

92
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

TITULO:

CORRELACION DE DOS METODOS (ELISA Y CULTIVO PARA MICOBACTERIAS) PARA EL DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS MENINGEA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE;
B I O L O G O
P R E S E N T A ;

LUCIANO HERNANDEZ GOMEZ



FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

LA VIDA

La vida es una larga cadena, en donde, los eslabones que la componen son las experiencias vividas y cada uno de ellos nos refleja las alegrías y sufrimientos pasados en cada uno de sus momentos.

¡ Vivir ! es lo más bello en esta vida, donde, los sufrimientos no son tan grandes como se creen, ante el poder respirar tranquilamente y dejar las cosas vanas que nos entristecen.

¡ Vivir ! es lo más bello en este mundo, por eso, hay que vivir lo mejor posible, evitando los problemas que se encuentran día con día y sonriendo a nuestro enemigo se mantendrá el alma tranquila y en paz.

Para vivir mejor hay que hacer las cosas que nos gustan, por que así se tendrá en paz el espíritu, y así mismo, hay que luchar por lo que se quiere con amor y voluntad para no tener recuerdos vanos.

Por eso hay que caminar feliz por los caminos de la vida buscando verdaderos caminos y no senderos sin fin, esos caminos verdaderos son los caminos que tienen corazón y para encontrarlos, sólo se necesita tener voluntad y hacer las cosas con amor y humildad.

LUCIANO HERNANDEZ GOMEZ

INDICE

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
INTRODUCCION	6
ANTECEDENTES	7
OBJETIVOS	9
MATERIAL Y METODOS	10
Pacientes	10
Material de laboratorio	10
Reactivos	11
Medios de cultivo	12
Método de ELISA, doble sandwich, con anticuerpos policlonales	12
Conjugación	12
Estandarización de ELISA	13
Determinación de la dilución óptima del conjugado después de la reacción inmunológica	13
Estandarización de la técnica de ELISA para la determinación de antígeno de <u>M. tuberculosis</u> .	14
Método bacteriológico	15
Análisis estadístico	16
RESULTADOS	19
DISCUSION	22
TABLA 1	24
TABLA 2	25
TABLA 3	26
APENDICE A	27
APENDICE B	28
APENDICE C	29
APENDICE D	30
GRAFICA 1	31
GRAFICA 2	32
GRAFICA 3	33
GRAFICA 4	34
DIAGRAMA DE FLUJO	35
BIBLIOGRAFIA	36

DEDICATORIA

Esta tesis no solo es un trabajo hecho sino que representa, el esfuerzo la lucha constante y la dedicación de una sola persona, que siempre ha tratado de sacarme adelante, con su apoyo económico y más aún, su apoyo moral que día con día me impulsa a la superación, a la lucha constante por vencer los obstáculos que se presentan en mi camino, sin importar que tan grandes sean estos...

Esta persona es mi MADRE, que tan solo con nombrarla mi corazón se llena de alegría, por que ella con su ejemplo me ha enseñado a seguir adelante... y es por eso que a tí mamacita linda dedico este trabajo fruto de tu esfuerzo.

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá Margarita Gómez T. y a mis hermanos Ma. Guadalupe, Alfredo, Francisco, Jesús y José L. Hernandez Gómez, por su apoyo brindado en cada momento.

A mis maestros Miguel A. Beltrán B. y Fanny E. Camacho G. por su contribución en mi formación como Biólogo.

A mi abuelita María Torres y a mis tíos Agustín y Leobardo Gómez T. por su apoyo moral.

A Miriam Bobadilla y Yolanda Lopez por que sin su ayuda no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A todo el departamento de Infectología, en especial al laboratorio de microbiología clínica por su apoyo obtenido desde el primer momento que entre en su círculo hasta en la realización de este trabajo especialmente a Chelo, Pancho, Anita y Vero.

Al INNSZ, INP, INN, Centro M. la Raza por su apoyo en la obtención de muestras.

A todos mis sinodales: Miriam B., Alfredo Echeagaray, Carmen N. Herrera, Miguel A. Beltrán y Rebeca Maciel, por haber aceptado estar en estos momentos que para mi han sido muy importantes.

A todos los profesores que, desde la primaria hasta el término de la licenciatura, contribuyeron en mi formación.

Y por último a la vida por que sin ella no hubiera podido realizarlo y a Dios por su consuelo que en los momentos más difíciles he obtenido.

Agradezco:

Al Dr. José Sifuentes por su asesoría y dirección en la realización de esta tesis y por la paciencia dada durante la escritura de la misma.

I.-INTRODUCCION

La meningoencefalitis tuberculosa (MTB) es una de las complicaciones más graves de la tuberculosis primaria en niños y continúa siendo un importante problema de salud pública en países donde la enfermedad es endémica. El diagnóstico definitivo requiere del aislamiento e identificación de Mycobacterium tuberculosis, lo cual demora de cuatro a ocho semanas, por lo que se requiere de una prueba rápida, sensible y específica para el diagnóstico temprano de esta enfermedad.

La Dirección General de Epidemiología del Sector Salud informó 84 casos acumulados de MTB hasta agosto de 1986 y el 45% ocurrió en menores de 15 años de edad (1).

En el Hospital Infantil de México se atendieron 118 casos de MTB en 1988, 10% de los cuales se diagnosticaron en base a manifestaciones clínicas y a otros parámetros de gabinete o laboratorio sin obtenerse cultivos positivos para M. tuberculosis (2).

La posibilidad de aislar M. tuberculosis del cultivo varía de acuerdo a la cantidad de líquido cefalorraquídeo (LCR) analizado, al número de muestras obtenidas, a los medios de cultivo disponibles y a la experiencia del laboratorio; por lo que se han informado resultados tan variables como 7% a 83% de positividad (3,4,5). Se ha informado que el frotis para la búsqueda de M. tuberculosis es positivo del 2% al 8% de casos (3,5). Otros métodos de diagnóstico inespecíficos en MTB son: la prueba de partición de bromuro radioactivo con una sensibilidad de 94% y una especificidad de 88%, y que valora la ruptura de la barrera hematoencefálica en MTB (19); la determinación de adenosina-deaminasa, enzima que es excretada por linfocitos T, guarda alta correlación con inflamación meníngea de tipo crónico (12,13), y la tomografía axial computarizada reporta cambios característicos aunque no específicos de MTB, como son dilatación ventricular por obstrucción basal y datos con vasculitis con medio de contraste (20).

Otros procedimientos que han demostrado ser útiles en el diagnóstico de MTB son: la detección de anticuerpos contra M. tuberculosis o antígeno de M. tuberculosis en LCR que se realizan por diversos métodos (6,7,8,9) aunque varían en sensibilidad y especificidad, la determinación de antígeno en LCR puede ser de gran ayuda para establecer el diagnóstico de MTB lo que permitirá iniciar con cierto margen de seguridad la terapéutica antimicrobiana antes de tener la confirmación bacteriológica.

II.- ANTECEDENTES

En el serodiagnóstico de MTB se han utilizado métodos no inmunológicos específicos como: el de cromatografía de gases (9) para detección de fragmentos constitutivos de la pared celular de M. tuberculosis y métodos radiométricos que se fundamentan en la detección de un compuesto, producto de la asimilación de otro compuesto marcado con un isótopo radioactivo (9). Métodos no inmunológicos inespecíficos como la determinación de adenosina- deaminasa (12,13). También se han empleado métodos inmunológicos tales como el inmunoensayo enzimático (ELISA siglas en inglés ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) tipo doble sandwich e inhibición competitiva para la detección de antígeno y anticuerpos contra M. tuberculosis (19). El método de ELISA ha tenido aplicación e interés para el desarrollo de pruebas diagnósticas de la tuberculosis activa, Nassau *et al.* (10) describieron por primera vez la utilidad de la detección de anticuerpos específicos contra M. tuberculosis en suero empleándose como antígeno la pared celular de M. tuberculosis

en la fase sólida (22). Posteriormente, se realizaron modificaciones en el recubrimiento de la fase sólida, para lo que se han utilizado diferentes antígenos sin embargo, se ha observado variabilidad en la sensibilidad y en la especificidad por lo que se han hecho estudios para comparar antígenos purificados y sin purificar (15,16). Daniel et al. compararon al Bacillus de Calmette y Guérin (BCG) sonificado contra filtrado, sonificado y extracto de M. tuberculosis reportándose un mayor porcentaje en la detección de TB pulmonar con sonificado y extracto de M. tuberculosis, existe también, experiencia con antígenos purificados como son el 5 y el 6 (11,17) con clara superioridad en la capacidad de detección de infecciones por M. tuberculosis. El empleo de anticuerpos monoclonales en los ensayos inmunoenzimáticos ha incrementado hasta en un 20% la sensibilidad y especificidad de la detección del antígeno de M. tuberculosis (18). Hernández et al. y otros investigadores (6) reportaron sensibilidad y especificidad del 100% en la detección de anticuerpos específicos contra M. tuberculosis. Previamente en México, Sada et al. informaron una sensibilidad del 81.25% y especificidad del 95% utilizando un ELISA con anticuerpos policlonales contra BCG en la fase sólida para la detección de antígeno de M. tuberculosis en LCR para diagnósticos de MTB (8). Otras técnicas que se han empleado para la detección de antígeno de M. tuberculosis son: radioinmunoensayo y aglutinación con latex (9).

El aislamiento de M. tuberculosis en LCR es difícil por la baja concentración del organismo en el LCR dado que las lesiones meníngeas son de tipo miliar y no excretoras de bacilos, sin embargo, utilizando métodos de concentración bacteriana (21) se puede mejorar importantemente la recuperación de M. tuberculosis.

El propósito de este estudio fue comparar la detección de antígeno de M. tuberculosis en LCR por el método de ELISA con el método de cultivo de M. tuberculosis por filtración en LCR y a su vez observar la correlación que existe entre estas pruebas.

III.- OBJETIVOS

a) Definir el valor diagnóstico de la determinación de antígeno de M. tuberculosis en LCR por el método de ELISA.

b) Comparar la eficacia diagnóstica de el antígeno de M. tuberculosis en LCR con el cultivo de Mycobacterium sp.

IV.- MATERIALES Y METODOS

1.- Pacientes

Incluimos muestras de LCR colectados de pacientes con sospecha diagnóstica de MTB o bien con otras enfermedades, hospitalizados en el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubiran, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Centro Médico la Raza, IMSS; e Instituto Nacional de Pediatría. Los pacientes se distribuyeron en tres grupos:

Grupo 1 : MTB confirmada (cultivo positivo y manifestaciones clínicas de MTB); Grupo 2 : MTB probable (cultivo negativo y manifestaciones clínicas de MTB) y Grupo 3 : sin TB (cultivo negativo y diagnóstico clínico de otra enfermedad).

La muestra de LCR se colectó en recipiente estéril y se tomó una alícuota de 100-200mcl para serología por ELISA y otra de 500mcl para el cultivo por filtración.

2.- Material de laboratorio

2.1 Material de vidrio de laboratorio

2.2 Espectrofotómetro (Thomas spectro analytical system 720, Gilford U.S.A.)

2.3 Espectrofotómetro (Behring ELISA processor II, Alemania Federal).

2.4 Agitador magnético (Hot-Plate-Stirrer P.C. 351 Corning, U.S.A.).

2.5 Centrifuga (Damon/IEC, división IEC PR-J centrifuge U.S.A.) 2.6 Incubadora (Precision, Mechanical Convection Incubator, U.S.A.).

2.7 Incubadora con flujo de CO₂ (Industrial/Bioquimical Laboratory Apparatus, NAPCO e series. U.S.A.)

2.8 Columna cromatográfica (Biogel P-4 Lab.,Bio-Rad. U.S.A.).

2.9 Pipeta automática de 10-100 mcl.(Eppendorf, U.S.A.).

2.10 Pipeta automática de 100-1000 mcl.(Eppendorf).

2.11 Pinzas

- 2.12 Jeringas de plástico de 10 ml.(Plastipack, Becton-Dickinson, México).
- 2.13 Microplacas de poliestireno recubiertas con inmunolon II (Beckman, California, U.S.A.).
- 2.14 Filtros y membranas Millipore de 0.45 mmc(Millipore,Méx.)
- 2.15 Bolsas de diálisis con índice de exclusión de 12000-14000 daltons(Arthur H. Thomas, U.S.A.).

3.- Reactivos

- 3.1 Solución salina isotónica 0.85% (SSI) pH 6.0.
- 3.2 Solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS) 0.01M pH 7.4
- 3.3 PBS 0.01M pH 7.2.
- 3.4 PBS más tween 20 (PBS-tween) 0.01M pH 7.4.
- 3.5 Solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 7.0.
- 3.6 Solución amortiguadora de bicarbonatos 1M pH 9.5.
- 3.7 Solución amortiguadora de citratos 0.0379M pH 5.5.
- 3.8 Glutaraldehído 1.25% (Sigma, U.S.A.).
- 3.9 Lisina 0.2M (Merck, México).
- 3.10 Cloruro de magnesio (MgCl₂) 1mM. (Merck).
- 3.11 Sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄ saturado pH 7.4 (Merck).
- 3.12 Acido sulfúrico (H₂SO₄) 1N. (Merck).
- 3.13 Merthiolate
- 3.14 Albumina sérica bovina (BSA) 1% (Sigma).
- 3.15 BSA factor V (BSA-factor V) 1% (Sigma).
- 3.16 Inmunoglobulinas G anti-BCG de conejo (IgG anti-BCG), (DAKO, U.S.A.).
- 3.17 Peroxidasa (Sigma).
- 3.18 Orto-fenil diamina (OPD), (Sigma).
- 3.19 Peroxido de hidrógeno (H₂O₂), (Merck).
- 3.20 Bio-gel P-4 con límite de exclusión de 4000 daltons (A.H. Thomas).

4.- Medios de cultivo

4.1 Medio de cultivo de Lowenstein-Jensen (DIFCO, U.S.A.)

4.2 Medio de cultivo 7H9 caldo (DIFCO).

4.3 Medio de cultivo 7H11 agar (DIFCO).

5.- Método de ELISA, doble sandwich, con anticuerpos policlonales.

5.1 Conjugación

Se acopló la IgG-antiBCG con la enzima peroxidasa, por el método de dos pasos de Voller y Bidwell (14) modificado:

5.1.1 Se mezcló un ml de IgG-antiBCG con un ml de sulfato de amonio saturado pH 7.4 en agitación durante 30 min, se centrifugó a 5000 rpm, 20 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con un ml de SSI.

5.1.2 La solución obtenida se mezcló nuevamente con 300ml de sulfato de amonio durante 30 minutos en agitación, se centrifugó a 5000 rpm, 20 minutos a 4°C, se decantó y el sedimento se resuspendió con un ml de SSI, luego se dializó contra SSI, durante 16 horas con cuatro cambios de la solución dializante.

5.1.3 Simultáneamente se centrifugó un volumen de dos ml de enzima peroxidasa (9.1mg de prot./ml) a 4000 rpm durante 20min a 4°C, se decantó y se resuspendió con 600ml de solución de glutaraldehído al 1.25% en PBS (0.1M, pH 6.8) y se incubó a temperatura ambiente durante 24 horas.

5.1.4 La enzima peroxidasa se purificó por cromatografía de columna con Bio-gel P-4.

5.1.5 Se seleccionaron las fracciones de mayor contenido enzimático por la coloración natural de la enzima, y se le denominó enzima activada.

5.1.6 A la IgG-antiBCG dializada se le determinó concentración de proteínas por el método de Biuret (23).

5.1.7 Se mezcló un ml de IgG-antiBCG (9.0 mg/ml) con un ml de la enzima activada

(18.0 mg/ml), se agregó un ml de solución amortiguadora de bicarbonato (1M, pH 9.5) y se incubó a 4°C durante 24 horas. Al final de la incubación se adicionaron 100ml de lisina (0.2M) y se incubó por dos horas a temperatura ambiente, seguida de una diálisis contra PBS (pH 7.2) a 4°C durante 24 horas, con cuatro cambios de solución dializante.

5.1.8 El volúmen final del dializado se mezcló con: cloruro de magnesio a una concentración final 1mM, BSA a una concentración final de 1% y merthiolate a una parte por millón. Se hicieron alícuotas de 500ml y se almacenarán a 4°C hasta su utilización.

5.2 Estandarización del ELISA

Se establecieron los tiempos óptimos de incubación y concentración de los reactivos de la técnica de ELISA para su estandarización y condiciones de trabajo de las muestras problema, de la siguiente manera:

5.2.1 Se prepararon diluciones del conjugado desde 1:4 hasta 1:65,536.

5.2.2 Se preparó sustrato OPD (diluyendo OPD con solución amortiguadora de citratos y agua oxigenada) y se adicionó a las diferentes diluciones del conjugado en una proporción de 20ml de conjugado y 80ml de sustrato por pozo para cada dilución y se incubó a temperatura ambiente en obscuridad durante 5 minutos.

5.2.3 Se interrumpió la reacción agregando 100ml de ácido sulfúrico (1N) a cada pozo y se leyó a 492nm de densidad óptica (O.D.).

5.2.4 Se graficó concentración vs. absorbancia (Gráfica 1).

5.3 Determinación de la dilución óptima del conjugado después de la reacción inmunológica.

5.3.1 En una microplaca de poliestireno EIA-Beckman se agregaron 100ml de IgG-antiBCG en una dilución final de 1:1000 por pozo y se incubó 18-24 horas a temperatura ambiente.

5.3.2 Se eliminó el exceso de anticuerpos de la placa lavando tres veces con 200ml de PBS-tween en cada pozo durante 3 minutos.

5.3.3 Se agregaron 100ml del control positivo (BCG 1:8) y se incubó a

37°C. durante 60 minutos.

5.3.4 Se repitió el paso b

5.3.5 Se agregaron 100ml de BSA-factor V al 1% por pozo y se incubó a 37°C durante 30 minutos.

5.3.6 Se eliminó de la placa el exceso de BSA-factor V lavando una vez con 200ml de PBS-tween (en cada pozo) durante tres minutos.

5.3.7 Se agregó el conjugado en diluciones de 1:4 hasta 1:65,536 y se incubó a 37°C durante 85 minutos.

5.3.8 Se eliminó el exceso de conjugado de la placa lavando cinco veces por tres minutos con 200ml de PBS-tween en cada pozo.

5.3.9 Se agregaron 100ml de sustrato OPD en cada pozo y se incubó a temperatura ambiente en obscuridad durante 10 minutos.

5.3.10 Se interrumpió la reacción agregando 100ml de ácido sulfúrico (1N) a cada pozo.

5.3.11 Se leyó la reacción a 492nm de D.O.

5.3.12 Se graficó concentración vs. absorbancia para definir la dilución óptima del conjugado. (Gráfica 2)

5.4 Estandarización de la técnica de ELISA para determinación de antígeno de *M. tuberculosis*

5.4.1 En una microplaca de poliestireno EIA-Beckman recubierta con inmunolón II se agregaron 100ml de IgG-antiBCG en una dilución final de 1:1000 y se incubó a temperatura ambiente de 18 a 24 horas.

5.4.2 Se eliminó el exceso de anticuerpos lavando tres veces con 200ml de PBS-tween en cada pozo con intervalos de tres minutos cada lavada.

5.4.3 Se agregaron 100ml de PBS y 50ml de LCR problema en cada pozo.

5.4.4 Se incubó la placa a 37°C durante 60 minutos.

5.4.5 Se repitió el paso 2

5.4.6 Se agregaron 100ml de BSA-factor V al 1% a cada pozo y se incubó 30 minutos a 37°C.

5.4.7 Se eliminó el exceso de BSA lavando una vez con 200ml de PBS-tween.

5.4.8 Se agregaron 100ml de conjugado a una dilución final de 1:7500 por pozo y se incubó a 37°C durante 85 minutos.

5.4.9 Se eliminó el exceso de conjugado lavando cinco veces con 200ml de PBS-tween por pozo a intervalos de tres minutos cada lavada.

5.4.10 Se agregaron 100ml de OPD por pozo y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 10 minutos.

5.4.11 Se detuvo la reacción con 100ml de H2SO4 1N por pozo.

5.4.12 Se leyó a 492nm

5.4.13 Los controles positivos y negativos se hicieron por duplicado.

5.4.14 Se determinó el punto de corte con la siguiente formula:

$$PC = \frac{\bar{X}_{CP} + \bar{X}_{CN}}{2}$$

PC= Punto de corte

\bar{X}_{CP} = Media del control positivo

\bar{X}_{CN} = Media del control negativo

6.- Metodo bacteriológico

El cultivo se hizo por concentración bacteriana del LCR. Con jeringa estéril se pasó el LCR por un filtro millipore con membrana, el filtrado se recibió en tubos estériles. En condiciones estériles se colocó (con pinzas) la membrana en el medio de Lowenstein-Jensen quedando el concentrado de bacterias sobre el medio de cultivo. Se etiquetó y se incubó a 37°C con un flujo de CO2 durante ocho semanas haciendo revisiones periódicas cada siete días. Al observar crecimiento bacteriano se hizo un frotis teñido con Ziehl-Neelzen y cuando fué positivo se sembró en caldo 7H9 y de ahí se pasó a una placa conteniendo el medio de agar 7H11 para su identificación (21) (DIAGRAMA DE FLUJO).

7.- Análisis estadístico

7.1 Medida de asociación en dos métodos (T), (25).

$$T = 2 (VP\% + VN\%) \cdot 1$$

VP%= Porcentaje del verdadero positivo

VN%= Porcentaje del verdadero negativo

7.2 Sensibilidad (S) y Especificidad (E), (26).

$$S = \frac{VP}{VP + FN} \times 100$$

$$E = \frac{VN}{VN + FP} \times 100$$

VN= Verdadero negativo

VP= Verdadero positivo

FN= Falso negativo

FP= Falso positivo

7.3 Valor Predictivo Positivo (VPP) y Valor Predictivo Negativo (VPN).

$$\text{VPP} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FP}} \times 100$$

$$\text{VPN} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FN}} \times 100$$

7.4 Prevalencia y Exactitud.

$$\text{PREVALENCIA} = \frac{\text{VP} + \text{FP}}{\text{VP} + \text{FP} + \text{FN} + \text{VN}}$$

$$\text{EXACTITUD} = \frac{\text{VP} + \text{VN}}{\text{VP} + \text{FP} + \text{FN} + \text{VN}}$$

7.5 Proporción de acuerdos en la población (27).

$$H_0: p \geq \sigma \quad \text{vs.} \quad H_a: p < \sigma$$

p = Proporción de acuerdos en la población de interes

σ = Valor predeterminado

H_0 = Hipotesis nula.

H_a = Hipotesis alterna

Ho se rechazara si $(a+d) < K$

$$K = Z_{\alpha} \sqrt{T/n} \sigma(1-\sigma) + \sigma$$

K = Constante

Z_{α} = Variable aleatoria

$a+d$ = Proporción de acuerdos en la muestra

7.6 T-student

7.7 Varianza

7.8 Diferencia de la lectura óptica entre el punto de corte (Factor de lectura).

$$F = \frac{L.O.}{PC}$$

F = Factor de lectura

PC = Punto de corte.

LO = Lectura optica

V.- RESULTADOS

1.- De las muestras colectadas en los diversos hospitales se obtuvieron las siguientes:

20	de	meningitis	tuberculosa
12	"	"	viral
04	"	"	por criptococo
03	"	"	bacteriana
06	"	"	sin etiología específica
02	"	carcinoma	meníngeo
07	"	otras enfermedades	infecciosas
12	"	otras enfermedades	no infecciosas
14	"	pacientes	normales

2.- Estandarización del método de ELISA.

Con la gráfica No 2 se determinó la dilución óptima de la enzima peroxidasa acoplada a la IgGanti-BCG que fué de 1:7500.

El tiempo de exposición para formación del doble sandwich fué de 85 minutos, el cual se obtuvo por variaciones de tiempo a partir de el descrito por Sada et al (90 minutos).

El tiempo de exposición del OPD (Sustrato) se determinó por variaciones de tiempo en la oxidación del sustrato y se estableció 10 minutos.

3.- Cultivo

Se aisló el M. tuberculosis en ocho muestras. Tres se aislaron a la tercera semana y los cinco restantes a las ocho semanas. Los tres grupos de muestras que se pudieron definir fueron:

El grupo 1 con MTB confirmada incluyó ocho pacientes con cultivo y ELISA (1.54 ± 1.33) positivos.

El grupo 2 con MTB probable incluyó 12 pacientes con tratamiento de antibióticos antituberculosos que fueron positivos por el método de ELISA (1.19 ± 0.77).

El grupo 3 que incluyó 60 pacientes, 33 con enfermedades infecciosas y los restantes con otras enfermedades (0.71 ± 0.46).

4.- Comparación

Por el método de ELISA se encontraron 22 LCR positivos. Comparando los métodos de ELISA y de cultivo, 66 muestras correlacionaron entre sí, las 14 restantes se consideraron falsos positivos por el método de ELISA. La medida de asociación (T) obtenida fue de 0.65 lo que representa una correlación del 82.5% entre los dos métodos y la correlación a nivel poblacional es mayor o igual al 80% (APENDICE C), el ELISA tuvo sensibilidad del 100%, especificidad de 80.5%, valor predictivo positivo de 36% y valor predictivo negativo de 100%, (APENDICE B).

En la comparación del diagnóstico clínico vs. ELISA se observó que 76 muestras correlacionaron entre sí, de las cuatro restantes, tres se consideraron falsas positivas y una falsa negativa por el método de ELISA. La correlación entre ELISA y el diagnóstico

clínico fué del 94% ($T= 0.9$) con sensibilidad y especificidad del 95% respectivamente, VPP del 86% y VPN del 98%, (APENDICE D), el cultivo frente al diagnóstico clínico tuvo sensibilidad de 40%, especificidad de 100% y valor predictivo negativo de 83.3%.

Se analizaron los resultados de los factores de lectura inter-grupos de pacientes (GRAFICA No 3)(TABLAS 1,2 y 3) observandose que los grupos 1 vs. 2 no son diferentes entre si (T student, $p=0.15$), en contraste, 1 vs. 3 ($p<0.0001$) y 2 vs. 3 ($p<0.0001$) fueron significativamente diferentes (APENDICE A).

En la gráfica 4 donde se expresa el factor de lectura se observa un falso negativo en el grupo 2, y en el grupo 3, se observan 3 falsos positivos que corresponden a tres casos (dos con infección por VIH y uno con edema cerebral de origen no determinado).

5.- Reproducibilidad, Prevalencia y Exactitud

Cincuenta y una de las 80 muestras originales se examinaron por segunda ocasión por ELISA y se observaron lecturas semejantes: grupo 1 primer lectura media de 0.319 ± 0.172 y segunda lectura (siete LCR) de 0.344 ± 0.152 , el factor de lectura fué de 1.42 ± 0.68 y 1.46 ± 0.70 respectivamente; grupo 2 primer lectura media de 0.275 ± 0.06 y segunda lectura (nueve LCR) de 0.299 ± 0.09 , el factor de lectura fué de 1.12 ± 0.18 y 1.28 ± 0.56 respectivamente; grupo 3 primer lectura media de 0.177 ± 0.01 y segunda lectura (35 LCR) de 0.199 ± 0.04 , el factor de lectura fué de 0.72 ± 0.14 y 0.69 ± 0.33 respectivamente, (APENDICE A) (TABLAS 1, 2 y 3). Obteniendose una prevalencia de 10% y una exactitud de 82.5%.

VI.-DISCUSION

Los resultados de este estudio nos indican que el ELISA es un buen método de diagnóstico rápido ya que la mayoría de los resultados obtenidos concordaron con el cultivo y con el diagnóstico clínico.

Estudios anteriores han demostrado que es difícil la estandarización del método de ELISA para la determinación de anticuerpos contra M. tuberculosis, Nassau et al son los pioneros en trabajar la detección de anticuerpos contra M. tuberculosis en casos de tuberculosis pulmonar, obteniendo sensibilidad de 61% y especificidad de 96%.

Nuestros resultados muestran sensibilidad 100%, especificidad 80.5%, valor predictivo positivo 36% y valor predictivo negativo 100%. Esto indica que cuando se lleve a cabo la prueba, un resultado negativo indicaría ausencia de enfermedad y un resultado positivo indicaría presencia de MTB en el 36% de los casos. Comparando los resultados del ELISA con el cultivo encontramos 14 falsos negativos para el cultivo, lo cual sugiere una enorme ventaja del método inmunoenzimático, en función del tiempo necesario y de la sensibilidad para ver un resultado positivo.

Para el cultivo comparado con el diagnóstico clínico se obtuvo una sensibilidad 40%, especificidad 100%, lo que nos indica que este método es muy específico pero muy poco sensible, esto se puede deber a que el aislamiento de M. tuberculosis es difícil sobre todo en muestras de LCR con los medios de cultivo convencionales(21). Se ha reportado mejor aislamiento por métodos de concentración (21,24), sin embargo en nuestro estudio el aislamiento fue pobre con el método de concentración a través de filtro millipore, creemos que pudiera deberse a que el medio de cultivo óptimo sería un caldo

en lugar de un medio de cultivo sólido tipo Lowenstein-Jensen, sin embargo en el futuro se podría hacer un estudio en el cual se utilicen diversos medios de cultivo con el mismo método de concentración para saber cual es el más idóneo para su aislamiento

TABLA 1 GRUPO 1

NUMERO DE MUESTRAS	LECTURAS Y PUNTO DE CORTE				FACTOR DE L.	
	1°LEC.	P.C.	2°LEC.	P.C.	1°FAC.	2°FAC.
LII	0.210	0.183	0.257	0.235	1.15	1.09
LVIII	0.229	0.217	0.334	0.310	1.06	1.08
LXXV	0.269	0.183	-	-	1.47	-
LXXVI	0.728	0.240	0.670	0.225	3.03	2.98
LXXVII	0.253	0.240	0.236	0.225	1.05	1.05
LXXVIII	0.376	0.240	0.356	0.225	1.57	1.58
LXXIX	0.241	0.240	0.225	0.225	1.00	1.00
LXXX	0.246	0.240	0.334	0.225	1.03	1.48
TOTAL (8)	0.319 ± 0.17		0.344 ± 0.15		1.42±0.6	1.46±0.7

T A B L A 2 GRUPO 2

NÚMERO DE MUESTRAS	LECTURAS Y PUNTO DE CORTE				FACTOR DE L.	
	1ºLEC.	P.C.	2ºLEC.	P.C.	1ºFAC.	2ºFAC.
I	0.334	0.307	0.241	0.235	1.09	1.03
IV	0.345	0.307	-	-	1.12	-
XIX	0.334	0.307	0.331	0.235	1.09	1.41
XXIV	0.225	0.217	0.248	0.241	1.04	1.03
XXVIII	0.222	0.217	0.250	0.241	1.02	1.04
XXXIO	0.227	0.217	0.241	0.241	1.05	1.00
XXXVO	0.294	0.183	0.470	0.183	1.61	2.57
XXXIX	0.395	0.307	-	-	1.29	-
XLVII	0.257	0.235	0.462	0.261	1.09	1.77
L	0.263	0.235	0.237	0.235	1.12	1.01
LXXIV	0.207	0.189	-	-	1.10	-
II	0.207	0.241	0.216	0.307	0.82	0.70
TOTAL (12)	0.275 ± 0.06		0.299 ± 0.09		1.12±0.1	1.28±0.5

T A B L A 3 GRUPO 3

NUMERO DE MUESTRAS	LECTURA Y PUNTO DE CORTE				FACTOR DE L	
	1°LEC.	P.C.	2°LEC.	P.C.	1°FAC.	2°FAC.
INFE.(33)	0.187	0.230	0.169	0.230	0.74	0.62
NO INFE.(27)	0.167	0.230	0.230	0.230	0.70	0.65
TOTAL (60)	0.177 ± 0.01		0.199 ± 0.04		0.72±0.1 0.69±0.3	

APENDICE A
PARAMETROS OBTENIDOS POR LA MEDIA (\bar{X}) DE
LOS FACTORES DE CADA GRUPO, ASI COMO, DE
LOS FACTORES 1° Y 2°

a).- $\bar{X}_{\text{grupo 1y2}} \pm 2D$ vs. $\bar{X}_{\text{grupo 3}}$

$$\bar{X}_{\text{grupo 1y2}} = 1.29 \pm 1.05 \text{ vs. } \bar{X}_{\text{grupo 3}} = 0.71 \pm 0.46$$

b).- $\bar{X}_{\text{grupo 1}} \pm 2D$ vs. $\bar{X}_{\text{grupo 2}} \pm 2D$ vs. $\bar{X}_{\text{grupo 3}} \pm 2D$

$$\bar{X}_{\text{grupo 1}} = 1.54 \pm 1.33 \text{ vs. } \bar{X}_{\text{grupo 2}} = 1.19 \pm 0.77$$

$$\bar{X}_{\text{grupo 1}} = 1.54 \pm 1.33 \text{ vs. } \bar{X}_{\text{grupo 3}} = 0.71 \pm 0.46$$

$$\bar{X}_{\text{grupo 2}} = 1.19 \pm 0.77 \text{ vs. } \bar{X}_{\text{grupo 3}} = 0.71 \pm 0.46$$

c).- $\bar{X}^{1^\circ \text{fac.}}$ vs. $\bar{X}^{2^\circ \text{fac.}}$ para cada grupo.

GRUPO 1

$$\bar{X}^{1^\circ \text{fac.}} = 1.42 \pm 1.37 \text{ vs. } \bar{X}^{2^\circ \text{fac.}} = 1.46 \pm 1.40$$

GRUPO 2

$$\bar{X}^{1^\circ \text{fac.}} = 1.12 \pm 0.37 \text{ vs. } \bar{X}^{2^\circ \text{fac.}} = 1.28 \pm 1.13$$

GRUPO 3

$$\bar{X}^{1^\circ \text{fac.}} = 0.72 \pm 0.29 \text{ vs. } \bar{X}^{2^\circ \text{fac.}} = 0.69 \pm 0.66$$

d).- $\bar{X}_{\text{gral. 1}^\circ \text{fac.}} \pm 2D$ vs. $\bar{X}_{\text{gral. 2}^\circ \text{fac.}} \pm 2D$

$$\bar{X}_{\text{gral. 1}^\circ \text{fac.}} = 0.85 \pm 0.68 \text{ vs. } \bar{X}_{\text{gral. 2}^\circ \text{fac.}} = 0.90 \pm 1.06$$

ANALISIS DE VARIANZA

$p < 0.000001$ hay diferencia

T-student para los tres grupos

T-student grupo 1y2 $p = 0.15$ No hay diferencia

T-student grupo 1y3 $p < 0.000001$ Si hay diferencia

T-student grupo 2y3 $p < 0.000001$ Si hay diferencia

APENDICE B

		CULTIVO	
		+	-
ELISA	+	8	14
	-	0	58

PARA ELISA

$$S = \frac{8}{8 + 0} \times 100 = 100\%$$

$$E = \frac{58}{58 + 14} \times 100 = 80.5\%$$

$$VPP = \frac{8}{8 + 14} \times 100 = 36\%$$

$$VPN = \frac{58}{58 + 0} \times 100 = 100\%$$

PARA CULTIVO

$$S = \frac{8}{8 + 14} \times 100 = 36\%$$

$$E = \frac{58}{58 + 0} \times 100 = 100\%$$

$$VPP = \frac{8}{8 + 0} \times 100 = 100\%$$

$$VPN = \frac{58}{58 + 14} \times 100 = 80.5\%$$

APENDICE C
PROPORCION DE ACUERDOS PARA DOS METODOS EN LA POBLACION
(ELISA Y CULTIVO)

Si la proporción de acuerdos entre los dos métodos es de al menos del 80% (0.80).

Se tiene que:

$$H_0: p \geq 0.80 \text{ vs. } H_a: p < 0.80$$

La H_0 se rechazará si $(a + d) < K$

Donde K es una constante que depende de la probabilidad de error tipo I.

$$K = -1.64 \sqrt{I/80} 0.8(1-0.8) + 0.8 = 0.797$$

$(a + d) = 0.825$ que es mayor que 0.797 por lo que no se rechaza la H_0 por lo tanto nos indica que hay evidencia a favor de que $p \geq 0.80$

MEDIDA DE ASOCIACION EN DOS METODO (T)

$$T = 2 (0.1 + 0.725) - 1 = 0.65$$

$$\text{PREVALENCIA} = \frac{8 + 0}{8 + 14 + 0 + 58} \times 100 = 10\%$$

$$\text{EXACTITUD} = \frac{8 + 58}{8 + 14 + 0 + 58} \times 100 = 82.5\%$$

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

APENDICE D
COMPARACION DE ELISA Y CULTIVO CON DIAGNOSTICO CLINICO

		DIAGNOSTICO	
		+	-
ELISA	+	19	3
	-	1	57

		DIAGNOSTICO	
		+	-
CULTIVO	+	8	0
	-	12	60

E L I S A

C U L T I V O

$$T = 2 (0.2375 + 0.7125) - 1 = 0.9$$

$$S = \frac{19}{19 + 1} \times 100 = 95\%$$

$$S = \frac{8}{8 + 12} \times 100 = 40\%$$

$$E = \frac{57}{57 + 3} \times 100 = 95\%$$

$$E = \frac{60}{60 + 0} \times 100 = 100\%$$

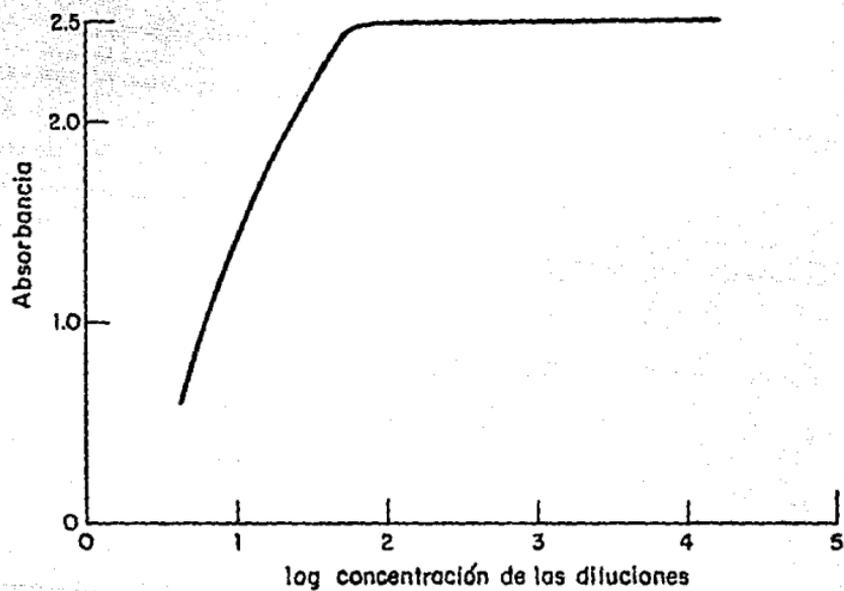
$$VPP = \frac{19}{19 + 3} \times 100 = 86\%$$

$$VPP = \frac{8}{8 + 0} \times 100 = 100\%$$

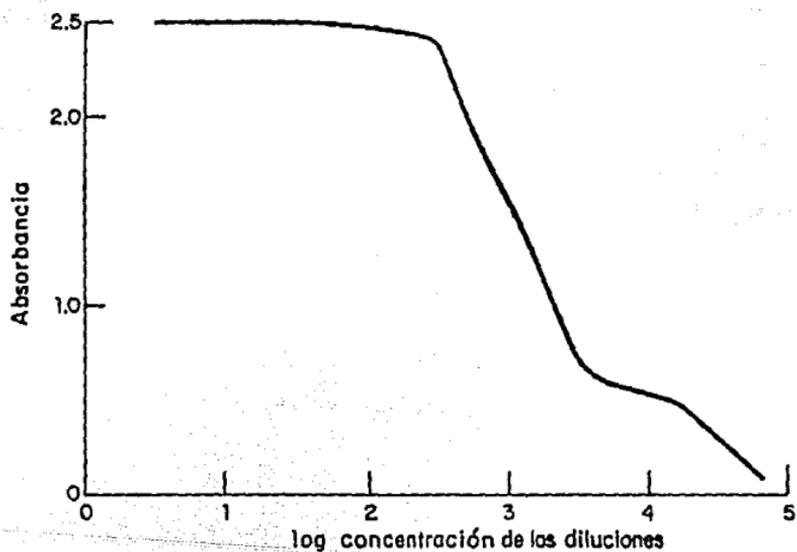
$$VPN = \frac{57}{57 + 1} \times 100 = 98\%$$

$$VPN = \frac{60}{60 + 12} \times 100 = 83.3\%$$

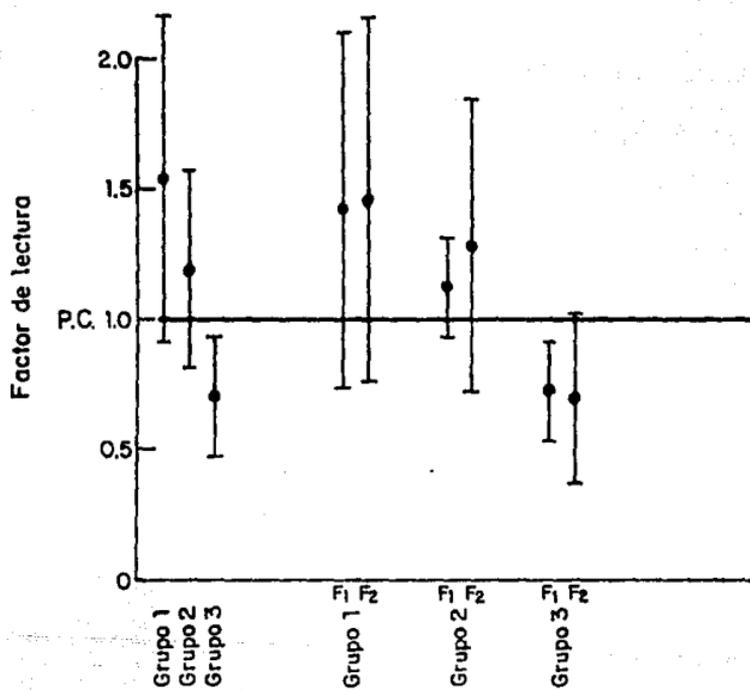
Gráfica 1 Actividad enzimática-peroxidasa



Gráfica 2 Actividad óptima de la peroxidasa en ELISA acoplada con IgG-antiBCG



Gráfica 3 Diferencia entre grupos



PROCEDIMIENTO EN CONDICIONES ESTERILES

El líquido se separó con jeringa.

Se pasa a través del filtro con membrana de 0.45mmc.

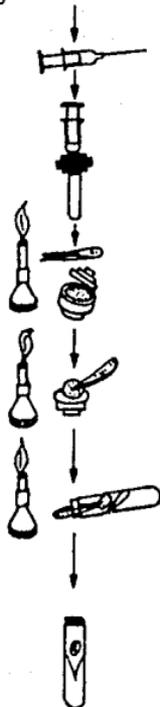
Se flamean las pinzas y se destapa el filtro.

Se toma la membrana con las pinzas.

Se coloca la membrana en el medio de cultivo.

Se incuba a 37°C con flujo de CO₂

CULTIVO



MUESTRA DE LCR

← 500ul

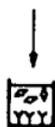


→ restante

ELISA



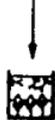
Se agrega IgG anti-BCG para la formación de la fase sólida.



Zona sensibilizada se agrega LCR para formar el complejo inmune.



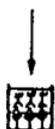
Al complejo inmune formado se - agrega BSA factor V al 1% ----- (bloqueo).



Zona bloqueada se agrega conju- gado.



Formación del doble sandwich, se agrega OPD.



Se agrega H₂SO₄ 1N. Leer a 492 nm.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Subdirección de Información Epidemiológica. Dirección general de epidemiología. MEXICO, 1986.
- 2.- Departamento de bioestadística. Hospital Infantil de México, 1988.
- 3.- Lincon E. Sordillo: Tuberculous meningitis in children. J. Pediatric, 1960; 57: 807-823.
- 4.- Kennedy D.H., Fallon: Tuberculous meningitis. JAMA, 1979; 24: 264-268.
- 5.- Kilpatrick M.E., Girgis N.I., Yassin M.W., Ella A.E.: Tuberculous meningitis clinical and laboratory review of 100 patients. J. Hyg Camb. 1986 ; 96: 231-238.
- 6.- Hernández R., Muñoz O., Guiscafré H.: Sensitive enzyme assay for early diagnosis of tuberculous meningitis. J. Clinical Microbiol. 1984; 20: 533-535.
- 7.- Sada E., Ruiz-Palacios G.M., Lopez Vidal Y., Ponce de León S.: Detection of Mycobacterial antigens in cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis by enzyme-linked immunosorbent assay. Lancet, 1983; sept. 17: 651-652.
- 8.- Chandramuki A., Allen P.R., Keen M., Ivanyi J.: Detection of Mycobacterial antigen and antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis. J. Med. Microbiol, 1985; 20: 239-247.
- 9.- Ruiz-Palacios G.M., Sada E.: Mycobacterium tuberculosis. In: Kohler R.B., Ed. Detection of bacterial Antigen for the Rapid Diagnosis of Infectious Diseases. C.R.C. Press, Inc. 1986. pp 155-164.
- 10.- Nassau E. Parsons E.R., Johnson G.D.: Detection of antibodies to Mycobacterium tuberculosis by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Tubercle, 1976, 57: 67-70.

- 11.- Benjamin R.G., Debanne S.M., Y. Maria and Daniel T.M.: Evaluation of Mycobacterial antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of tuberculosis. *J. Med. Microbiol*, 1984; 18: 309-318.
- 12.- Sullivan J.L., Osborne W.R., Wedgood R.J.: Adenosin deaminase activity in lymphocytes. *Br. J. Haematol*, 1977; 37: 157-158.
- 13.- Varten R., Martinick F., Hirschera R., Goldsheider I.: The distribution of adenosine deaminase among lymphocyte population in the rat. *J. Immunol*, 1979; 122: 216-220.
- 14.- Alister Voller and Dennis Bidwell: ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY In: Manual of clinical laboratory immunology. 3th edition. ASM. Washington, D.C., 1986; 17:99-109.
- 15.- Thomas M. Daniel and Sara M. Debanne: The serodiagnosis of tuberculosis and other Mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *AM. Rev. Respir Dis* 1987; 135: 1137-1151.
- 16.- Kiran U., Shriniwas, Kumar R. and Sharma A.: Efficacy of three mycobacterial antigens in the serodiagnosis of tuberculosis. *Eur J. Respir Dis* 1985; 66: 187-195.
- 17.- Thomas M. Daniel, M.D., F.C.C.P., Sara M. Debanne, Ph. D., and Frits Van Der Kuyp, M.D.: ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY Using 5 and PPD for de serodiagnosis of tuberculosis. *Chest* 1985 Sep.; 88 (3): 388-392.
- 18.- Thomas M. Daniel, Graciela L. de Murillo, John A. Sawyer, Anne McLean Griffin, Enrique Pinto, Sara M. Debanne, Patricia Espinosa and Edmundo Cespedes: Field Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for de serodiagnosis of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*, 1986 Oct.; 134 (4): 662-665.
- 19.- Wiggelinkhuizen J., Mann M.: The radioactive bromide partition test in de diagnosis of tuberculous meningitis in children. *J. Pediatrics*, 1980; 97: 843-847.
- 20.- Nai Shin C.: Tuberculous meningitis. Computerized tomographic manifestations. *Arch Neurol*, 1980; 37: 458-460.

- 21.- Herbert M. Somers and Robert C. Good: MYCOBACTERIUM In: Manual of clinical Microbiology. 4th ed., ASM Washington D.C., 1985; 22: 216-248.
- 22.- Kurstak, Edouid : Enzyme Immunodiagnosis. Academic Press, Inc. Orlando Florida, 1986. pp 23-54.
- 23.- Gornald, Bordonil, and doril: Determination of serum protein by means of the Biuret-reaction. J. Biol Chem, 1949; 177: 751.
- 24.- Wayne, L.G.: The use of millipore filters in clinical laboratories. Am J. Clinical Pathol, 1957; 28: 565-567.
- 25.- Conover W.J.: Practical Nonparametric statistics. John Wiley and Sons. Inc. New York, 1980.
- 26.- Irwin M. Weisbrot, M.D.: Statistics for the clinical laboratory. J.B. Lippin Cott Company. Philadelphia, 1985.
- 27.- Mood, A.M., Graybill, F.A. and Boes, D.C.: Introduction to the theory of statistic. Mc Graw Hill Co., 3th ed., New York 1974.