis reportó un mayor número de casos con presencia de anticuerpos IgG dirigidos a mycobacterias. Sin embargo, el rango de absorbancia reportado es muy bajo comparado con el antígeno de M. tuberculosis ($x = 0.453$ y $x = 1.137$ respectivamente).

La presencia de falsos negativos reportados al utilizar el antígeno de M. tuberculosis puede explicarse por la existencia de factores anérgicos presente en algunos individuos que al encontrarse en un estado agudo de infección, llegan a enmascarar la respuesta inmune humoral (Bach, J.F. 1983) posiblemente por la intervención cooperadora del sistema inmune celular, de ahí que los niveles de anticuerpos registrados sean muy bajos sin que

esto quiera decir que la infección haya cedido.

Las infecciones causadas por mycobacterias inducen hacia una respuesta inmune humoral. El papel de los anticuerpos no está claro, pero se les atribuye un papel secundario como moléculas reguladoras de la respuesta inmune (Vaca,G.O. 1985). Su inicio puede estar dado por el contacto del individuo con el antígeno al ser aplicada la vacuna de BCG, o por exposición aérea, desarrollándose anticuerpos IgM que pronto decaen. Un segundo contacto con el antígeno provocará el reemplazamiento de IgM por IgG y el título de anticuerpos se incrementa rápidamente hasta alcanzar un nivel constante que persiste a lo largo del periodo clínico de la infección, y aún después de la desaparición del inmunógeno, produciéndose células de memoria que permitirán el reconocimiento instantaneo del antígeno en etapas posteriores.

En este trabajo se encontró que el título de IgG se eleva considerablemente en el grupo control positivo alcanzando un límite de positividad de 0.497 en el sistema que emplea el antígeno de M. tuberculosis y de 0.122 en el segundo sistema; dichos títulos fueron obtenidos en el análisis de suero. Estos resultados se correlacionaron con otros estudios similares (Grange y col. 1980; Benjamín y Daniel, 1982; Kalish y col. 1983; Freedman y col. 1966; Zeias y col. 1982; Krambovitis. 1986) (Tomado de Krambovitis,E. 1986). Por otro lado, la actividad de los anticuerpos IgM no fué apreciada con claridad, debido

a que no se encontró una diferencia notable entre los distintos grupos estudiados, ni aún entre un mismo grupo, encontrándose una heterogenicidad entre los valores de D.O. que reportan títulos con rangos que van de 0.055 a 0.470; 0.031 a 0.165; 0.052 a 0.556. En estudios previos se ha observado una aglutinación de IgM con M. tuberculosis que contribuye significativamente a la incidencia de falsos positivos en pruebas serológicas, en los cuales se ha ensayado antígenos fúngicos dependientes del isotipo IgM. La elevación de IgM ha sido también reportada en tuberculosis (Grange, 1980).

Para poder establecer la sensibilidad del isotipo IgM, sería necesario contar con un modelo experimental que nos permita obtener la cuantificación de IgM durante la respuesta primaria de anticuerpos, ya que de lo contrario el sistema inmunológico en una reactivación o una infección crónica como la meningitis tuberculosa, acorta el periodo de permanencia de la inmunoglobulina circulante, actuando rápidamente las células de memoria.

Por otro lado podemos observar que en nuestro grupo de estudio con un cuadro clínico presuntivo de tuberculosis pulmonar se encontraron 2 casos reactivos en presencia del antígeno de M. tuberculosis, mientras que 7 observaron reactividad a M. bovis. Puede resultar lógica esta conducta tan exagerada hacia el segundo antígeno ya que la mayoría de los pacientes que manejamos cursaban con más de 13 meses de edad y ya habían recibido una inmunización previa con BCG, y por ello

el sistema inmune reconocería con mayor facilidad al antígeno. Sin embargo, existen antígenos de reacción cruzada con M. tuberculosis como el antígeno 5 y 6, por lo que se puede apreciar casos de reconocimiento a los dos antígenos empleados. Esta misma conducta es observada para el grupo de pacientes que presentaron un cuadro clínico presuntivo de meningitis tuberculosa, en donde dicha positividad correlaciona en solo dos casos con la presencia de antígenos mycobacteriales presentes en LCR, reportando niveles de anticuerpos IgG en el mismo LCR con títulos relativamente elevados, sin embargo, hay dos casos en los que el serodiagnóstico es positivo pero no se encontró evidencia de la presencia del antígeno; esto puede documentar que la presencia del antígeno posiblemente esté enmascarada por la presencia de complejos inmunes, o que la concentración de antígeno sea mínima que no es detectada por nuestro sistema, o bien que el paciente se encuentre bajo tratamiento y se disminuyera la concentración antigénica al grado de no ser detectada. Sin embargo, la respuesta humoral puede manifestarse por la presencia de anticuerpos de memoria.

La presencia de complejos inmunes en pacientes con tuberculosis fué demostrada (Carr, y col. 1980; Johnson, y col. 1981) (Tomado de Grange, J.M. y col. 1980), dando una relación inversa entre la concentración de complejos inmunes y anticuerpos anti-mycobacteriales. La liberación constante de antígeno hacia el sitio de infección puede comportarse como; 1) Una

estimulación crónica de síntesis de anticuerpos resultantes de una producción progresiva de anticuerpos y 2) la formación de complejos inmunes circulantes de anticuerpos menos reactivos los cuales liberan antígeno resultando una reducción considerable de anticuerpos detectables (Krambovitis, E. y col. 1984).

Con respecto al grupo de pacientes con un diagnóstico de meningitis piógena, podemos observar (figura 5) que un gran número de individuos alcanza valores similares a los del grupo de pacientes con meningitis tuberculosa, lo cual puede indicar una posible inmunización previa; o bien una baja especificidad del sistema, presentándose una respuesta de reacción cruzada por el reconocimiento del agente causal (H. influenzae y St. pneumoniae) a nuestros antígenos empleados; o una tercera alternativa que estaría ligada con el bajo rango de absorbancia obtenido y que puede tender a dar reacción inespecífica al sistema. Al ser manejados estos mismos pacientes por la ELISA directa, encontramos que no presentan reactividad a la prueba, lo que nos descarta la posibilidad de una infección por mycobacterias encontrando resultados iguales para el grupo de pacientes con una meningitis viral (Figura 8) aumentando así la especificidad a este segundo sistema.

Como puede apreciarse en los resultados obtenidos, el rango de absorbancia para la detección de anticuerpos en LCR no es muy alta comparada con los valores obtenidos en suero, debido a que la respuesta inmune humoral en el Sistema Nervioso

Central esta dada por una síntesis intratecal de inmunoglobulinas oligoclonales (Hernández,R. y col.1984), la concentración de anticuerpos que podemos encontrar es mínima. Posiblemente podríamos aumentar el rango de absorbancia, con una mayor concentración de LCR.

7. CONCLUSION:

La elevada frecuencia de las neuroinfecciones en nuestro país hace imperativo contar con métodos de diagnóstico sensibles y específicos ya que la etiología de esta entidad puede ser causada por bacterias, virus y hongos. Los estudios hasta ahora establecidos en relación al diagnóstico de la meningitis tuberculosa, parecen no reunir las condiciones necesarias de especificidad y sensibilidad requeridas para establecer una correlación entre el cuadro clínico y datos de laboratorio, pues su diagnóstico sigue basado en la confirmación bacteriológica.

El análisis inmunoenzimático ELISA es un método adecuado para el diagnóstico de la meningitis tuberculosa. Su sensibilidad dependerá del antígeno empleado, consideramos que trabajar con extractos antigénicos solubles de M. bovis ofrece una gran ventaja en cuanto a su facilidad de obtención y manejo, sin embargo, el rango de absorbancia que reporta no es suficiente para poder establecer la presencia de una infección actual o el reconocimiento de anticuerpos de memoria adquiridos por la inmunización con BCG o por un contacto aéreo con alguna mycobacteria, como es posible establecerlo con mayor claridad al utilizar el antígeno de M. tuberculosis.

La obtención de antígenos específicos a una determinada fracción antigénica de las células de M. tuberculosis y M. bovis puede dar una mayor oportunidad para la captación de los casos clínicos con historia de meningitis tuberculosa, y aún más, si a

partir de dichos antígenos se obtienen anticuerpos específicos a estos, permitiéndonos así la detección del agente causal.

La determinación de anticuerpos de la clase IgG dirigidos a mycobacterias permite una mayor detección del estado actual de la enfermedad infecciosa, mientras que la IgM puede llevar a la confusión con resultados falsos positivos o negativos. Sin embargo los valores de D.O. al trabajar en LCR son muy bajos, por lo que sería necesario concentrar el LCR antes de ser analizado.

La detección de antígenos mycobacteriales presentes en LCR es la evidencia necesaria para establecer el diagnóstico certero de una meningitis tuberculosa.

Sería interesante trabajar con modelos experimentales que permitan apreciar el comportamiento de los títulos de los anticuerpos de los isotipos IgM e IgG y establecer las significancias que guardan los valores a lo largo de la infección y la recuperación, así como sus niveles de concentración antigénica.

APENDICE I.**MEDIOS DE CULTIVO:****LOWESTEIN JENSEN:**

A) Base salina (Baltimore Biological Laboratory 01-402).

Fosfato monopotásico.....	2.50g
Sulfato de magnesio.....	0.24g
Citrato de magnesio.....	0.60g
L-Asparagina.....	3.60g
Fluoruro de potasio.....	30.00g
Verde de malaquita.....	0.40g

B) Homogenizado de huevo..... 1000.00ml

PROCEDIMIENTO:

A) Suspender 37.3g de el material deshidratado en 600ml de agua destilada con 12ml de glicerol. Calentar a ebullición con agitación constante. Esterilizar en autoclave a 121 C, 15lbs de presión por 15 minutos.

B) Lavar los cascarones de huevo dejándolos sumergidos en agua jabonosa por 12h enjuagándolos con agua corriente.

Secarlos y desinfectarlos sumergiéndolos en alcohol etílico industrial. Secarlos con un lienzo estéril.

Romper cada huevo y colocar el contenido en un matraz con perlas de cristal (estéril), homogenizar y filtrar a través de

un embudo Buchner y gasa estéril, hasta completar un litro.

MEDIO COMPLETO:

Adicionar a la base salina fría el homogenizado de huevo y distribuirlo en tubos de tapón de rosca de 20 x 150, aproximadamente de 5 a 7 ml en cada uno.

Coagular por media hora a 85° C.

Colocar a prueba de esterilidad 48h a 37 °C.

Guardar en refrigeración con tapones bien ajustados y al abrigo de la luz.

PROSKAWER Y BECK (PBY)

L-Asparagina	5.0g
(Hazleton 90-105-050)	
Fosfato monopotásico	2.5g
Sulfato potásico	2.5g
Citrato de magnesio	1.5g
Glicerol	50.0ml
Agua destilada	1000.0ml

PROCEDIMIENTO:

Disolver los ingredientes en el agua destilada en el orden descrito, asegurándose de que se solubilice por completo antes de añadir el siguiente.

Ajustar el pH a 6.8-7.0 y añadir 0.15g de citrato de sodio.

Esterilizar a 110 °C, 110lbs de presión por 10 minutos.

**Realizar la prueba de esterilidad durante 48h en incubación
a 37 °C.**

APENDICE II.**REACTIVOS:****AMORTIGUADOR SALINO DE FOSFATOS (PBS) pH 7.2 0.15M**

Cloruro de sodio.....	8.00g
Fosfato de sodio dibásico.....	1.15g
Fosfato de potasio monobásico.....	0.20g
Cloruro de potasio.....	0.20g
Agua destilada y desionizada.....	1000.00ml

AMORTIGUADOR SALINO DE FOSFATO-TWEEN 20 0.05%

PBS pH 7.2.....	1000.00ml
Tween 20.....	0.50ml

AMORTIGUADOR DE BORATOS pH 8.4 0.20M.

Acido bórico.....	6.80g
Tetraborato de sodio.....	9.15
Cloruro de sodio.....	4.38g
Agua destilada y desionizada.....	1000.00ml

AMORTIGUADOR FOSFATO-CITRATO pH 5.4 0.30M.

Acido cítrico.....	24.30ml
Fosfato de sodio monobásico.....	25.70ml
Agua destilada y desionizada cbp.....	50.00ml

SOLUCION BLOQUEADORA 2%.

Glicina	(Sigma G.7126)	2.00g
PBS-Tween	20	0.05% 100.00ml

CONJUGADOS:

Los anticuerpos anti-IgG y anti-IgM humanas unido a una peroxidasa (Cappel y Tago respectivamente), fueron disueltos en PBS-Tween 20 0.05%.

SUSTRATO

Amortiguador	fosfato-citrato	pH 5.4 10.00ml
Ortofenilendiamina	(Sigma P-1526)	40.00mg
Peróxido de hidrógeno	30% (Sigma)	10.0

El sustrato se prepara inmediatamente antes de usarlo (se daña ante la luz).

ACIDO SULFURICO:**6.0N**

Acido sulfúrico	40.00ml
Agua destilada y desionizada	cbp 100.00ml

SOLUCION SALINA-BORATOS:**pH 8.6**

Amortiguador de boratos	10.00g
Solución salina fisiológica	0.85% 100.00ml

FENOL 10X

Fenol.....	10.00g
Agua destilada cbp.....	100.00ml

ACETONA-METANOL

Acetona.....	50.00ml
Metanol.....	50.00ml

ADYUVANTE COMPLETO DE FREUD (ACF)

Arlacel A (Sigma A.8009).....	1.00ml
Drakeol 6 con aceite mineral 55/65 (Penn Drake)	9.00ml
<u>Mycobacterium bovis</u>	5.00mg*

*Peso seco.

SOLUCION DE SULFATO DE AMONIO pH7.8 0.1M

Sulfato de amonio.....	100.00g
Agua destilada.....	100.00ml

Se agita durante 10 minutos y se calienta a ebullición con agitación constante durante 10 minutos.

AMORTIGUADOR GLICINA-HCl pH 2.6 0.1M

Glicina (Sigma G.7126).....	7.80g
Agua destilada.....	1000.00ml

Ajustar el pH con HCl 2N.

APENDICE III.**PROCEDIMIENTOS:****PREPARACION EN SECO DE M. bovis.**

Se obtiene la masa bacilar de M. bovis a partir de un cultivo puro, por medio de centrifugación a 3015g. Se realizaron 3 lavados con solución salina estéril 0.85% durante 30 minutos cada uno.

El paquete así obtenido es suspendido en acetona y se incuba a 37 °C hasta su total desecación (aproximadamente 10 minutos).

TINCION ACIDO-RESISTENTE

Preparar una emulsión de mycobacterias en solución de albumina al 1%.

Realizar un frotis en el portaobjetos.

Dejar secar al aire y fijar a la flama.

Agregar carbolfushina de Ziwahl-Neelsen.

Flamear con el mechero hasta emisión de vapores (sin hervir).

Lavar con agua corriente.

Agregar alcohol acidulado gota a gota hasta que no arrastre colorante.

Lavar con agua corriente.

Adicionar el colorante de contraste (azul de metileno de Loeffler) por un minuto.

Lavar con agua corriente.

Observar a inmersión.

DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY.

- 1.-Reactivo A; Solución de bicarbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.1N.
- 2.-Reactivo B; Solución de sulfato de cobre al 5% en cloruro de sodio al 1%.
- 3.-Reactivo C; Mezclar 1ml del reactivo B en 50ml del reactivo A.
- 4.-Reactivo D; Reactivo de Folin Ciocalteau diluido 1:3 en agua destilada.
- 5.-Solución tipo de proteínas; solución de albúmina sérica bovina 0.5mg/ml en solución A.

PROCEDIMIENTO:

No.TUBO	BSA 0.5mg/ml.	REACTIVOS:		
		A	C	D
1	0.1	0.4	5.0	0.5
2	0.2	0.3	5.0	0.5
3	0.3	0.2	5.0	0.5
4	0.4	0.1	5.0	0.5
5	0.5	0.0	5.0	0.5
6	0.0	0.5	5.0	0.5

Lectura de DO.a 550nm.

* Incubación de 10 minutos.

** Incubación de 30 minutos.

---Los problemas se trabajan como el punto no. 5

---El reactivo C y D se preparan en el momento en que se va a usar.

---Todos los tubos se agitan por inversión.

OBTENCION DE INMUNOGLUBULINAS TOTALES.

1.- Precipitación al 50% de saturación:

a) Precipitar suero adicionando gota a gota sulfato de amonio concentrado hasta completar un volumen igual al inicial del suero.

b) Agitar durante 15 minutos con agitador magnético en baño de hielo.

c) Centrifugar a 3015g durante 10 minutos.

d) Disolver el precipitado en el mismo volumen inicial con solución salina fisiológica 0.85%.

2.- Precipitación al 33% de saturación:

Adicionar gota a gota sulfato de amonio (hasta completar la mitad del volumen original en suero y repetir los pasos desde el inciso B.

3.- Repetir el paso 2.

4.- Dializar en solución salina de boratos pH 8.4 durante 76h con cambios de solución cada 24h.

PURIFICACION DE IgG ANTI-M. bovis DE CONEJO:

1.- En una columna de Proteína A-Shepharosa adicionar 4ml de amortiguador de glicina HCl pH 0.1M permitiendo su paso a través de ella y recolectarla.

2.- Lavar la columna con PBS pH 7.2 hasta que el lavado alcance una absorbancia menor de 0.2nm, tomando las lecturas a un D.O. de 280nm.

3.- Adicionar gammaglobulinas totales de anti-M. bovis de conejo e incubar 20 minutos a temperatura ambiente.

4.- Repetir el paso 2.

5.- Adicionar 5 ml de amortiguador de glicina-HCl pH 2.6 y coleccionar el líquido.

6.- Lavar la columna con PBS pH 7.2 y recoleccionar el líquido del lavado en alicuatas de 3 ml.

7.- Determinar la absorbancia a 280nm.

8.- Determinar la concentración de proteínas por el método de Lowry.

APENDICE V.
FIGURAS:



FIGURA 1. Desarrollo de M. tuberculosis en medios de Lowenstein por un periodo de incubación de cuatro semanas.

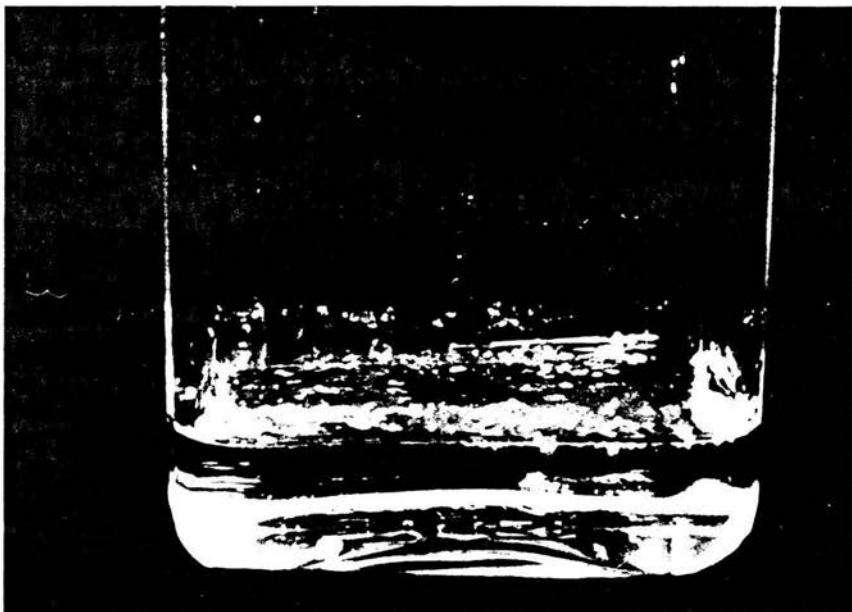


FIGURA 2. Desarrollo de M.tuberculosis H37Rv en medio de Proskauer y Beck por un periodo de incubación de cuatro semanas. En la figura se puede observar el desarrollo característico en la superficie.

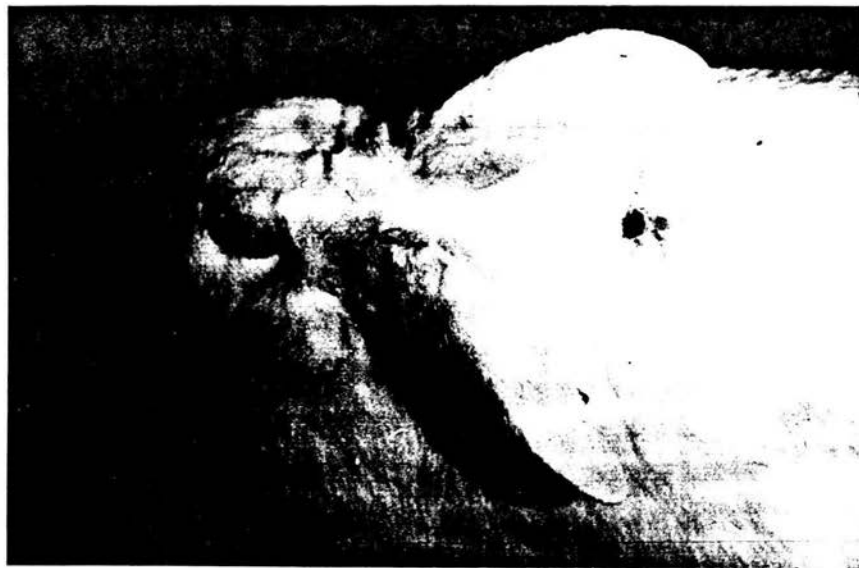


FIGURA 3. Reacción de Mantux en conejo. La fotografía fué tomada después del 66 día de inoculación con extracto antigénico de M.bovis.

BIBLIOGRAFIA:

Bach, J.F. (1983). *Inmunología*. Masson. Barcelona, España. 258 - 259.

Benjamín, S.M., y col. (1984). Evaluation of Mycobacterial antigens in an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of tuberculous. *J. Med. Microbiol.* 18: 309-318.

Burrows, W. (1968). *Tratado de Microbiología*. 19 Ed. Interamericana. México, D.F. 648-661.

Calderón, J.E. (1979). *Conceptos clínicos de infectología*. Francisco Méndez Cervantes. México. 223-231.

Cárdenas, A.V. (1987). *Tuberculosis en México, 1982-1986*. Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología. México, D.F.

Chandramuki, y col. (1985). Detection of mycobacterial antigen and antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis. *J. Med. Microbiol.* 2: 239-247.

Daniel, T.M. and Jawck, B.W. (1978). Mycobacterial antigens A review of their isolation, chemistry and immunological properties. *Microbio. Rev.* 42 (1): 84-113.

Daniel, M.T. (1987). New approaches to the rapid diagnosis of tuberculous meningitis. *J. Infec. Dis.* 155 (4): 599-602.

Davis, B. y col. (1973) *Tratado de Microbiología*. Salvat Editores. México, D.F. 856-886

Editorial. (1973). Immuno-electrophoretic Analysis of Antigenic Constituents of Seibert Fractions of Mycobacterial Culture

Filtrates. Amer. Rev. of Dis. 108: 1244-1247.

García, O. y Gutiérrez, V. (1982). Diagnóstico de la tuberculosis pulmonar crónica por el método de inmunoensayo enzimático. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 24 (3): 193-203.

Grange, J.M., Gibson, J. y Nassau, E. (1980). Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA): A study of antibodies to Mycobacterium tuberculosis in the IgG, IgA and IgM classes in tuberculosis, sarcoidosis and Crohn's disease. Tubercle. 61: 145-152.

Hernández, L.J. (1985). Estandarización de la técnica de ELISA para su uso en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. TESIS. IPN. México. Pags. 75.

Hernández, R. y col. (1984). Sensitive enzyme immunoassay for tuberculous meningitis. J. Clin. Microbiol. 20 (3): 516-525.

Iglesias, S.L. y col. (1985). Análisis inmunoenzimático. Rev. Mex. Patol. Clin. 32(2): 53-58.

Kadival, V.G. y col. (1987). Radioimmunoassay for detection M. tuberculosis antigens in cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis. J. Infec. Dis. 155 (4): 608-611.

Krambovitis, E. y col. (1984). Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by latex particle agglutination. The Lancet. 2: 1229-1231.

Krambovitis, E. (1986). Detection of antibodies to M.tuberculosis plasma membrane antigen by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Med. Microbiol. 21: 257-264.

Lowry, H.O. y col. (1957). Protein measurement with the

folin phenol reagent. J. Biol. Chem. (EUA). 193: 265.

Muñoz, O.L. (1986). El enfermo con neuroinfecciones. Atención Médica. 16 (17): 13-20.

Rivera, E. y col. (1987). Activity of adenosine deaminase in cerebrospinal fluid for the diagnosis and follow-up of tuberculous meningitis in adults. J. Infec. Dis. 155 (4): 603-607.

Sada, E. y col. (1983). Detection of mycobacterial antigens in cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis by enzyme linked immunosorbent assay. The Lancet. 17:651-652.

Samuel, S.M. y col. (1983). A sensitive and specific method for diagnosis of tubercular meningitis. Indian. J. Med. Res. 77: 752-757.

Santos, A.L., y col. (1986). Estandarización del inmunoanálisis enzimático. Infectología. VI(1): 18-23.

Selvakumar. y col. (1985). Cerebrospinal fluid lysozyme in the diagnosis of tuberculous meningitis. Indian J. Med. Res. 82: 479-481.

Vaca, G.O. (1985). Inhibición in vitro de la transformación blastoide de células de pacientes tuberculosos no reactivos. TESIS. UNAM. México, D.F. Pags. 70.

Vinneta, B. y col. (1983). Enzyme linked immunosorbent assay for mycobacterial antigens. Indian J. Med. Res. 78: 477-483.

Voller, A., Bidwell, D.E. y Bartlett, A. (1979). The enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Dinattech Laboratories, INC. USA. 9-59.

Waldo, E. y col. (1971). Tratado de pediatría. 6 Ed. Intera-

mericana. México, D.F. 614-616.

Yumans, M.D.(1979). Tuberculosis. W.B. Saunders Company.
Philadelphia, E.U. Pags. 511.