

28  
2ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**EVALUACION DE 2 TECNICAS INMUNOENZIMATICAS  
PARA EL DIAGNOSTICO TEMPRANO DE LA MENINGITIS  
TUBERCULOSA EN MUESTRAS DE LIQUIDO  
CEFALORRAQUIDEO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :**

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

**PRESENTA :**

**SILVIA GONZALEZ MATEOS**

**ASESOR : M. C. VICTOR ZENDEJAS BUITRON**

**ASESORES EXTERNOS DR. ALEJANDRO ESCOBAR GUTIERREZ**

**DRA. MA. EUGENIA AMEZCUA CH.**

**CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX. NOVIEMBRE**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1997



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FE-CUAUTITLÁN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:  
Evaluación de 2 técnicas inmunoenzimáticas para el diagnóstico temprano de la meningitis tuberculosa en muestras de líquido cefalorraquídeo

que presenta la pasante: Silvia González Marcos  
con número de cuenta: 8333102 para obtener el TÍTULO de:  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautilán Izcalli, Edo. de Méx., a 30 de octubre de 1996

PRESIDENTE M. V. Z. Gerardo Cruz Jiménez  
VOCAL Q. F. I. Andrea Becerril Osava  
SECRETARIO M. en C. Victor M. Zandejas Butrón  
PRIMER SUPLENTE M. V. Z. Angel C. Martínez Sosa  
SEGUNDO SUPLENTE Q. F. B. Marcela Hernández Vargas

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigaciones Inmunológicas, Departamento de Microbiología del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (I.N.D.R.E.) de la Secretaría de Salud, teniendo como asesores al Dr. Alejandro Escobar Gutiérrez y a la Dra. Ma. Eugenia Amezcua de Bernés y como asesor interno (FESC-UNAM) al M. en C. Víctor Zendejas Buitrón.

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres Silvia y Manuel con especial cariño por haberme guiado por el camino de la verdad y el respeto, además por la satisfacción de ver culminada mi formación profesional realizando este trabajo.

Los quiero mucho.  
Chivis

A mis hermanas Patty y Sandu por todo lo que seguimos compartiendo y por tantos momentos agradables que hemos pasado juntas.

A mi esposo Ventura por su apoyo en todo momento y su confianza en mí.

Te amo flaco.

A mi chiquito Andrés Fernando por haberme cedido unos momentos de su atención al terminar este trabajo y porque es el motivo de mi vida.

A todos aquellos que de alguna manera estuvieron pendientes de la culminación de mi trabajo.

Gracias por la espera.

**Al Doctor Alejandro Escobar Gutiérrez, Jefe del Departamento de Microbiología y Subdirector del INDRE por sus enseñanzas y sobre todo por su confianza depositada en mí desde mi llegada al laboratorio.**

**A la Doctora María Eugenia Amezcua por sus consejos y por su preocupación por ver culminado mi trabajo.**

**A mis amigos y compañeros de trabajo en el laboratorio por todo lo compartido durante este tiempo :**

**Víctor Cázares  
Raquel Escobar  
Edith Flores  
Lupita Granados  
Sergio Pastén  
Sigifredo Pedraza**

**A Silvia y Flor por la ayuda en la impresión de este trabajo.**

**A la Maestra Patricia Llaguno Jefe del laboratorio de Helmitos, Departamento de Parasitología de la ENCB-IPN por su cooperación en la recolección de muestras.**

**Al Doctor Miguel Angel Sandoval Jefe de Neurocirugía del Hospital Centro Médico La Raza, IMSS, por la valiosa donación de muestras utilizadas como testigos negativos en el proyecto.**

**A la QBP Lilia Rojas Jefe del laboratorio de Bacteriología en el Hospital de Infectología del Centro Médico La Raza, IMSS, por su amistad y confianza brindada durante la recopilación de muestras testigo positivos.**

## INDICE GENERAL

RESUMEN	I
LISTA DE ABREVIATURAS	II
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	IV
<b>1.- INTRODUCCION</b>	
Etiología de la Tuberculosis meningea	2
Inmunidad y Tuberculosis	3
a) Antígenos micobacterianos	3
b) Respuesta Inmune contra <i>M.tuberculosis</i>	6
c) Hipersensibilidad tipo IV	7
d) Vacunación con BCG	11
e) Importancia de la inmunidad humoral y celular en tuberculosis	13
Patogenia de la enfermedad	14
Anatomía Patológica	14
Epidemiología	16
Cuadro clínico	17
Diagnóstico de la enfermedad	20
a) clínico	20
b) de laboratorio	20
c) detección de secuencias específicas de Dna y PCR	22
d) inmunológico	24
e) diferencial	26
Tratamiento	27
<b>2.- OBJETIVOS</b>	29
a) Plan de trabajo	30
<b>3.- MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
a) Material biológico	31
b) Material químico y equipo	33

<b>4.- MÉTODOS</b>	<b>34</b>
<b>5.- RESULTADOS</b>	<b>37</b>
<b>6.- DISCUSION</b>	<b>60</b>
<b>7.- CONCLUSIONES</b>	<b>65</b>
<b>8.- BIBLIOGRAFIA</b>	<b>67</b>

## RESUMEN

La meningitis tuberculosa es una de las complicaciones más graves de la infección por el bacilo tuberculoso y de no efectuarse un diagnóstico oportuno y un tratamiento adecuado puede llegar a ser mortal o dejar secuelas importantes en el individuo. Esta enfermedad afecta a individuos en todas las etapas de la vida, sin embargo la mayor frecuencia se encuentra en edad pediátrica y viene como consecuencia de una tuberculosis pulmonar o miliar mal tratada. Por la sintomatología que presentan los pacientes se confunde con otro tipo de enfermedad del sistema nervioso y es importante diferenciarla aunque algunas veces solo en casos *post-mortem* se identifica el agente causal de la infección (14).

En el presente trabajo se adaptaron técnicas inmunoenzimáticas para el diagnóstico temprano de la meningitis tuberculosa en muestras de líquido cefalorraquídeo y estas fueron implementadas gracias a los recursos con que se cuentan en el laboratorio:

- a) ELISA indirecto amplificado-ESBCG
- b) ELISA indirecto amplificado-ESMTB
- c) ELISA directo-ESBCG

Se analizaron 5 diferentes grupos de muestras con etiología diferente de enfermedad : 1) un grupo testigo negativo no infeccioso, 2) con meningitis por determinar, 3) con cisticercosis comprobada por Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y hemaglutinación indirecta (HAI), 4) meningitis bacteriana o piógena comprobada por cultivo del microorganismo y 5) un grupo testigo positivo con meningitis tuberculosa, algunos de ellos comprobados por aislamiento e identificación de *Mycobacterium tuberculosis* y otros por sintomatología clínica y estudios de laboratorio que corroboran el padecimiento.

Las 2 técnicas muestran resultados variables, sin embargo el ELISA indirecto amplificado-ESMTB mostró ser la mejor de ellas para ser utilizada de elección en el diagnóstico de la enfermedad, ya que sus valores de sensibilidad (95.83) y especificidad frente a los grupos testigo control negativo, con meningitis desconocida, cisticercosis y meningitis piógena (100, 100, 93.5 y 90% respectivamente) son bien aceptados. Además la técnica es rápida y en un sólo día se pueden ofrecer resultados confiables.

## LISTA DE ABREVIATURAS

LCR	Líquido cefalorraquídeo
PPD	Derivado proteico purificado
SNC	Sistema nervioso central
BCG	Bacilo de Calmette y Guérin
BSA	Albúmina sérica bovina
PBS	Solución salina amortiguadora de fosatos
PBS-BSA	Solución bloqueadora con PBS y albúmina sérica bovina
PBS-BSA-T	Solución de lavado con PBS, albúmina sérica bovina y Tween 20
ESBCG	Extracto soluble de BCG
ESMTB	Extracto soluble de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a una enzima
MG DESC	Grupo de LCR con meningitis por determinar, no cisticercosis
CIST	Grupo de LCR con cisticercosis comprobada por inmunofluorescencia indirecta y hemaglutinación indirecta
MG BACT	Grupo de LCR con meningitis bacteriana comprobada por cultivo y aislamiento del microorganismo.
D.O.	Densidad óptica
IDO	Índice de densidad óptica
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
HAI	Hemaglutinación indirecta
LT	Linfocito T
LT <sub>H</sub>	Linfocito T cooperador
LT <sub>C</sub>	Linfocito T citotóxico
MHC	Complejo principal de Histocompatibilidad
IL	Interleucina
TNF	Factor de necrosis tumoral
IFN	Interferón
CPA	Célula presentadora de antígeno

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### FIGURAS

	Página
Figura 1.- ELISA indirecto amplificado-ESBCG	41
Figura 2.- ELISA indirecto amplificado-ESMTB	43
Figura 3.- Curva estándar para la determinación de antígeno soluble de BCG	50

### TABLAS

Tabla 1.- Signos y síntomas más frecuentes en 500 casos de meningoencefalitis comprobada por cultivo.	19
Tabla 2.- Valores promedio de densidad óptica a 490 nm para cada muestra ensayada por duplicado en los grupos probados para ELISA indirecto amplificado-ESBCG.	40
Tabla 3.- Valores promedio de densidad óptica a 490 nm para cada muestra ensayada por duplicado en los grupos probados para ELISA indirecto amplificado-ESMTB.	42
Tabla 4.- Testigos altos y bajos reactivos con meningitis tuberculosa comprobada por cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> con sus valores de D.O.	44
Tabla 5.- Cálculo del IDO tomando en cuenta los testigos verdaderos bajos y alto reactivos.	45
Tabla 6.- Resultado de cada muestra ensayada con ESBCG y ESMTB para el ELISA indirecto amplificado utilizando como valor de corte el IDO.	47
Tabla 7.- Valores de la curva estándar utilizando extracto soluble de BCG.	49
Tabla 8.- Valores promedio de D.O a 490 nm para cada una de las muestras ensayadas por duplicado en ELISA directo.	51

Tabla 9.- Resultado del número de muestras positivas a antígeno soluble de BCG en cada grupo ensayado por ELISA directo.	52
Tabla 10.- Concentración de antígeno soluble en las muestras de LCR positivos a antígeno calculados por la curva estándar.	52
Tabla 11.- Sensibilidad y especificidad del ELISA directo para detectar antígeno soluble de BCG en muestras de LCR.	54
Tabla 12.- Características del grupo testigo negativo y su resultado en las 3 técnicas de diagnóstico para la meningitis tuberculosa.	55
Tabla 13.- Características del grupo con meningitis de origen desconocido y su resultado en las 3 técnicas de diagnóstico para la meningitis tuberculosa.	56
Tabla 14.- Características del grupo con cisticercosis y su resultado en las 3 técnicas de diagnóstico para la meningitis tuberculosa.	57
Tabla 15.- Características del grupo con meningitis piógena y su resultado en las 3 técnicas de diagnóstico para la meningitis tuberculosa.	58
Tabla 16.- Características del grupo con tuberculosis meníngea y su resultado en las 3 técnicas de diagnóstico para la meningitis tuberculosa.	59

## INTRODUCCIÓN

*Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de la tuberculosis, puede invadir pulmones y otras partes del organismo como riñones, órganos genitales, peritoneo, corazón y sistema nervioso central. La meningoencefalitis tuberculosa es una de las complicaciones más graves de la infección por el bacilo tuberculoso, y de no efectuarse un diagnóstico temprano y un tratamiento adecuado, puede ser mortal o capaz de producir secuelas importantes, generalmente irreversibles (11, 13, 14, 23). En México, se ha reportado que la meningitis tuberculosa es la forma menos común, sólo representa menos del 1% de todas las variantes de la enfermedad y el 25 % del total de los cuadros de meningoencefalitis (12).

La meningoencefalitis se conoce desde los tiempos de Hipócrates y Galeno, quienes la relacionaban con alteraciones de las facultades mentales y el contenido acuoso del cerebro. En el siglo XVI, en la zona norte del Mediterráneo, se le confería un carácter contagioso, pero no fué hasta 1843 cuando Kencke demostró la transmisión experimental en conejos. Sauvages, en 1763, describió esta enfermedad como eclampsia hidrocefálica; en 1768 Whytt, en Edimburgo, describió por primera vez los estadios clínicos que caracterizan a este padecimiento (14).

En 1881 Quinke describe la técnica para la obtención de líquido cefalorraquídeo, pero fué en 1882 que Roberto Koch descubre el agente etiológico conocido como bacilo tuberculoso o bacilo de Koch. La enfermedad ha sido descrita en todo el mundo, aunque en los países con nivel socioeconómico elevado su frecuencia es muy baja; sin embargo, en los países pobres representa un verdadero problema de salud pública (12, 14).

## ETIOLOGÍA

La meningoencefalitis tuberculosa es la inflamación de las leptomeninges y el encéfalo producida por *Mycobacterium tuberculosis*, variedad *hominis*, y rara vez por variedad *bovis* u otras micobacterias atípicas. Estos gérmenes, también denominados bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR), no responden a los métodos habituales de tinción de otras bacterias; sin embargo, absorben el colorante fenol-fucsina y una vez teñidas resisten la decoloración producida por ácidos fuertes y alcohol. Los bacilos ácido-alcohol resistentes crecen mejor en presencia de oxígeno y a temperatura de 37°C. Pueden sobrevivir en estado de desecación por mucho tiempo, la estructura química de la pared celular está integrada por un mucopéptido, gran cantidad de lípidos, polisacáridos y proteínas; el 20 a 40% de su peso son lípidos, esto tiene relación con la reacción de hipersensibilidad que se presenta entre las 2 a 10 semanas después de la infección (3).

Otra característica del bacilo tuberculoso es la lentitud de desarrollo en los medios de cultivo: el más utilizado es el de Lowenstein Jensen que se incuba a 37°C, el desarrollo se inicia a la semana de siembra y se completa aproximadamente a la cuarta semana y no se descarta antes de ocho semanas. Otro medio de cultivo utilizado es el de Middelbrook 7-H-9, que contiene ácido oleico y albúmina en una atmósfera de crecimiento de 5 a 10% de bióxido de carbono. Para fines de investigación cuando se requiere de cosechar masa bacilar, se emplea el medio de propagación Sauton a pH 7.2 (3).

## INMUNIDAD Y TUBERCULOSIS

### a) Antígenos micobacterianos

#### ANTIGENOS PROTEICOS

-Proteína de 65 kDa de choque térmico.

Se le ha encontrado gran homología con proteína de choque térmico constitutiva de *E. coli*, llamada *E. coli* GroEL. Está ampliamente distribuida en la naturaleza y se le llamó de choque térmico porque se produce en grandes cantidades después de un cambio brusco en las condiciones de cultivo, como aumento de la temperatura. El gene para esta proteína ya ha sido clonado y su estructura está bien conocida. La proteína existe en forma polimérica en la micobacteria, contiene estructura en forma de hélice y posee regiones hidrofóbicas, lo que la caracterizan como altamente antigénica.

- Proteína de 38 kDa.

Algunos investigadores también la llaman antígeno 5 y se encuentra exclusivamente en *M. tuberculosis* y *M. bovis*, se ha empleado como antígeno para diagnóstico de la tuberculosis pulmonar y en estudios recientes se ha producido su anticuerpo monoclonal (TB-72). Es altamente antigénica.

#### - Antígenos del complejo 85

Por medio de corrimientos inmunolectroforéticos, Harboe, Wiker y colaboradores designaron por su cercanía inmunológica al antígeno 85 como complejo constituido por las partes A, B y C. Estos antígenos comparten epítopes y propiedades similares y están codificados en genes diferentes. El mejor conocido es en antígeno 85B, que anteriormente se le llamó antígeno alfa antígeno a<sub>2</sub>, antígeno 6 y complejo MPB-59/MPT-59. Es de 30 kDa y es secretada por la micobacteria al medio de cultivo, se une a fibronectina, por lo que la hace importante en la ingestión y reconocimiento por los macrófagos. Su gene se ha clonado de *M. bovis* y *M. kansasii*. Esta molécula se ha estudiado para evaluar la respuesta celular en individuos infectados con *M. tuberculosis*, los cuales la reconocen fuertemente, y en individuos sanos que no lo hacen (46).

#### ANTIGENOS POLISACARIDOS

En algunos estudios realizados recientemente, se ha demostrado que los antígenos inmunodominantes son algunas glicoproteínas con un considerable significado biológico. Se localizan tanto en espacio extracelular como en la superficie de las células, en donde juegan un papel importante como receptores y en el reconocimiento intracelular. Además, los oligosacáridos de algunas glicoproteínas intervienen en la conformación y solubilidad de las mismas y les confieren resistencia a la proteólisis. Recientemente se ha demostrado que estas glicoproteínas son importante en infecciones y procesos parasitarios. Los últimos hallazgos en este campo han revelado que las glicoproteínas Gp50-55 y Gp38 están definidas como moléculas inmunodominantes

e intervienen en diferentes fases de la infección (40). No obstante hay moléculas como la lipoarabinomanana y la proteína de 30 kDa de carácter proteico que se han distinguido como importantes en el diagnóstico de la enfermedad tuberculosa a nivel pulmonar (41).

#### OTROS ANTIGENOS

La pared celular de la micobacteria posee una estructura compleja con muchos elementos de importancia inmunológica. En la parte externa se conforma de lípidos conteniendo ácidos micólicos de cadena larga e interiormente se forma de arabinogalactana unida por enlaces fosfodiéster, también llamado muramil dipéptido. En anteriores estudios se refieren a los lípidos como el factor Cord como la molécula asociada al agrupamiento de las micobacterias para formar colonias creciendo en medio líquido y se atribuyó este fenómeno a la virulencia del bacilo. Las respuestas inmunológicas (celular y humoral) a cualquier proteína antigénica están potencializadas cuando el antígeno se administra en emulsiones conteniendo adyuvantes con micolatos. El glicolípido fenólico expresado en la superficie de *M. leprae* no es antigénico per se, pero actúa como hapteno y además contiene un epítopo que parece ser especie-específico. La lipoarabinomanana fosforilada ha sido estudiada por ser altamente antigénica, estar involucrada en el fenómeno de la patogenesis de la enfermedad y tal vez actúe como factor de virulencia propia del bacilo. Inhibe la producción de interferón y puede ser útil para contrarrestar los efectos de los radicales libres, que son útiles como herramienta en la destrucción del bacilo o de patógenos intracelulares (46).

b) Respuesta inmune contra *Mycobacterium tuberculosis*

El curso de la infección tuberculosa se ha dividido en estadios :

1.- Se inicia por la inhalación de aerosoles infectados con la micobacteria (1 a 3 bacilos) y encontrándose con los macrófagos alveolares. Cuando no existe crecimiento bacilar, generalmente el bacilo es destruido o inhibido por los macrófagos alveolares que lo ingerieron de primera instancia. Si la micobacteria se multiplica destruye al macrófago.

2.- Existe un estado de simbiosis, cuando el bacilo se encuentra en su fase de crecimiento logarítmico dentro de los macrófagos inmaduros pasan a formar parte del torrente sanguíneo.

3.- El número de bacilos llega a ser limitado porque su crecimiento es inhibido por la respuesta inmune mediada por células y por la hipersensibilidad tipo IV. Se forma un foco tuberculoso con un centro caseoso dentro del cual el ahora bacilo extracelular no puede multiplicarse. Alrededor de este centro, los macrófagos inmaduros permiten la multiplicación bacilar intracelular, pero los macrófagos maduros inhiben tal multiplicación y destruyen al bacilo. El bacilo tuberculoso puede sobrevivir por años en el material caseoso, pero aparentemente no puede multiplicarse por las condiciones de anoxia, presencia de ácidos grasos y pH ácido.

4.- Estado de licuefacción, el bacilo evade la respuesta de defensa del huésped. Después de la licuefacción del centro caseoso se forman las cavernas. En el caseum, el bacilo se multiplica extracelularmente de primera instancia. Aún cuando la inmunidad mediada por células se ha desarrollado, parece ser ineficiente para controlar el gran número de bacilos multiplicados. Entran a las ramas bronquiales y se expanden a otras partes del pulmón y si es posible a otras partes del organismo. El control de este estado depende de que el huésped puedan combatir al tamaño de la población (46).

#### c) Hipersensibilidad tipo IV

Las reacciones de hipersensibilidad dependientes de linfocitos T son causadas por la actividad de linfocinas o por células citotóxicas. La hipersensibilidad celular en la piel fue observada originalmente por Jenner al revacunar sujetos y la describió como una inflamación localizada que aparecía al día siguiente (reacción tardía) en el sitio de la vacunación. Un siglo después, el estudio detallado de estas reacciones fue realizado por Koch para el caso de la tuberculosis. La demostración de que son debidas a un fenómeno celular, independiente de los anticuerpos, fue hecha por Chase en 1942 cuando en un modelo de cobayo encontró que la capacidad para reaccionar positivamente sólo podía transferirse con células y no con suero. Estos estudios sentaron las bases que culminaron en la identificación de las dos ramas efectoras de la respuesta inmunológica, la humoral (mediada por anticuerpos) y la celular (dependiente del timo). Como pasa con los anticuerpos, los linfocitos T participan en fenómenos que se manifiestan como de protección o de hipersensibilidad, según su dirección o magnitud. Los antígenos

inductores de reacciones tipo IV son generalmente de naturaleza proteica y principalmente se trata de componentes de agentes infecciosos o moléculas propias intactas (autoantígenos) o modificadas por metales pesados y haptenos. Existen varias moléculas, sobre todo de origen microbiano, que causan reacciones tipo IV a través de respuestas inespecíficas. Entre ellas destacan las proteínas de choque térmico que por estar presentes en casi todos los seres vivos y mostrar una similitud estructural, generan respuestas que cruzan con moléculas similares en agentes diferentes al inductor aún en células del propio sujeto. También, este tipo IV está asociado a la patología relacionada con ciertas exotoxinas bacterianas (superantígenos) que activan policlonalmente a un gran número de linfocitos. Todos los linfocitos T tienen en su membrana receptores específicos para antígeno (TCR) que están acompañados por el complejo CD3 y un par de moléculas específicas. Según la estructura de las cadenas que forman al receptor hay dos grupos de células, las  $\alpha$ - $\beta$  y las  $\gamma$ - $\delta$ . Los linfocitos  $\alpha$ - $\beta$  son los más abundantes, se encuentran en todos los compartimientos inmunológicos del individuo y reconocen antígenos presentados en productos clase I o clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). A su vez, estas células constan de dos subpoblaciones que se distinguen por las moléculas de superficie CD4 y CD8, las CD4+ producen citocinas (linfocinas) y sus funciones fundamentalmente cooperar con otras células (linfocitos T<sub>H</sub>) y las CD8+ principalmente son citotóxicas (linfocitos T<sub>C</sub>). Los linfocitos T  $\gamma$ - $\delta$  son relativamente escasos, se distribuyen fundamentalmente en tejidos epiteliales y su reconocimiento antigénico parece que no requiere de la intervención de moléculas MHC. Entre estos también hay dos subpoblaciones, una es CD4-, CD8+ y

predomina en órganos linfoides y la otra es CD4-, CD8- y se localiza en los epitelios. La inducción de una reacción de hipersensibilidad tardía requiere que el antígeno responsable sea primero capturado y procesado por una célula especializada, llamada célula presentadora de antígeno (CPA), como son los monocitos, macrófagos, células dendríticas, de Langerhans y otras. Las CPA presentan los epítomos del antígeno en una estructura a modo de surco, ubicado en el área más externa de moléculas clase II del MHC y solo en esta forma son reconocidos por el TCR de Linfocitos  $T_H$  CD4+. La función de esta última molécula es asociarse a la de clase II y actuar como correceptor en la generación de señales de activación celular. Si después se establecen asociaciones entre las moléculas de adhesión de ambas células, el linfocito se activa, inicia la secreción de interleucina-2 (IL-2) e incrementa la expresión de receptores para ella misma. El proceso continúa con el cambio del linfocito  $T_H$  activado hacia uno de dos tipos celulares  $T_H$  1 o  $T_H$  2, que se distinguen por el patrón de linfocinas que secretan. Si está presente la IL-12, producida por la CPA, se forman linfocitos  $T_H$  1 que sintetizan IFN- $\gamma$  (interferón gamma), TNF- $\beta$  (factor de necrosis tumoral beta) y GM-CSF (factor estimulador de las colonias de granulocitos y macrófagos), todas con un importante papel inflamatorio (provocando fibrosis) y activante de macrófagos (44). Por lo contrario, si hay IL-4, producida tal vez por una célula cebada a alguna subpoblación de linfocitos T, se da lugar a células  $T_H$  2, formadoras de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, promotoras de la activación y diferenciación de linfocitos B. El equilibrio entre las poblaciones  $T_H$  1 y  $T_H$  2 conduce a fenómenos protectores o patológicos, según las condiciones particulares de cada caso. Las  $T_H$  1 intervienen en la protección contra

agentes infecciosos intracelulares como el virus sincicial respiratorio, *M. leprae* o *M. tuberculosis*, en tanto que los cuadros clínicos que éstos llegan a cursar están asociados con el equilibrio hacia la producción de células  $T_H2$ . Las células T c eliminan células neoplásicas o que están infectadas con virus. En caso de los linfocitos  $\alpha\text{-}\beta$   $T_c$ , su inducción tiene similitudes con la generación de la hipersensibilidad tardía. Los antígenos virales o propios son sintetizados en la misma CPA, en cuyo citoplasma son procesadas y sus epítomos son presentados en el surco de moléculas clase I del MHC. Así ocurre el reconocimiento restringido a linfocitos T  $CD8+$ , debido a que la molécula  $CD8$  se asocia al producto clase I y actúa como receptor (43).

Hipersensibilidad Tardía. La reacción cutánea a la tuberculina (o al derivado proteico purificado, PPD) es el modelo clásico de la hipersensibilidad mediada por células T. El término tardía se refiere a que la lesión alcanza su máximo entre 24 y 48 horas después de inyectar la preparación, a diferencia de otras pruebas cutáneas cuya positividad es inmediata (tipo I) o mediata (tipo III). Las linfocinas secretadas por los linfocitos  $T_H1$  son las responsables de la reacción de hipersensibilidad tardía por su actividad directa y por la de los macrófagos reclutados que aportan otras citocinas que promueven alteraciones sistémicas (fiebre, caquexia, etc.) y de los tejidos circundantes. El origen de los macrófagos que infiltran a estas lesiones son los monocitos circulantes que son atraídos por  $IFN\text{-}\gamma$  y  $TNF\text{-}\beta$ . Aunque los macrófagos son una población heterogénea de células con diversas moléculas de superficie y capacidades biosintéticas, su activación provoca un mayor consumo de glucosa, movilización del citoesqueleto, el

estallido respiratorio, síntesis de óxido nítrico, producción de prostaglandina E 2, leucotrienos, proteínas lisosomales (elastasas), de membrana (moléculas clase II, FcR, etc.) y de factores de complemento, citocinas, quimiocinas (IL-8) y factores de crecimiento (GM-CSF). No cabe duda del papel central de las reacciones de hipersensibilidad tardía en la patogenia de varias enfermedades infecciosas y autoinmunes, siempre en conjunción con el terreno genético del sujeto afectado particularmente con genes de clase II del MHC. La trascendencia de la interacción de estos factores se manifiesta en que hay enfermedades infecciosas como la tuberculosis donde ha sido muy difícil separar la patología provocada por el agente etiológico de la ocasionada por la reacción inmunológica (43).

#### d) Vacunación con BCG

La vacuna BCG fue desarrollada por Calmette y Guérin a partir de una cepa de *Mycobacterium bovis* que fue subcultivada 231 veces, hasta que perdió su patogenicidad para el hombre y fue utilizada por primera vez en 1922. La eficacia de la vacunación ha sido estudiada mediante diferentes ensayos controlados y los resultados muestran grandes variaciones, que oscilan entre 0 y 80%, por lo que existe controversia en cuanto a su utilidad para el control de la tuberculosis en el mundo. En la actualidad se acepta que esta vacuna puede prevenir la reinfección endógena, pero no la reinfección exógena, por lo que no es útil para romper la cadena de transmisión de la infección, sin embargo, la vacunación con BCG puede evitar la diseminación de la infección tuberculosa, por lo

que su aplicación en los lactantes disminuye la frecuencia de las formas graves como la miliar y la meningoencefalitis. Es preferible utilizar la vacuna d BCG liofilizada, ya que se puede mantener a 30°C durante casi un mes y en refrigeración (4 a 5°C) durante un año. Se recomienda su aplicación intradérmica, en la región deltoidea, en todo niño de las áreas endémicas, desde el nacimiento hasta los 14 años, sin prueba tuberculínica previa. La protección que confiere decrece paulatinamente al cabo de 10 años. Es una vacuna con pocos efectos secundarios y complicaciones ocasionales que incluyen : úlceras en el sitio de la inyección, abscesos subcutáneos, cicatrices queloides, *Lupus vulgaris*, linfadenitis abiertas o no al exterior y enfermedad diseminada. Está contraindicada en enfermos positivos al virus HIV o en enfermos con SIDA (42).

Recientes avances en tecnología de DNA recombinante ha hecho posible la clonación de genes de *M. tuberculosis* responsables de la producción de antígenos protectores. Estos genes pueden ser transferidos a vectores (plásmidos) que pueden introducirse en bacterias como *E.coli* o *Salmonella* atenuadas también por ingeniería genética y de esta manera estos plásmidos pueden ser reproducidos dentro de las bacterias y los genes que contienen pueden ser expresados en mayor cantidad y más aún acarreados dentro de las células como macrófagos para que estos antígenos sean presentados de una manera más apropiada y específica para el desarrollo de una inmunidad celular. Esta tecnología permite utilizar antígenos específicos en ausencia total del bacilo tuberculoso. Aun cuando existe una gran cantidad de evidencia experimental en favor de estas bases moleculares para el desarrollo de nuevas vacunas, estas todavía no se encuentran al alcance (22).

**e) Importancia de la inmunidad humoral y celular en tuberculosis**

La evolución de la tuberculosis es particularmente desfavorable en dos situaciones aparentemente opuestas :

- 1.- Cuando la respuesta inmune humoral y/o celular que se monta no es suficiente ni siquiera para expresar algún grado de reactividad a la tuberculina, como ocurre en las formas más graves de la enfermedad.
- 2.- A la inversa, cuando predominan las manifestaciones de hipersensibilidad retardada, con su tendencia a desencadenar extensas destrucciones tisulares.

De este modo, la resistencia frente a la enfermedad podría representar una respuesta inmunitaria cuantitativa o cualitativa más moderada. Pero, se sabe si esto depende exclusivamente del momento inmunitario que vive el individuo, de la mayor carga antigénica propia del los contagios masivos, o de otros factores. En la clínica no se puede distinguir de respuestas favorables o desfavorables. Solo se sabe que después de 2 a 10 semanas de ocurrida la infección con el bacilo tuberculoso la reacción de tuberculina se hace positiva, lo que indica que se ha puesto en marcha mecanismos inmunológicos especiales : por una parte manifestaciones de una hipersensibilidad de tipo retardada (que involucra la presencia de células y mediadores biológicos como citocinas), y además, algún grado de inmunidad protectora. De todas estas consideraciones teóricas tienen importantes implicaciones clínicas cuando se comprende mejor los factores que intervienen en la respuesta inmune frente a la tuberculosis.

## PATOGENIA

La meningoencefalitis tuberculosa se considera como una forma secundaria de la tuberculosis primaria, la más frecuente a nivel pulmonar, pero también puede partir de otros sitios del organismo. Para explicar la patogenia se han postulado las teorías siguientes:

- 1) Rich y McCodock demostraron que la enfermedad se origina al romperse pequeños tubérculos caseosos en el espacio subaracnoideo, los cuales se implantan en el encéfalo y meninges durante la bacilemia precoz que acompaña a la infección primaria.
- 2) Ektoon incluye que la infección ha alcanzado las meninges, se lleva a efecto a través de la pared de las pequeñas arterias, que puede estar reemplazada por tejido de granulación.
- 3) Kmet anota que el foco primario está localizado en los plexos coroideos con diseminación ulterior a la pared de los ventrículos y el espacio subaracnoideo (12, 13).

## ANATOMÍA PATOLÓGICA

Las alteraciones histopatológicas están constituidas predominantemente por la lesión inflamatoria crónica granulomatosa, formada por abundantes histiocitos, células plasmáticas, linfocitos y fibroblastos. En los vasos sanguíneos encontramos alteraciones de la pared a expensas de infiltración del proceso inflamatorio y cambios degenerativos de la capa media, engrosamiento de la íntima con proliferación del endotelio y el tejido

conectivo y más característicamente duplicación, fragmentación, hialinización y calcificación de la capa elástica interna. Hay además un proceso de aracnoiditis o leptomeningitis en el que participan la piamadre y la aracnoides en el cual se ha establecido un factor alérgico y/o infeccioso (17).

Las adherencias entre la aracnoides y la piamadre pueden bloquear localmente el flujo de líquido cefalorraquídeo y producir quistes aracnoideos, observados como un exudado gelatinoso y espeso; este proceso leptomeningítico, cuando se produce en las cisternas de la base, puede bloquear los agujeros de Luschka y Magendie y producir hidrocefalia (3, 12, 14).

La reacción inflamatoria de la cisterna magna ha sido descrita por Foltz y Shurtleff como la causa principal de hidrocefalia, aunque también se ha mencionado a la ependimitis y a la ventriculitis como causales de la misma, que de no ser tratada quirúrgicamente en forma oportuna origina lesiones cerebrales graves o la muerte del paciente. Además se produce un atrapamiento de los vasos sanguíneos, principalmente arteriales, lo que, agregado a las lesiones vasculares inflamatorias ya mencionadas, son responsables de las lesiones isquémicas en el cerebro, de gravedad variable y que clínicamente se traducen en manifestaciones encefálicas. Este proceso inflamatorio meníngeo a nivel basal puede afectar los nervios craneales y produce parálisis de los mismos, a nivel de la cisterna quiasmática, ocasionalmente, pueden estar afectados el quiasma y los nervios ópticos, dando origen a la aracnoiditis optoquiasmática que se manifiesta por defectos campimétricos, que pueden ser escotoma central, defectos hemianópticos y reducción concéntrica de los campos visuales; también produce

disminución progresiva de la agudeza visual, que rápidamente puede llegar a la ceguera con atrofia del nervio óptico (3, 12, 14, 23).

## EPIDEMIOLOGÍA

La meningitis tuberculosa afecta a individuos en todas las etapas de la vida, sin embargo la mayor frecuencia la encontramos en la edad pediátrica, con picos máximos entre los 12 meses y los 4 años de edad, con índice de letalidad entre el 20 y 30% de los casos. La tuberculosis meníngea, al igual que los otros tipos de tuberculosis, podemos englobarlos dentro de la patología de la pobreza, ya que predominan en los estratos socioeconómicamente bajos. La desnutrición y las enfermedades anergizantes, como el sarampión, rubéola, tosferina, entre otros, y los padecimientos linfomieloproliferativos, son factores predisponentes que hacen al huésped más susceptible para adquirir la infección. En México no se cuenta aún con el control adecuado de estos enfermos, ya que posiblemente solo se registran aquellos pacientes que asisten a las grandes instituciones de salud en el país; en 1922 la mortalidad por tuberculosis se estimó en  $80 \times 100\,000$  habitantes, observándose un descenso de  $4.8 \times 100\,000$  habitantes en 1974, situación directamente relacionada con la llegada de los tuberculostáticos y mejoría de las condiciones de vida de los grandes grupos de población; sin embargo, las cifras continúan siendo elevadas al compararse con las de países desarrollados como Estados Unidos, donde en 1977 se reportó una tasa de  $1.4 \times 100\,000$  habitantes (13).

El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Dirección General de Epidemiología (Secretaría de Salud) reporta 113 casos de meningitis tuberculosa en el año de 1994 y 218 hasta la semana número 45 (5 al 11 de noviembre) de 1995, siendo estos casos los que llegan a ser recluidos en centros hospitalarios de gran asistencia (34).

La fuente principal de infección es el adulto con tuberculosis pulmonar; de ahí la importancia de llevar a efecto una investigación epidemiológica adecuada, con el fin de establecer un tratamiento integral que incluye al grupo familiar y a la comunidad en general (34).

### CUADRO CLÍNICO

La meningitis tuberculosa en la edad pediátrica tiene mayor incidencia en niños cuyas edades fluctúan entre uno y cuatro años de edad. En los adultos entre la segunda y cuarta década de la vida, generalmente está asociada con infección pulmonar primaria. Existen factores predisponentes que favorecen el desarrollo de la enfermedad, como desnutrición e infecciones agregadas (SIDA) (3, 12, 15, 16, 23, 27).

La instalación de las manifestaciones clínicas suele ser lenta y progresiva en comparación con las meningoencefalitis de etiología bacteriana, las cuales tienen un carácter agudo. Los síntomas iniciales suelen ser confusos e inespecíficos, la fiebre es el síntoma inicial y más frecuente, aunque al principio suele no ser elevada, acompañándose de irritabilidad, hiporexia, ataque al estado general, vómitos y apatía, que es un síntoma mencionado por diversos autores en más del 60% de los pacientes;

frecuentemente los pacientes alternan los periodos de irritabilidad con periodos de apatía, o bien, manifestaciones generales de un proceso infeccioso a nivel de vías respiratorias superiores, pueden ser las manifestaciones iniciales de la enfermedad en los primeros días de evolución (13, 28).

Generalmente a fines de la segunda semana se acentúa la sintomatología, aparece cefalea y hay acentuación de los vómitos y de las manifestaciones neurológicas y se presentan convulsiones. La evolución natural del padecimiento, referida de tres a cinco semanas, tiene un desenlace letal en la mayoría de los casos si no se trata. El promedio de duración entre el inicio de la enfermedad y el fallecimiento del paciente es variable, desde unas pocas semanas hasta 2 ó 3 meses, aproximadamente. La enfermedad es tan grave que muchas veces su identificación es tardía y se confirma *post-mortem* analizando las lesiones a nivel de sistema nervioso central (11, 12, 14).

Desde el punto de vista clínico práctico la meningitis tuberculosa se puede dividir en tres grandes síndromes:

1.- Inicial o síndrome infeccioso, donde como se ha mencionado se encuentran manifestaciones generales como fiebre y suelen encontrarse problemas a nivel de vías respiratorias; esta etapa dura de una a dos semanas.

2.- Síndrome meníngeo, donde existe un compromiso neurológico, que puede iniciarse bruscamente con irritabilidad, vómitos, tendencia a la midriasis, presencia de signos meníngeos e hiperreflexia osteotendinosa generalizada; en ocasiones las manifestaciones neurológicas pueden presentarse tan súbitamente que se observan ataques a pares craneales, sobre todo en aquellos que tienen carácter de tipo motor (II,

III, IV, VI, VII); las primeras manifestaciones suelen ser estrabismo y ptosis palpebral.

3.- Síndrome encefálico que se manifiesta por tendencia a la somnolencia y al sopor, cefalea intensa, midriasis, respuesta pupilar lenta; en esta etapa se hacen más evidentes los datos de hipertensión craneana (edema papilar, vómito en proyectil, coma).

Las manifestaciones neurológicas se incrementan con afectación franca sobre todas las áreas motoras quedando en total hipertonía muscular generalizada y con tendencia al opistótonos, o bien, rigidez de descerebración, alteraciones del ritmo respiratorio y prácticamente nula la respuesta a estímulos externos, datos que van de la mano con la obstrucción de la circulación del líquido cefalorraquídeo por aracnoiditis basal (13).

En un estudio realizado en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (32) se encontraron los siguientes datos clínicos en 500 casos de meningoencefalitis comprobada bacteriológicamente por la presencia de *H. influenza tipo B*, *S. marcescens*, *S. aureus* y *C. neoformans* entre otros y de los cuales solo 26 fueron tuberculosis meningea. Ver tabla No. 1.

Tabla 1.- Signos y síntomas más frecuentes en 500 casos de meningoencefalitis.

Signos	Porcentaje
Signos meníngicos	89.7%
Afectación de pares craneales	57.4%
Epasticidad	29.4%
Ataxia	20%
<b>Síntomas</b>	
Fiebre	87.8%
Vómito	69.1%
Crisis convulsivas	50.9%
Tos	12.6%

## DIAGNÓSTICO

Por la gravedad del padecimiento es importante un diagnóstico temprano, para lo cual se pueden tomar en cuenta los siguientes criterios:

### CLÍNICO

Esto se realiza analizando la evolución del padecimiento, efectuando una exploración física completa del paciente y correlacionando con la evolución natural de la meningitis tuberculosa aunado de pruebas de laboratorio (12, 23).

### DE LABORATORIO

#### Líquido cefalorraquídeo

El estudio de laboratorio más sencillo y de gran utilidad en el diagnóstico es la punción lumbar; en primer lugar se puede encontrar la presión de LCR elevada (más de 200 mm de H<sub>2</sub>O); el aspecto del mismo dependerá de la cantidad de proteínas y células y varía desde agua de roca a xantocrómico. Generalmente cuando el líquido se deja en reposo se forma un sobrenadante, del cual, si se toma una muestra, y se elabora un frotis teñido con Ziehl-Neelsen; se puede observar el bacilo tuberculoso, esto sucede en un 5 a 10 % de las muestras, ya que la población bacilar no es muy numerosa. El número de células es variable, con una media de 107 células por mm<sup>3</sup> en los primeros estadios, a expensas de polimorfonucleares y posteriormente viraje con predominio a

mononucleares. La celularidad en etapas iniciales, puede estar alterada muy discretamente, y se eleva posteriormente a medida que progresa el padecimiento. Las proteínas se encuentran en cifras de 90 a 300 mg % con una media de 252 mg %. la glucosa en el LCR se encuentra baja generalmente a 1/4 ó 1/5 de la cifra de glucosa en sangre periférica (15 a 20 mg%), por lo que se recomienda conjuntamente a la toma de muestra de LCR la práctica de una glicemia para valoración integral; sin embargo, puede estar normal al inicio del cuadro clínico. La determinación de cloruros suele encontrarse en valores menores de 700 mg %; la cifra media es de 670 mg; no obstante, se considera que éste dato carece de utilidad ya que la fiebre y los vómitos modifican su concentración en los distintos compartimientos del organismo (6, 11, 12, 13).

#### Cultivo

El cultivo del LCR en medio Lowenstein ayuda a llegar a un diagnóstico definitivo al aislar el bacilo tuberculoso; sin embargo, el porcentaje de cultivos positivos es variable. Weiss y Flippin reportan 55%, Lincoln, 60%, Todd y Neville, 67.5%; en nuestro medio oscila entre 5 y 18% (6, 20).

#### PPD (Derivado proteico purificado)

La aplicación de PPD, como intradermoreacción, es útil para apoyar el diagnóstico de la infección tuberculosa del sistema nervioso central; sin embargo, su valor se modifica en aquellos pacientes que previamente han recibido la vacuna

BCG. Por otro lado, la respuesta negativa no invalida la infección debido a estados de desnutrición y/o infecciones agregadas. El apoyo de esta prueba generalmente es adecuado y satisfactorio únicamente en el 30 a 50% de casos (16, 21, 22).

### Baciloscopias

Las baciloscopias y cultivo de esputo y material de lavado gástrico frecuentemente son negativos pero siempre deben de realizarse para mayor seguridad, en series repetitivas de 3 muestras (11, 12, 15).

### Rayos X

El estudio radiológico del tórax es también de apoyo para el diagnóstico de la enfermedad, demuestra alguna lesión sospechosa pulmonar en un 50 a 85% de los casos, dato que aunado al cuadro clínico y al reporte citoquímico del LCR ayudan a tomar la decisión de iniciar de inmediato el tratamiento específico (23, 28).

## **DETECCIÓN DE SECUENCIAS ESPECÍFICAS DE DNA**

Gracias a las técnicas de biología molecular ha sido posible preparar "sondas de DNA" para detectar secuencias especie-específicas de DNA en genomas bacterianos presentes en especímenes clínicos. Estas sondas tienen la capacidad de producir dos

cadenas sencillas de DNA en una sola doble cadena siempre y cuando la secuencia de sus bases (púricas y pirimídicas) se complementen estrechamente una con otra. Así las sondas de DNA marcadas con isótopos radioactivos o enzimas pueden ser usadas para detectar cualquier DNA complementario en una muestra clínica (37).

Las sondas de DNA específicas para *M.tuberculosis* han sido desarrolladas por diversos investigadores, pero desafortunadamente carecen de sensibilidad y por lo tanto la existencia de estas sondas a nivel comercial desaparecieron como herramienta útil en el diagnóstico (16, 37). Recientemente, el problema de la sensibilidad se ha superado por una ingeniosa técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En esta reacción, el DNA de doble cadena es separado en cadenas sencillas por calentamiento a 94°C. La temperatura después es reducida a 55°C y los "iniciadores" se agregan, estos son oligonucleótidos pequeños que pueden alinearse con segmentos de cada una de las cadenas separadas de DNA. Finalmente la temperatura es elevada a 72°C y las cadenas de DNA complementarias, extendiéndose desde los iniciadores son sintetizadas por la adición de la enzima DNA-polimerasa y algunos precursores de DNA como deoxinucleótidos. Por el uso de una enzima termoestable y un sistema de temperaturas variables durante ciclos de aproximadamente 6 minutos, se pueden detectar más de un millón de copias de una cadena de DNA en horas y esto lo hace más relevante que el emplear sondas de DNA. Algunas desventajas del método son, el hecho de utilizar material y equipo costosos así como mostrar algunas veces reacciones falsas positivas, por lo que tampoco puede desarrollarse en pruebas de campo (16, 28, 35). Hasta ahora el

iniciador que ha dado mejores resultados de especificidad para esta prueba es el denominado IS6110 con la secuencia 5'TGAACCGCCCCGGCATGTCCGGAGACT 3' (36, 37), pero en uso comercial se encuentran además el Pt8 (5'GTGCGGATGGTCGCAGAGAT3') y el Pt9 (5'CTCGATGCCCTCACGGTTCA3') (38).

### DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO

Los métodos de diagnóstico inmunológico rápidos son de utilidad por su bajo costo y accesibilidad a cualquier laboratorio para iniciar el tratamiento específico al enfermo y limitar la evolución del padecimiento y el daño consecuente. La detección de antígenos o anticuerpos en el líquido cefalorraquídeo (LCR) significa una solución que ya ha sido explorada por diversos investigadores, algunos métodos descritos no están al alcance de los laboratorios de diagnóstico y tal como están especificados, carecen de la sensibilidad deseada como lo anteriormente descrito en otros estudios (19, 24, 30).

En 1983, algunos trabajos han reportado que mediante la técnica de ELISA (ensayo inmunoenzimático) se puede detectar hasta 7 ng/ml de antígenos solubles de *Mycobacterium tuberculosis* en el LCR (7). Por otro lado, otros investigadores demuestran, que el método de ELISA sandwich de doble anticuerpo es capaz de detectar cantidades tan bajas de antígeno soluble como 4 ng/ml (10).

Se ha evaluado simultáneamente la presencia del antígeno y/o anticuerpos en muestras de líquido cefalorraquídeo. En un estudio se analizan tanto sangre como LCR

para el diagnóstico de la meningitis tuberculosa por medio de la técnica de RIA (radioinmunoensayo), en fase soluble para los líquidos y como complejos inmunes circulantes en la sangre periférica. Los resultados son eficientes y muestran un 95% de positividad en las muestras de enfermos sospechosos del padecimiento pero, la técnica muestra la desventaja del costo que representa un estudio de radioinmunoensayo (1).

En otro estudio realizado en 1988 usando la técnica de ELISA ya descrita (7) detectan anticuerpos por el método directo empleando también muestras de LCR, sus resultados reportan un 96% de especificidad y 52% de sensibilidad (9).

Un grupo de investigadores utilizando las técnicas de hemaglutinación pasiva en fase reversa (RPHA) para detectar antígenos y radioinmunoensayo en fase sólida para detectar anticuerpos en LCR inician también la investigación sobre el diagnóstico temprano de la meningitis tuberculosa. La ventaja de emplear RPHA en el diagnóstico de la enfermedad es su rapidez de realización, su aceptable sensibilidad (88%) y la lectura rápida de los resultados; características importantes que hacen del método una buena elección para emplearse en campo (2).

En un estudio se inició la búsqueda de anticuerpos con diferente especificidad hacia varias preparaciones antigénicas de *Mycobacterium tuberculosis* presentes en LCR y suero, y se determinaron anticuerpos IgG anti-PPD por medio de la técnica de ELISA. Los resultados reportan buenas lecturas de densidad óptica (0.027-0.63) a diluciones muy altas de las muestras (1:256), esto en aquellas en donde se comprobó la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* por cultivo (5).

Al analizar el cruce antigénico de diferentes especies de micobacterias por medio de técnicas como ELISA y aglutinación, se ha demostrado que en el LCR existen anticuerpos específicos contra *Mycobacterium tuberculosis* y que no existe cruce antigénico con otras micobacterias. Los anticuerpos existentes en el LCR poseen mayor reconocimiento al microorganismo causante de la primoinfección tuberculosa (4, 8).

### DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Durante los primeros días de evolución de la enfermedad, ésta puede confundirse con infecciones virales diversas, posteriormente y ante la instalación de las manifestaciones neurológicas, debe pensarse en infecciones del sistema nervioso central o bien en otro tipo de enfermedades a este nivel (28, 31), entre ellas se pueden mencionar:

- Meningoencefalitis viral
- Meningoencefalitis bacteriana
- Criptococosis
- Cisticercosis
- Intoxicación por metales pesados
- Tumores del SNC
- Enfermedades degenerativas del SNC

El pronóstico del padecimiento es variable y difícil de establecer dentro de los primeros tres a seis meses de la enfermedad; en primera instancia cuanto más rápido se llegue al diagnóstico y se instituya el tratamiento, éste será mejor; por otro lado, dependerá de la extensión y gravedad de las secuelas, ya que habrá casos que requerirán de manejo médico quirúrgico que eleva el riesgo del paciente, así como de la premura e interés con que se instituya un tratamiento de medicina física y rehabilitación. El índice de letalidad en niños es de aproximadamente 30% y en adultos 20%. Existe un grupo de pacientes (20 a 25%) que llegan a presentar una recuperación física completa, sin deterioro del desarrollo intelectual; otro porcentaje (35%) queda con un daño cerebral mínimo; un 10 a 15% con secuelas severas, y en el resto de los pacientes las secuelas son de grados diversos (33).

## **TRATAMIENTO**

El tratamiento debe ser integral y estar basado en los parámetros siguientes:

- a) Tratamiento antifímico específico.
- b) Tratamiento de la hipertensión endocraneana.
- c) Tratamiento de las secuelas específicas (cirugía, medicina física y rehabilitación).
- d) Tratamiento integral a nivel de grupo familiar y de la comunidad (detección de enfermos y contactos).

El tratamiento antifímico debe iniciarse a la brevedad posible, ante la gravedad

del padecimiento, y bien puede utilizarse cualquiera de los dos esquemas que siguen:

1º- Isoniazida, etambutol, estreptomicina y esteroides (dexametasona).

2º- Rifampicina, etambutol, isoniazida y esteroides (dexametasona) (23).

## OBJETIVOS

### OBJETIVO PRIMARIO

- Disponer de métodos inmunológicos de alta especificidad y sensibilidad para el diagnóstico rápido y oportuno de la meningitis tuberculosa.

### OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Adaptar la técnica de ELISA (método directo) a la búsqueda de antígeno soluble de BCG en muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con trastornos neurológicos no infecciosos, con meningitis de origen desconocido, con cisticercosis comprobada por inmunofluorescencia indirecta, con meningitis bacteriana comprobada por cultivo del microorganismo y con meningitis tuberculosa comprobada por cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* y con sintomatología clínica.

- Determinar la presencia de anticuerpos IgG-anticobacterias utilizando la técnica de ELISA (método indirecto) por medio del sistema amplificado en muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con trastornos neurológicos no infecciosos, con meningitis de origen desconocido, con cisticercosis comprobada por inmunofluorescencia indirecta, con meningitis bacteriana comprobada por cultivo del microorganismo y con meningitis tuberculosa comprobada por cultivo de

*Mycobacterium tuberculosis* y con sintomatología clínica.

- Comparar los resultados obtenidos en cada método y decidir cual de ellos muestra las características de sensibilidad y especificidad para ser empleado como método de diagnóstico rutinario en el laboratorio a partir de muestras de líquido cefalorraquídeo.

### PLAN DE TRABAJO

En este estudio se trata de comparar la efectividad de dos técnicas de diagnóstico para la meningitis tuberculosa. ELISA indirecto amplificado con dos extractos solubles y evaluación de la respuesta IgG en cada muestra y ELISA directo para búsqueda de antígeno. Se emplean como grupo testigo a pacientes con trastornos neurológicos diversos no infecciosos y otros grupos con infecciones características como meningitis bacteriana (comprobada por cultivo), cisticercosis, meningitis de origen desconocido y un grupo con meningitis tuberculosa, comprobada por cultivo y con sintomatología clínica.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1) MATERIAL BIOLÓGICO**

a) Muestras de líquido cefalorraquídeo. Las muestras clínicas se obtuvieron de:

- Laboratorio de Bacteriología, Hospital de Infectología C.M. La Raza (IMSS).

- Sección de Neurología y Neurocirugía, Hospital de Especialidades C.M.

La Raza (IMSS).

- Laboratorio de Helmintos, Departamento de Parasitología, Escuela

Nacional de Ciencias Biológicas (I.P.N).

- Laboratorio de Investigaciones Inmunológicas, Departamento de

Microbiología, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, INDRE (SS).

### **CASOS NO INFECCIOSOS**

#### **- I - Grupo Testigo (n=31)**

Tumor cerebral

Hidrocefalia post-traumática

Aneurisma cerebral

Astrocitoma cerebral

#### **- II - Casos de meningitis por determinar, cisticercosis negativos (n=32).**

## CASOS INFECCIOSOS

- III - Cisticercosis (n=32).- Comprobada por inmunofluorescencia indirecta y hemaglutinación.

- IV - Meningitis bacterianas (n=30).- Comprobada por el aislamiento del microorganismo en cultivos específicos.

- V - Meningitis tuberculosa (n=24)

i) casos comprobados por cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* (n=4)

ii) casos sospechosos del padecimiento por valoración clínica ( n=20).

b) Cepas micobacterianas:

- *Mycobacterium bovis* cepa de BCG 1331 (Bacilo Calmette Güerin), Copenhague, Dinamarca, crecida en medio Sauton a pH 7.2, donada por el Instituto Nacional de Higiene, SSA.

- *Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv, crecida en medio Sauton pH 7.2, donada por el Instituto Nacional de Higiene, SSA.

c) Otros reactivos:

- Suero de conejo anti-BCG (Dakopatts).

- Suero de conejo anti-BCG conjugado a peroxidasa (Dakopatts).

- Suero de conejo anti-IgG humana conjugada a biotina (Dakopatts).

- Extravidina-peroxidasa (Sigma Chemical Co.).

- Albúmina sérica bovina, BSA (Sigma Chemical Co.).

## 2) MATERIAL QUÍMICO Y EQUIPO

- Ácido sulfúrico 4 N
- Albúmina sérica bovina 0.2 mg/ml. (Sigma Chemical Co.)
- Carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.1 N.
- Centrifuga refrigerada (Damon).
- Espectrofotómetro (Carl-Zeiss).
- Filtros millipore de 0.22  $\mu$ m.
- Lector para placas de ELISA (BIO-RAD).
- Medio de cultivo Sauton pH 7.2
- Membrana para diálisis con poro para moléculas de exclusión menores a 8000 daltones.
- Multipipeta con 12 canales de 50-200  $\mu$ l (Transferrpette).
- O-fenilendiamina (Sigma Chemical Co.).
- Peróxido de hidrógeno al 3% (Sigma Chemical Co.).
- Pipetas automáticas de 1-10  $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l, 200-1000  $\mu$ l (Gilson).
- Placas de poliestireno de 96 pozos con fondo plano (Costar).
- Reactivo de Folin 2N (Merck).
- Solución salina amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH 7.4 (PBS).
- Solución amortiguadora de carbonatos 0.01 M pH 9.6.
- Soluciones de bloqueo, de lavado y/o diluyente:
  - a) PBS-BSA 1%
  - b) PBS-BSA 3%
  - c) PBS-BSA 1%-Tween 20 al 0.05% (PBS-BSA 1%-T)
  - d) PBS-BSA 3%-Tween 20 al 0.05% (PBS-BSA 3%-T)
- Solución amortiguadora de fosfatos citratos 0.1 M pH 5.0
- Sustratos para ELISA:
  - 1) 4 mg o-fenilendiamina  
10 ml de solución amortiguadora fosfatos-citratos 0.1 M pH 5.0  
50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%
  - 2) 10 mg o-fenilendiamina  
25 ml PBS 0.01 M pH 7.4  
100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%
- Sonicador (Ultrasonics Inc.).
- Sulfato de cobre al 1%.
- Tartrato de sodio al 1%.

### 3) MÉTODOS

#### a) PREPARACIÓN DE EXTRACTOS ANTIGÉNICOS SOLUBLES

Las cepas de BCG y *Mycobacterium tuberculosis* se cultivaron en el medio líquido Sauton pH 7.2 por 4 ó 5 semanas, después se cosecharon por centrifugación, la masa bacteriana se lavó con PBS 0.01 M pH 7.4 y se distribuyó en alícuotas de aproximadamente 20 ml para su conservación a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Una de éstas alícuotas sirvió para preparar cada uno de los extractos antigénicos solubles, se sonicaron 25 minutos a 118 watts en baño de hielo, se centrifugaron durante 15 minutos a una velocidad de 10 000 rpm, se colectó el sobrenadante y se dializaron contra PBS haciéndole 3 ó 4 cambios a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . Se centrifugaron nuevamente y se filtraron en membranas millipore de  $0.22\ \mu\text{m}$ .

Una vez obtenidos los extractos antigénicos solubles, extracto soluble de BCG (ESBCG) y extracto soluble de *Mycobacterium tuberculosis* (ESMTB), se les determinaron proteínas por el método de Lowry y se conservaron en alícuotas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### b) ELISA DIRECTO PARA DETECCIÓN DE ANTÍGENO EN LCR

Las placas de poliestireno para ELISA se sensibilizaron con una solución de 10  $\mu\text{g/ml}$  de anti-BCG (Dakopatts Co.) en solución amortiguadora de carbonatos 0.01M pH 9.6 y se dejó incubar durante una noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los lavados se hicieron mediante un aspirador de 12 canales y con ayuda de una bomba de vacío para después agregar 200  $\mu\text{l}$

de PBS 0.01 M pH 7.4, el proceso de lavado se repitió 3 veces y se dejaron incubando con solución bloqueadora (PBS-BSA 3%) durante 90 minutos a 37°C, se aspiró el líquido y se adicionaron diferentes cantidades de proteínas de extracto soluble de BCG, esto es, de 1 a 1000 ng/ml, así como las muestras de LCR de los diferentes pacientes, en un volúmen total de 100 µl por pozo, cada muestra y cada uno de los puntos de la curva se adicionaron por duplicado. Se incubaron por 90 minutos a 37°C y después se lavaron con PBS-BSA 3%-Tween 0.05% (200 µl/pozo); se agregó el conjugado anti-BCG-peroxidasa (Dakopatts Co.) a una dilución de 1:100 (100 µl/pozo) durante 90 minutos a 37°C, se lavaron 4 veces con PBS y se agrega el sustrato número 1 (4 mg de o-fenilendiamina, 25 ml de PBS 0.01M pH 7.4, 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%), 100 µl/pozo, la reacción se detuvo después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente por la adición de ácido sulfúrico 4 N (50 µl/pozo). Los pozos se leyeron a 490 nm en un lector para placas de ELISA.

c) ELISA INDIRECTO CON SISTEMA AMPLIFICADO (EXTRAVIDINA-BIOTINA) PARA DETECTAR ANTICUERPOS ANTI-IgG EN LCR.

Las placas de 96 pozos se sensibilizaron con 100 µl de cada uno de los extractos: ESBCG y ESMTB a una concentración de proteínas de 10 µg/ml diluidos en solución amortiguadora de carbonatos 0.01 M pH 9.6 durante 18 hrs a 4°C. Se lavaron 3 veces con PBS 0.01 M pH 7.4 (200 µl/pozo) y se adicionaron 200 µl de la solución de bloqueo PBS-BSA 1% incubándose 90 minutos a 37°C. Después se aspiró el líquido y se agregó a cada pozo 100 µl del LCR diluido 1:10, se incubó por 1 hora a 37°C, se lavaron los

pozos con 200  $\mu$ l de PBS-BSA 1%-Tween 0.05% y se agregó la solución de anti-IgG humana biotinilada (100  $\mu$ l/pozo) a una dilución de 1:500 en PBS-BSA 1%-Tween 0.05% se incubó por una hora, y después de 4 lavados con el mismo diluyente se agregó el conjugado extravidina-peroxidasa (100  $\mu$ l/pozo) a una dilución de 1:2000, se retiró y se lavó con PBS 0.01 M pH 7.4 (200  $\mu$ l/pozo) y se agregó el sustrato 2 ( 10 mg de o-fenilendiamina, 25 ml de PBS 0.01 M pH 7.4, 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%) por 30 minutos a 37°C. Se adicionaron 50  $\mu$ l de ácido sulfúrico 4 N a cada pozo para detener la reacción y se registró la densidad óptica de los pozos a 490 nm en un lector para placas de ELISA.

#### d) ÍNDICE DE DENSIDAD ÓPTICA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO UTILIZADO.

Se empleó el índice de densidad óptica o IDO (25, 29) como prueba para analizar la condición de las muestras empleadas en las técnicas de ELISA indirecto amplificado que es el producto de la relación entre los valores de densidad óptica con los controles positivos verdaderos (LCR a los que se les comprobó por cultivo y aislamiento *M.tuberculosis*) que resultaron alto y bajo reactivos en cada prueba, la media, desviación estándar y coeficiente de variación. Además se usó una curva estándar con concentraciones conocidas de un extracto soluble de BCG para detectar antígeno en los LCR en el caso del ELISA directo. Por último se determinan la sensibilidad y especificidad de cada prueba por medio de cálculos con fórmulas establecidas (26).

## RESULTADOS

Se trabajaron 5 diferentes grupos de muestras de líquido cefalorraquídeo :

- a) Grupo control negativo.
- b) Grupo con meningitis de origen desconocido.
- c) Grupo con cisticercosis.
- d) Grupo con meningitis piógena.
- e) Grupo con meningitis tuberculosa.

Los resultados de las pruebas de ELISA indirecto amplificado usando los dos extractos antigénicos (ESBCG y ESMTB) y del ELISA directo, muestran que en el grupo testigo negativo proveniente de muestras de LCR con origen no infeccioso ninguna muestra resultó positiva. (Ver tabla 12).

Para el grupo de LCR con meningitis de origen desconocido, también resultaron negativas a las 3 técnicas usadas (Ver tabla 13), lo cual sugiere que este tipo de muestras son de etiología aun por determinar, ya que también resultaron negativas a las pruebas de IFI y HAI. Las muestras del grupo con cisticercosis comprobada por IFI y HAI, resultaron ser la mayor parte negativas a las técnicas desarrolladas para el diagnóstico de la meningitis tuberculosa, a excepción de las muestras número 9, 17, 18, 25, 28 y 29 que dependiendo de la prueba y extracto utilizado fueron positivas o indeterminadas (Ver tabla 14).

En el grupo de LCR con meningitis piógena comprobada por el aislamiento del microorganismo causante del padecimiento, se identificaron como positivas la muestras número 11, 19 y 21 a las pruebas ELISA indirecto amplificado con los 2 extractos y

negativas a la detección de antígeno soluble de BCG, mientras que la muestra 18 solo fue positiva al ELISA indirecto-ESBCG (Ver tabla 15).

Por último el grupo caracterizado como testigo positivo a meningitis tuberculosa mostró algunos resultados como se esperaban, pues la mayoría se identificó como positiva a las 2 pruebas de ELISA indirecto usando los 2 extractos, y a pocos se les detectó antígeno soluble en el ELISA directo (Ver tabla 16). Los valores registrados como densidades ópticas para cada grupo de estudio por la técnica de ELISA indirecto amplificado-ESBCG se encuentran en la tabla 1, así como la media poblacional por grupo y el comportamiento de los 5 grupos de acuerdo al valor calculado como rango de corte (IDO) se muestra en la figura 1.

Por otro lado los resultados de las densidades ópticas para cada grupo de estudio por la técnica de ELISA indirecto amplificado-ESMTB se encuentran en la tabla 2, así como la media poblacional por grupo y el comportamiento de los 5 grupos de acuerdo al valor calculado como rango de corte (IDO) se muestra en la figura 2.

El cálculo del índice de densidad óptica que se utilizó como rango de corte se describe en la tabla 4 y 5. Por lo que el número de muestras negativas, positivas e indeterminadas para cada grupo y en cada prueba de ELISA indirecto se muestran en la tabla 6. Los valores de sensibilidad y especificidad para esta técnica con sus 2 variantes, resultaron ser aceptables como para utilizarse en el diagnóstico de la enfermedad.

Los valores de densidad óptica para el ELISA directo en los 5 grupos de estudio se muestran en la tabla 8, siendo la muestra número 11 del grupo con meningitis piógena y las número 1, 8, 11, 12 y 18 del grupo con meningitis piógena a las que se les detectó antígeno soluble de BCG. Las cantidades detectadas para cada una de ellas se muestran en la tabla 10. La sensibilidad de la prueba fue muy baja (20.83%) a pesar de su alta sensibilidad registrada para cada grupo (Ver tabla 11).

1) ELISA INDIRECTO AMPLIFICADO CON EXTRACTO SOLUBLE DE BCG.

TABLA 2. Valores promedio de densidad óptica a 490 nm para cada una de las muestras ensayadas por duplicado en ELISA indirecto amplificado-ESBCG y media para cada grupo.

NUMERO DE MUESTRA	TESTIGO	MENINGITIS DESCONOCIDA	CISTICERCOSIS (+)	MENINGITIS PIOGENAS	MENINGITIS TUBERCULOSA
1	0.02	0.068	0.027	0.094	2.29
2	00.094	0.144	0.149	0.0505	0.612
3	0.0415	0.0915	0.037	0.049	0.882
4	0.002	0	0.059	0.132	0.603
5	0.003	0.088	0.120	0.117	0.897
6	0	0.154	0.154	0.098	0.941
7	0	0.131	0.002	0.111	0.222
8	0.066	0.06	0.009	0.157	2.376
9	0.1	0.092	0.506	0.15	2.076
10	0.06	0.098	0.319	0.091	2.057
11	0.0395	0.274	0.040	1.18	1.129
12	0.037	0.251	0.326	0.172	0.612
13	0.032	0.313	0.185	0.084	1.064
14	0.036	0.206	0.062	0.053	0.875
15	0.073	0.011	0.077	0.063	0.445
16	0.044	0.019	0.025	0.175	2.278
17	0.043	0.07	0.353	0.222	0.576
18	0.047	0.013	0.342	0.338	0.883
19	0.263	0.064	0.051	0.533	0.399
20	0.218	0.036	0.266	0.048	0.441
21	0.040	0.002	0.045	0.563	0.620
22	0.157	0.033	0.159	0.162	1.029
23	0.034	0.017	0.046	0.054	0.263
24	0.031	0.043	0.241	0.11	2.077
25	0.056	0.001	0.371	0.268	
26	0.042	0.043	0.219	0.09	
27	0.079	0.05	0.051	0.061	
28	0.089	0.02	1.732	0.11	
29	0.157	0.079	0.999	0.181	
30	0.098	0.085	0.108	0.106	
31	0.069	0.146	0.178		
32		0.156	0.119		
<b>MEDIA</b>	<b>0.0694</b>	<b>0.088</b>	<b>0.231</b>	<b>0.171</b>	<b>1.061</b>

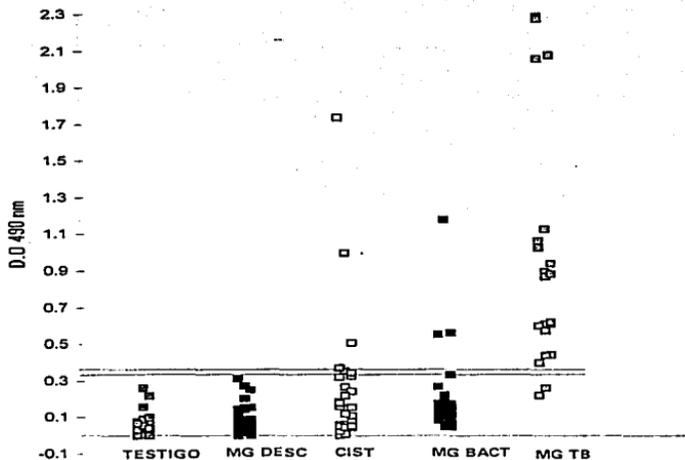


Figura 1.- ELISA indirecto amplificado con extracto soluble de BCG (ESBCG) para cada muestra perteneciente a los grupos: Testigo, meningitis de origen desconocido (MG DESC), cisticercosis (CIST), meningitis bacteriana (MG BACT) y meningitis tuberculosa (MGTB). Los puntos corresponden a los valores de densidad óptica registrada a 490 nm para cada muestra probada por duplicado y las líneas pertenecen al rango de IDO en donde se detectan positivos, indeterminados y negativos.

2) ELISA INDIRECTO AMPLIFICADO CON EXTRACTO SOLUBLE DE *Mycobacterium tuberculosis* H 37 Rv.

TABLA 3. Valores promedio expresados como densidad óptica a 490 nm para cada muestra ensayada por duplicado en ELISA indirecto amplificado-ESMTB y media para cada grupo.

NUMERO DE MUESTRA	TESTIGO	MENINGITIS DESCONOCIDA	CISTICERCOSIS (+)	MENINGITIS PIÓGENAS	MENINGITIS TUBERCULOSA
1	0.114	0.175	0.263	0.191	1.285
2	0.289	0.266	0.115	0.106	0.932
3	0.161	0.188	0.179	0.05	1.229
4	0.146	0.044	0.096	0.269	0.481
5	0.135	0.093	0.104	0.165	0.878
6	0.032	0.225	0.225	0.138	1.455
7	0.054	0.109	0.026	0.143	0.981
8	0.16	0.069	0.025	0.152	1.756
9	0.198	0.075	0.383	0.306	1.567
10	0.06	0.107	0.243	0.175	2.038
11	0.046	0.172	0.043	0.919	0.733
12	0.061	0.318	0.255	0.151	0.311
13	0.05	0.182	0.125	0.063	0.955
14	0.044	0.110	0.056	0.050	0.746
15	0.046	0.355	0.055	0.112	0.468
16	0.04	0.053	0.029	0.132	0.801
17	0.064	0.083	0.235	0.170	1.711
18	0.079	0.07	0.174	0.320	1.259
19	0.045	0.149	0.058	0.428	0.813
20	0.281	0.07	0.205	0.043	1.291
21	0.210	0.026	0.052	0.421	0.727
22	0.045	0.015	0.194	0.152	1.475
23	0.293	0.06	0.055	0.071	1.157
24	0.043	0.058	0.170	0.201	0.941
25	0.03	0.0755	0.211	0.227	
26	0.038	0.064	0.208	0.075	
27	0.042	0.067	0.039	0.065	
28	0.103	0.048	1.379	0.100	
29	0.09	0.123	0.647	0.124	
30	0.108	0.271	0.133	0.119	
31	0.102	0.187	0.241		
32		0.085	0.093		
<b>MEDIA</b>	<b>0.107</b>	<b>0.115</b>	<b>0.178</b>	<b>0.187</b>	<b>1.069</b>

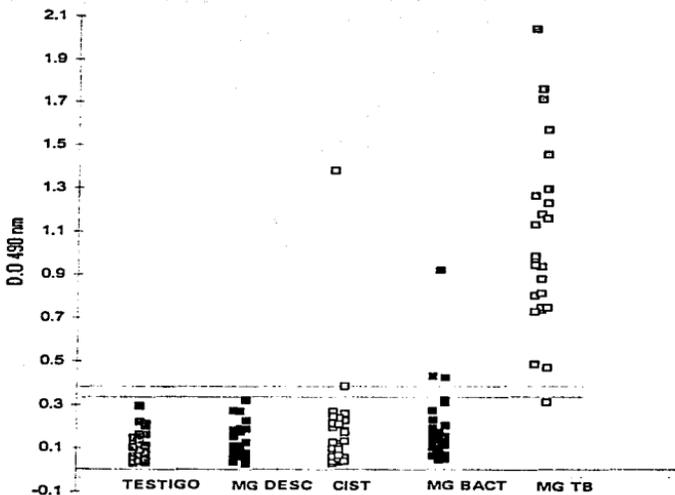


Figura 2.- ELISA indirecto amplificado con extracto soluble de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ESMTB) para cada muestra perteneciente a los grupos: Testigo, meningitis de origen desconocido (MG DESC), cisticercosis (CIST), meningitis bacteriana (MG BACT) y meningitis tuberculosa (MGTB). Los puntos corresponden a los valores de densidad óptica registrada a 490 nm para cada muestra probada por duplicado y las líneas pertenecen al rango de IDO en donde se detectan positivos, indeterminados y negativos.

### 3) ÍNDICE DE DENSIDAD ÓPTICA (IDO)

Se expresa como un rango de densidad óptica en donde valores mayores al límite superior detectan muestras positivas, valores menores al límite inferior detecta muestras negativas y valores intermedios entre los límites detecta muestras indeterminadas.

Del grupo de pacientes con meningitis tuberculosa comprobada por el cultivo, aislamiento e identificación del bacilo de *M.tuberculosis* se eligieron los que fueron altos y bajos reactivos en cuanto a respuesta de anticuerpos IgG anti-micobacterias en cada ELISA probado para ser los controles en la determinación del ODI.

TABLA 4. Testigos alto y bajo reactivos con meningitis tuberculosa comprobada por el cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*.

	ALTO REACTIVO		BAJO REACTIVO	
No.de ensayos	ELISA indirecto amplificado ESBCG	ELISA indirecto amplificado ESMTB	ELISA indirecto amplificado ESBCG	ELISA indirecto amplificado ESMTB
	Muestra No.11	Muestra No.19	Muestra No.19	Muestra No.12
1	1.052	0.864	0.41	0.301
2	1.206	0.792	0.389	0.322
3	1.114	0.901	0.395	0.315
4	1.14	0.824	0.375	0.345

Los valores se expresan como densidad óptica a 490 nm en cada ELISA

**TABLA 5. Cálculo del índice de densidad óptica (IDO) tomando en cuenta los testigos verdaderos, bajo y alto reactivos.**

<b>ESBCG</b>	<b>ESMTB</b>
valor bajo/valor alto	valor bajo/valor alto
$0.041 / 1.052 = 0.389734$	$0.301 / 0.864 = 0.34838$
$0.389 / 1.206 = 0.322554$	$0.322 / 0.792 = 0.406566$
$0.395 / 1.114 = 0.354578$	$0.315 / 0.901 = 0.349612$
$0.375 / 1.14 = 0.328947$	$0.345 / 0.824 = 0.418689$
<b>MEDIA</b>	<b>MEDIA</b>
0.348953	0.380812
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>	<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>
0.030506	0.037073
<b>COEFICIENTE DE VARIACIÓN</b>	<b>COEFICIENTE DE VARIACIÓN</b>
9%	10%

La determinación se realizó utilizando los valores de densidad óptica obtenidos en cada ELISA y dividiendo el valor bajo entre el valor alto en cada prueba, para después calcular los demás parámetros como promedio, desviación estándar y coeficiente de variación en cada caso.

Calculando el IDO al 95% de confianza para cada técnica se tiene:  
media +/- 1.96 (desviación estándar/número de ensayos)

Para el ELISA indirecto amplificado con ESBCG:

$$0.348953 + 1.96 (0.030506/4) = 0.3639$$
$$0.348953 - 1.96 (0.030506/4) = 0.3340$$

Por lo tanto:

**NEGATIVO 0.3340 ---- INDETERMINADO --- 0.3639 POSITIVO**

Para el ELISA indirecto amplificado con ESMTB:

$$0.380812 + 1.96 (0.037073/4) = 0.39897$$
$$0.380812 - 1.96 (0.037073/4) = 0.3626$$

Por lo tanto:

**NEGATIVO 0.3626 ---- INDETERMINADO --- 0.3989 POSITIVO**

Consecuentemente, se tiene un intervalo de valores de densidad óptica para decidir si la muestra probada es positiva o negativa, si el valor es intermedio al límite superior e inferior se decide que la muestra es indeterminada.

Ahora bien, al analizar cada uno de los resultados en las muestras de los 5 grupos se puede establecer el valor positivo o negativo.

**TABLA 6.** Resultados de cada una de las muestras ensayadas con ESBG y ESMTB para el ELISA indirecto amplificado utilizando como valor de corte el índice de densidad óptica (IDO).

ESBG	POSITIVOS	NEGATIVOS	INDETERMINADOS	TOTAL
Testigo	0	31	0	31
Meningitis desconocida	0	32	0	32
Cisticercosis (+)	4	26	2	32
Meningitis piógena	3	26	1	30
Meningitis tuberculosa	22	2	0	24
ESMTB	POSITIVOS	NEGATIVOS	INDETERMINADOS	TOTAL
Testigo	0	31	0	31
Meningitis desconocida	0	32	0	32
Cisticercosis (+)	2	29	1	32
Meningitis piógena	3	27	0	30
Meningitis tuberculosa	23	1	0	24

4) CÁLCULO DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL ELISA  
INDIRECTO AMPLIFICADO USANDO LOS DOS EXTRACTOS ANTIGÉNICOS.

Tomando en consideración los resultados para cada muestra por el IDO se calcularon los parámetros de sensibilidad y especificidad (26) en cada ELISA :

ENFERMEDAD

+

-

a	b
c	d

PRUEBA

+

-

SENSIBILIDAD

$$\frac{a}{a + c} \times 100$$

ESPECIFICIDAD

$$\frac{d}{b + d} \times 100$$

Siendo **a** los sujetos positivos a la enfermedad y positivos a la prueba (verdaderos positivos), **b** los positivos a la prueba pero que no están enfermos (falsos positivos), **c** negativos a la prueba y enfermos (falsos negativos) y **d** los sujetos negativos a la prueba y a la enfermedad (verdaderos negativos).

ESBCG

ESMTB

## SENSIBILIDAD

$22 / 2 + 22 = 91.66\%$	$23 / 1 + 23 = 95.83\%$
-------------------------	-------------------------

GRUPO

## ESPECIFICIDAD

TESTIGO	$31 / 0 + 31 = 100\%$	$31 / 0 + 31 = 100\%$
MENINGITIS DESCONOCIDA	$32 / 0 + 32 = 100\%$	$32 / 0 + 32 = 100\%$
CISTICERCOSIS	$26 / 4 + 26 = 86.6\%$	$29 / 2 + 29 = 93.54\%$
MENINGITIS PIOGENA	$26 / 3 + 26 = 89.65\%$	$27 / 3 + 27 = 90\%$

## 5) ELISA DIRECTO PARA DETECCION DE ANTÍGENO

TABLA 7. Curva estándar utilizando el extracto soluble de BCG. Los valores son el promedio de densidad óptica a 490 nm. para cada concentración empleada de antígeno soluble que se efectuaron por duplicado, realizando un total de 11 determinaciones.

Concentración (ng/ml)	Densidad óptica (valor promedio)
1	0.0445
5	0.0902
10	0.133
25	0.191
50	0.244
75	0.285
100	0.338
250	0.447
500	0.604
750	0.717
1000	0.890

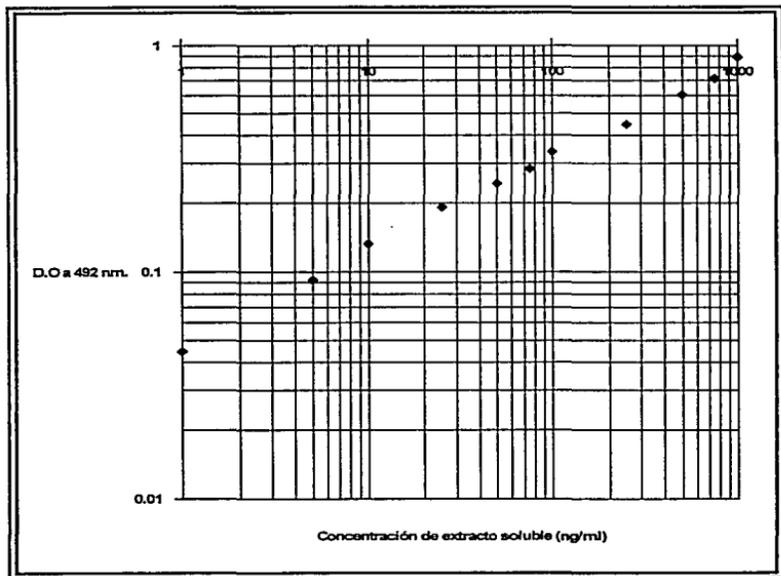


Figura 3. Curva estándar para la determinación de antígeno soluble de BCG.

TABLA 8. Valores promedio de densidad óptica a 490 nm. para cada una de las muestras ensayadas por duplicado para el ELISA directo.

NUMERO DE MUESTRA	TESTIGO	MENINGITIS DECONOCIDA	CISTICERCOSIS (+)	MENINGITIS PIÓGENAS	MENINGITIS TUBERCULOSA
1	0.0255	0.009	0.032	0.041	0.230
2	0.0315	0.032	0.025	0.05	0.07
3	0.0335	0.01	0.021	0.044	0.048
4	0.022	0.009	0.028	0.048	0.039
5	0.032	0.011	0.033	0.038	0.055
6	0.011	0.010	0.032	0.082	0.077
7	0.038	0.017	0.03	0.038	0.041
8	0.048	0.009	0.039	0.055	0.190
9	0.055	0.013	0.047	0.061	0.041
10	0.041	0.027	0.021	0.064	0.031
11	0.021	0.008	0.02	0.129	0.167
12	0.031	0.009	0.021	0.077	0.101
13	0.053	0.014	0.024	0.043	0.046
14	0.039	0.032	0.014	0.05	0.052
15	0.029	0.024	0.027	0.061	0.036
16	0.019	0.028	0.067	0.048	0.031
17	0.051	0.01	0.033	0.05	0.032
18	0.046	0.034	0.03	0.033	0.117
19	0.025	0.015	0.024	0.033	0.094
20	0.032	0.012	0.027	0.043	0.037
21	0.038	0.012	0.014	0.044	0.031
22	0.018	0.014	0.017	0.05	0.059
23	0.02	0.015	0.027	0.034	0.042
24	0.038	0.03	0.019	0.044	0.035
25	0.04	0.015	0.055	0.026	
26	0.028	0.031	0.018	0.045	
27	0.011	0.009	0.039	0.047	
28	0.036	0.010	0.057	0.043	
29	0.027	0.013	0.031	0.037	
30	0.042	0.021	0.038	0.048	
31	0.047	0.053	0.038		
32		0.011	0.041		



Los LCR positivos a antígeno soluble de BCG aparecen en la tabla sombreados

Para calcular cuales de aquellas muestras resultaron positivas a la detección de antígeno soluble de BCG se empleó una curva estándar o de calibración en donde se agregaron cantidades conocidas de antígeno y por medio del método de ELISA directo se determinó una lectura a 492 nm. en cada caso. Los datos de concentración (x) y densidad óptica (y) se ajustaron a una línea recta calculando el logaritmo 10 en cada eje. así, el valor de cada muestra se interpola en el eje de las x y se detecta su valor correspondiente a concentración calculando el inverso del logaritmo. Una muestra se consideró positiva cuando los valores de concentración fueran mayores de 5 ng/ml (4, 17).

TABLA 9. Resultado del número de muestras en las que se detectó antígeno soluble de BCG.

GRUPO	NEGATIVAS	POSITIVAS
TESTIGO	31	0
MENINGITIS DESCONOCIDA	32	0
CISTICERCOSIS	32	0
MENINGITIS PIÓGENA	29	1
MENINGITIS TUBERCULOSA	19	5

TABLA 10.- Concentración de antígeno soluble de BCG en las muestras de LCR positivas a antígeno calculados por la curva estándar.

GRUPO	NÚMERO DE MUESTRA	D.O.	CONCENTRACION (ng/ml)
Meningitis piógena	11	0.129	11.16
Meningitis tuberculosa	1	0.230	44.4
"	8	0.190	28.1
"	11	0.167	20.2
"	12	0.101	6.2
"	18	0.117	8.9

## 6) CÁLCULO DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL ELISA DIRECTO

ENFERMEDAD		
+	-	
		PRUEBA
a	b	+
c	d	-

$$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{a}{a + c} \times 100$$

$$\text{ESPECIFICIDAD} = \frac{d}{b + d} \times 100$$

Siendo **a** los sujetos positivos a la enfermedad y positivos a la prueba (verdaderos positivos), **b** los positivos a la prueba pero que no están enfermos (falsos positivos), **c** negativos a la prueba y enfermos (falsos negativos) y **d** los sujetos negativos a la prueba y a la enfermedad (verdaderos negativos).

**TABLA 11. Sensibilidad y especificidad del ELISA directo para detectar antígeno soluble de BCG en muestras de LCR.**

<b>SENSIBILIDAD</b>		$5 / 5 + 19 \times 100 = 20.83\%$
<b>ESPECIFICIDAD</b>		
<b>GRUPOS</b>	<b>TESTIGO</b>	$31 / 0 + 31 \times 100 = 100\%$
	<b>MENINGITIS DESCONOCIDA</b>	$32 / 0 + 32 \times 100 = 100\%$
	<b>CISTICERCOSIS</b>	$32 / 0 + 32 \times 100 = 100\%$
	<b>MENINGITIS PIÓGENA</b>	$29 / 1 + 29 \times 100 = 96.6\%$

TABLA 12. Características del grupo testigo y su resultado en las 3 técnicas de diagnóstico para la meningitis tuberculosa.

No.DE MUESTRA	Padecimiento neurológico no infeccioso	ELISA indirecto amplificado-ESBCG	ELISA indirecto amplificado-ESMTB	ELISA directo
1	Aneurisma cerebral	-	-	-
2	Tumor cerebral	-	-	-
3	Aneurisma cerebral	-	-	-
4	Hidrocefalia post-traumática	-	-	-
5	Hidrocefalia post-traumática	-	-	-
6	Hidrocefalia post-traumática	-	-	-
7	Hidrocefalia post-traumática	-	-	-
8	Hidrocefalia post-traumática	-	-	-
9	Tumor cerebral	-	-	-
10	Aneurisma cerebral	-	-	-
11	Hidrocefalia post-traumática	-	-	-
12	Hidrocefalia post-traumática	-	-	-
13	Hidrocefalia post-traumática	-	-	-
14	Aneurisma cerebral	-	-	-
15	Hidrocefalia post-traumática	-	-	-
16	Aneurisma cerebral	-	-	-
17	Hemorragia subaracnoidea	-	-	-
18	Aneurisma cerebral	-	-	-
19	Meningioma	-	-	-
20	Hemorragia subaracnoidea	-	-	-
21	Tumor cerebral	-	-	-
22	Tumor cerebral	-	-	-
23	Aneurisma cerebral	-	-	-
24	Tumor cerebral	-	-	-
25	Tumor cerebral	-	-	-
26	Tumor cerebral	-	-	-
27	Astrocitoma cerebral	-	-	-
28	Hidrocefalia post-traumática	-	-	-
29	Aneurisma cerebral	-	-	-
30	Aneurisma cerebral	-	-	-
31	Tumor cerebral	-	-	-

TABLA 13. Características del grupo con meningitis de origen desconocido y su resultado en las 3 técnicas de diagnóstico para la meningitis tuberculosa.

No.DE MUESTRA	Pruebas de IFI (-) y HAI (-) además sinomatología neurológica diversa	ELISA amplificado-ESBCG	Indirecto	ELISA amplificado-ESMTB	Indirecto	ELISA directo
1	+	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-	-
6	+	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	-	-
8	+	-	-	-	-	-
9	+	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-
11	+	-	-	-	-	-
12	+	-	-	-	-	-
13	+	-	-	-	-	-
14	+	-	-	-	-	-
15	+	-	-	-	-	-
16	+	-	-	-	-	-
17	+	-	-	-	-	-
18	+	-	-	-	-	-
19	+	-	-	-	-	-
20	+	-	-	-	-	-
21	+	-	-	-	-	-
22	+	-	-	-	-	-
23	+	-	-	-	-	-
24	+	-	-	-	-	-
25	+	-	-	-	-	-
26	+	-	-	-	-	-
27	+	-	-	-	-	-
28	+	-	-	-	-	-
29	+	-	-	-	-	-
30	+	-	-	-	-	-
31	+	-	-	-	-	-
32	+	-	-	-	-	-

TABLA 14. Características del grupo con cisticercosis y su resultado en las 3 técnicas de diagnóstico para la meningitis tuberculosa (La sigla I significa caso indeterminado).

No.DE MUESTRA	TAC (+) Pruebas IFI(+) y HAI(+)	ELISA indirecto amplificado-ESBCG	ELISA indirecto amplificado-ESMTB	ELISA directo
1	+	-	-	-
2	+	-	-	-
3	+	-	-	-
4	+	-	-	-
5	+	-	-	-
6	+	-	-	-
7	+	-	-	-
8	+	-	-	-
9	+	+	I	-
10	+	-	-	-
11	+	-	-	-
12	+	-	-	-
13	+	-	-	-
14	+	-	-	-
15	+	-	-	-
16	+	-	-	-
17	+	I	-	-
18	+	I	-	-
19	+	-	-	-
20	+	-	-	-
21	+	-	-	-
22	+	-	-	-
23	+	-	-	-
24	+	-	-	-
25	+	+	-	-
26	+	-	-	-
27	+	-	-	-
28	+	+	+	-
29	+	+	+	-
30	+	-	-	-
31	+	-	-	-
32	+	-	-	-

TABLA 15. Características del grupo con meningitis piógena y su resultado en las 3 técnicas de diagnóstico para la meningitis tuberculosa (La sigla I significa caso indeterminado).

No.DE MUESTRA	Microorganismo aislado por cultivo del LCR	ELISA amplificado	Indirecto-ESBCG	ELISA amplificado	Indirecto-ESMTB	ELISA directo
1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-	-
2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	-	-	-	-
3	<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-	-
4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-	-
5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-	-
6	<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-	-
7	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-	-
8	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
9	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
10	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	-	-	-	-
11	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+	-	+	-	+
12	<i>Cryptococcus neoformans</i>	-	-	-	-	-
13	<i>Cryptococcus neoformans</i>	-	-	-	-	-
14	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	-	-	-	-
15	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	-	-	-	-
16	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	-
17	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
18	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	I	-	-	-
19	<i>Serratia marcescens</i>	-	+	-	+	-
20	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	-	-	-	-
21	<i>Streptococcus β-hemolítico</i>	-	+	-	+	-
22	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
23	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	-	-	-	-
24	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-	-
25	<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-	-
26	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
27	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
28	<i>Cryptococcus neoformans</i>	-	-	-	-	-
29	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	-	-	-	-
30	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-

TABLA 16. Características del grupo con tuberculosis meníngea y su resultado en las 3 técnicas de diagnóstico de la enfermedad (La sigla I significa caso indeterminado).

No. DE MUESTRA	Cultivo y aislamiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en el LCR	Citoquímico del LCR con concentración elevada de proteínas y baja concentración de glucosa	ELISA indirecto amplificado ESBCG	ELISA indirecto amplificado ESMTB	ELISA directo
1	-	+	+	+	+
2	-	+	+	+	-
3	-	+	+	+	-
4	-	+	+	+	-
5	-	+	+	+	-
6	-	+	+	+	-
7	-	+	-	+	-
8	-	+	+	+	+
9	-	+	+	+	-
10	-	+	+	+	-
11	+	+	+	+	+
12	+	+	+	-	-
13	-	+	+	+	-
14	-	+	+	+	-
15	-	+	+	+	-
16	-	+	+	+	-
17	-	+	+	+	-
18	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+
20	-	+	+	+	-
21	-	+	+	+	-
22	-	+	+	+	-
23	-	+	+	+	-
24	-	+	+	+	-

## DISCUSIÓN

La meningitis tuberculosa es una enfermedad que desde hace años ha sido muy difícil de diferenciar y en la mayoría de los casos si no es diagnosticada a tiempo puede llegar a ser mortal por las confusiones que implica su similitud con otros padecimientos neurológicos (14, 21, 28). Es de interés para los investigadores y sobre todo para los médicos encargados de darle seguimiento a éste tipo de enfermedad, contar con métodos de diagnóstico sencillos, rápidos y eficaces para poder diferenciar el padecimiento y poder así ofrecer un tratamiento oportuno, ya que como se sabe, las complicaciones que se manifiestan en los pacientes llegan a ser fulminantes al grado de diagnosticar *post-mortem* el agente infeccioso causal de su muerte (12, 13, 28).

En el presente trabajo se implementaron 3 diferentes técnicas para diagnosticar a la meningitis tuberculosa en muestras de líquido cefalorraquídeo, las cuales son:

- a) ELISA indirecto amplificado, en el cual se emplearon 2 extractos solubles con similitudes antigénicas, ESMTB y ESBCG con el método de amplificación Extravidina-Biotina que permite incrementar la respuesta cuando en el sistema empleado existan pocos componentes, como es el caso de los anticuerpos específicos anti-*Mycobacterium tuberculosis* presentes en el líquido cefalorraquídeo (18).

Los resultados indican diferencias de reconocimiento por parte de los anticuerpos reactivos procedentes de muestras realmente positivas a la enfermedad (comprobado por el cultivo bacteriológico de *M. tuberculosis*) y de los demás grupos testigos que no presentaron tuberculosis, estos datos se reflejan en los valores de sensibilidad y especificidad y que siendo mayores del 90% pueden distinguirse como buenos métodos de diagnóstico (26). Para el extracto soluble de *M. tuberculosis*, la sensibilidad fue del 95.83% y especificidad del 100, 100, 93.54 y 90 % para los grupos testigo, con meningitis desconocida, cisticercosis y con meningitis piógena respectivamente. Para el extracto soluble de BCG la sensibilidad fue del 91.66% y la especificidad del 100, 100, 86.6 y 89.6% para los grupos testigo, con meningitis desconocida, cisticercosis y con meningitis piógena respectivamente.

b) ELISA directo, permite detectar cantidades pequeñas de antígeno soluble en las muestras por probar con ayuda de una curva estándar en la que se fueron agregando concentraciones conocidas del extracto antigénico de BCG.

La técnica no fue tan sensible como se esperaba ya que se obtuvo un valor de 20.83% y una especificidad del 100, 100, 100 y 96.6% para los grupos testigo, con meningitis desconocida, cisticercosis y con meningitis piógena respectivamente. Estas características hacen que la técnica tenga pocas probabilidades de ser utilizada como herramienta en el diagnóstico de la enfermedad.

El índice de densidad óptica (ODI) es una determinación numérica que se calculó para conocer la condición de cada muestra ensayada en las técnicas de ELISA

indirecto amplificado y como tal no es un valor fijo sino un rango de valores en donde resultados menores al valor menor de densidad óptica se catalogan como muestras negativas, resultados mayores son positivos y valores entre éstos dos se consideraron indeterminados. Este modo de evaluación fué considerado el adecuado porque en cada experimento los niveles de anticuerpos de un solo espécimen se reflejan en la densidad óptica obtenida y varían día a día, por lo tanto fué necesario tomar en cuenta testigos verdaderos altos y bajos a la enfermedad.

En algunos casos se obtuvieron resultados falsos positivos por parte de algunas muestras pertenecientes a los grupos de cisticercosos o con meningitis bacteriana, y la respuesta puede ser explicada como una reacción cruzada por parte de los antígenos micobacterianos, cisticercosos o bien bacterianos, en donde determinantes antigénicos similares estén compartidos y que son reconocidos por los anticuerpos presentes en el fluido biológico. Estas estructuras antigénicas similares que en algunos microorganismos se han conservado a lo largo de la evolución y a veces juegan papeles importantes en la respuesta inmunológica, anteriormente se les llamaba proteínas de choque térmico, ya que se pensaba en que sólo cambios bruscos en la temperatura de su crecimiento afectaban a moléculas constitutivas sustituyéndose por las HSP (heat shock proteins), ahora se sabe que cualquier situación de estrés afecta de manera considerable el metabolismo biológico del organismo (39).

En el grupo de meningitis desconocida ningún LCR fue positivo para cualquiera de los 3 métodos, siendo así negativos a cisticercosis, meningitis bacteriana y tuberculosis y con etiología aún por determinar.

Cabe señalar que el número de los casos falsos positivos dependió del extracto antigénico empleado para el ELISA, resultando el ESMTB el mejor antígeno que discrimina la condición de la muestra y el método se respalda por los valores de sensibilidad y especificidad ya mencionados.

El comportamiento para el LCR número 11 y 18 del grupo clasificado con tuberculosis meningea concuerda con lo esperado, encontrándose elevados sus niveles de anticuerpos IgG específicos anti-*Mycobacterium tuberculosis* y anti-BCG, y además positivo a antígeno por haberse aislado e identificado el agente causal de la enfermedad en medios de cultivos especiales y por detectarse antígeno soluble en el fluido 20.7 y 8.9 ng /ml respectivamente. Sin embargo, la muestra número 12 fué negativa a la prueba ELISA indirecto con ESMTB, lo cual no indica que no estuviera enfermo por el contacto de la micobacteria en su organismo sino que, por el método de valoración resulta ser un caso positivo a cultivo y bajo reactivo a anticuerpos.

El último caso, LCR número 19, fué positivo a las 2 pruebas para determinar anticuerpos, pero no fué detectada la cantidad mínima de antígeno soluble en el fluido, que pudo deberse a que al momento de preparar la muestra para la siembra en cultivo se haya concentrado tanto como para no dejar bacilos o restos de ellos que pudieran ser detectados por el método, aunque es preciso señalar que la muestra no fué totalmente negativa a antígeno, se encontraron rastros, pero el límite de detección para la prueba se consideró en 5 ng/ml y el valor obtenido para esta muestra no alcanza a ser considerado como positivo.

En otras muestras de líquidos cefalorraquídeos pertenecientes al grupo de tuberculosos clínicos se detectaron altos reactores de los anticuerpos específicos hacia las dos cepas micobacterianas y dos de ellos, la muestra número 1 y 8 se les detectó antígeno soluble, 44.4 y 28.1 ng/ml respectivamente. Existió un caso de meningitis piógena causada por *S. pneumoniae* que resultó ser positivo a antígeno, detectándose 11.1 ng/ml, se trata de un paciente en edad pediátrica que manifestaba sintomatología de problemas pulmonares al inicio de su ingreso al hospital y que su estado general se agravó en unas semanas hasta alcanzar trastornos neurológicos severos, al momento de la toma de muestra se sospechaba de una meningitis piógena la cual se confirmó por el cultivo e identificación del agente causal, sin embargo, la cantidad de antígeno detectado sugiere la presencia de restos antigénicos del bacilo tuberculoso o tal vez se trate de una reacción cruzada.

## CONCLUSIONES

1.- De acuerdo a los diferentes ensayos para la estandarización de cada una de las técnicas, se establecieron las condiciones óptimas para el desarrollo de las mismas.

Para el caso del ELISA indirecto amplificado con los 2 extractos antigénicos se utilizan las siguientes condiciones: 10 µg/ml de cada extracto proteico para sensibilizar cada uno de los pozos, se incuba durante 18 hrs en refrigeración, se bloquean los sitios inactivos, se agrega la muestra a una dilución 1:10, se lava, se adiciona el conjugado anti IgG-humana-Biotina a una dilución 1:500, después se agrega el complejo extravidina-peroxidasa y finalmente se adiciona el sustrato para poner en evidencia la reacción colorida. Para el ELISA directo fué necesario emplear una curva estándar con concentraciones conocidas de antígeno soluble (1-1000 ng/ml) que fueron detectados por un anticuerpo de cobertura (anti-BCG) adsorbido a los pozos de las placas de poliestireno a una concentración de 10 µg/ml y a su vez por un segundo anticuerpo marcado con enzima (anti-BCG-peroxidasa) a una dilución 1:100 para que por último al adicionar el sustrato se manifestara la reacción. Las muestras de LCR se utilizaron a una dilución 1:10.

2.- Por medio de un ensayo de ELISA directo se analizaron los diferentes grupos de estudio y la mínima cantidad de antígeno soluble (BCG) que detecta fué de 5 ng/ml.

La sensibilidad de la prueba fué del 20.83% mientras que la especificidad fué del 100, 100, 100 y 96.6% para los grupos testigo, meningitis desconocida, cisticercosis y meningitis piógena respectivamente. Por lo tanto, no ofrece características favorables para ser aceptado como técnica rutinaria de diagnóstico.

3.- Con ayuda del ELISA indirecto se detectaron anticuerpos específicos anti-micobacterias de clase IgG presentes en los LCR, sin embargo se presentaron algunas reacciones falsas positivas en casos no tuberculosis como por ejemplo en casos de pacientes con cisticercosis o bien con meningitis bacteriana. La sensibilidad del ELISA indirecto amplificado-ESBCG fué de 91.66%, y la especificidad frente a los otros grupos no tuberculosis fué de 100, 100, 86.6%, y 89.65% (para los grupos testigo con transtornos neurológicos no infecciosos, con meningitis no especificada, con cisticercosis y con meningitis bacteriana respectivamente). Para el ELISA indirecto amplificado-ESMTB la sensibilidad fué del 95.83% y la especificidad con respecto a los otros grupos no tuberculosis fué de 100, 100, 93.54%, y 90% (para los grupos testigo con transtornos neurológicos no infecciosos, con meningitis no especificada, con cisticercosis y con meningitis bacteriana respectivamente).

4.- Los resultados indican que el método que clasifica mejor a las muestras es el ELISA indirecto amplificado con extracto soluble de *Mycobacterium tuberculosis*. En general el desarrollo de la prueba es rápido, se lleva a cabo en 1 día y la cantidad de líquido cefalorraquídeo es poca (200 µl aproximadamente) para hacer la determinación de anticuerpos IgG anti-*M.tuberculosis*. Los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba se consideran adecuados para ser un método de elección en el diagnóstico de la meningitis tuberculosa.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1) Ashtekar M.D., Dhalla A.S., Mazarello T.B. and Samuel A.M.; A study of *Mycobacterium tuberculosis* antigen and antibody in cerebrospinal fluid and blood in tuberculous meningitis. Clin Immunol Immunopathol, 1987, 47:29-34.
- 2) Chandramuki A., Allen P.R.J., Keen M. and Ivany J., Detection of mycobacterial antigens and antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis. J Med Microbiol; 1985, 20:239-245.
- 3) Farga Victorino; Tuberculosis, Editorial Mediterráneo, Segunda Edición, Santiago, Chile, 1992.
- 4) Kadival G.V., Mazarello T.B., and Chaparas S.D., Sensitivity and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay in the detection of antigen in tuberculous meningitis in cerebrospinal fluid, Journal of Microbiology, 1986, 23:5, 901-904.
- 5) Kalish S., Radin R.C., Levitz D., Zaiss R., and Phair J. P., The enzyme linked immunosorbent assay method for detection of IgG antibody to purified protein derived in cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis. Annal of Internal Medicine, 1983, 99:630-633.
- 6) Kinnman A.J., Fryden A., Eriksson S., And Link H., Tuberculous meningitis:immune reactions within the central nervous system., Scand J Immunol, 1981, 13:289-296.
- 7) Sada E., Ruiz Palacios G., López V.Y., and Ponce de León S., Detection of mycobacterial antigens in cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis by enzyme linked immunosorbent assay. Lancet, 1983, 11:651-652.

- 8) Samuel A.M., Kadival G.V., Irani S., and Ganatra R.D., A sensitive and specific method for diagnosis of tuberculous meningitis., *Indian J Med Res.*: 1985, 77:752-757.
- 9) Watt G., Zaraspe G., Bautista S., and Laughlin L. W., Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by using an enzyme linked immunosorbent assay to detect mycobacterial antigens and antibodies in cerebrospinal fluid. *J Infect Dis.*, 1988, 158:681-685.
- 10) Wu Ch., Fann M.C., and Lau Y.J., Detection of mycobacterial antigens in cerebrospinal fluid by enzyme linked immunosorbent assay. *Tubercle*, 1989, 70:37-47.
- 11) Quesada Pascual F., Diagnóstico inmunológico de la tuberculosis. *Revista de Salud Pública de México*, 1983, 25:6, 601-611.
- 12) Del Villar J.P., González S. N., Hernández P. M., y Castañeda N. J.L. Meningoencefalitis tuberculosa, *Infectología Clínica*, Editorial Trillas, 4a. edición, México D.F., 1988, capítulo 10.
- 13) Kennedy D.H. and Fallon R. J., Tuberculous meningitis, *JAMA*, 1979, 241(3): 345-352.
- 14) Díaz Chazaro J. Meningitis tuberculosa, Tesis de Especialidad, Hospital La Raza. IMSS, México D.F; 1958.
- 15) Maniar P. and Joshi L., ELISA: Its evaluation in diagnosis of tuberculous meningitis. *Indian J. Pediatrics*, 1990, 57:667-672.
- 16) Grange J.M., New approaches to the diagnosis of tuberculosis in childhood with special reference to neurotuberculosis. *Indian J. Pediatrics*, 1990, 57:639-644.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- 17) Wagle N., Vaidya A., Joshi S., and Merchant S.M., Detection of tubercule antigen in cerebrospinal fluids by ELISA for diagnosis of tuberculous meningitis. Indian J. Pediatrics, 1990, 57:679-683.
- 18) Guedson J.L., TERNYNCK T., and Avrameas S., The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. Journal of histochemistry and citochemistry, 1979, 27 (8):1131-1139.
- 19) Gupta S.K., Sanghi S., Sharma U., and Raman S., Precipitation test a rapid method for diagnosis of tuberculous meningitis. Indian Pediatrics, 1990, 27 (11):1183-1186.
- 20) Radhakrishnan V.V., Shegal S., and Mathai A., Correlation between culture of *Mycobacterim tuberculosis* and detection of micobacterial antigens in cerebrospinal fluids of patients with tuberculous meningitis. J Med Microbiol, 1990, 33(4):223-226.
- 21) Wagle N.M. and Vaidya A. K., Diagnosis of neurotuberculosis, Indian J Pediatrics, 1990, 57(5):657-666.
- 22) Gherghiu M., The role of BCG vaccine in tuberculosis control, Indian J Pediatrics, 1990, 57(5):651-655.
- 23) Vernal P, Param T., Casar C., y Topelberg S., Meningitis Tuberculosa, Rev Chil Pediatr., 1986, 57(3):255-259.
- 24) Krambovits E., Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by latex particle agglutination., Lancet, 1984, 45:554-557.
- 25) Kalish S.B., Radin R.C., Levitz D., and Zeiss C.R., Use of an Enzyme-Linked Immunosorbent assay technique in differential diagnosis of active pulmonary tuberculosis in humans., J Infec Dis, 1983, 147(3):523-530.

- 26) Istrup D.M. Statistical Methods in Microbiology, *Clinical Microbiology Reviews*, 1990, 3(3):219-226.
- 27) Chandramuki A., Bothamley G. H., Brennan P., and Ivanyi J., Levels of antibody to defined antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculous meningitis, *J Clin Microbiol*, 1989, 27:821-825.
- 28) McNaughton M, Stollerman G., Disseminated tuberculosis: A presumptive diagnosis, *Hospital Practice*, December, 1995, 63-70.
- 29) Torres M., Díaz H., Herrera T., and Sada E., Evaluation of enzyme linked immunosorbent assay and western blot for diagnosis of histoplasmosis, *Rev Inv Clin*, 1993, 45:155-160.
- 30) Bal V., Kamat R.S., and Kandoth P., Enzyme linked immunosorbent assay for mycobacterial antigens, *Indian J Med Res*, 1983, 78:477-483.
- 31) Hernández R., Muñoz O., and Guiscafe H., Sensitive enzyme immunoassay for early diagnosis of tuberculous meningitis, *J Clin Microbiol*, 20: 533-535.
- 32) Barriga A.G., Carreón V. E., Ruiz S. D., Meningoencefalitis: presentación de 500 casos comprobados bacteriológicamente., *Rev Med IMSS*, 1979, 18:517-522.
- 33) Del Villar P.J., Choperena J., Secuelas neurológicas de la meningoencefalitis tuberculosa., IV Congreso Internacional de infectología, Centro Médico Nacional, IMSS, 1979.
- 34) Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud, Boletín Número 20, volumen 12, semana 45 del 5 al 11 de noviembre de 1995.

- 35) Cousins D. V., Wilton S. D., Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis, *J Clin Microbiology*, 1992, 30:255-258.
- 36) Schluger N.W., and Condos R., Amplification of DNA of *Mycobacterium tuberculosis* from peripheral blood patients with pulmonary tuberculosis, *The Lancet*, 1994, 344:232-233.
- 37) Noordhoek G. T., and Kolk A. H., Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories, *J Clin Microbiol*, 1994, 32:277-284.
- 38) Kox L.F.F., A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples, *J Clin Microbiol*, 1994, 32:672-678.
- 39) Young R.A., Stress proteins in immunology, *Annu. Rev. Immunol.*, 1990, 8:401-420.
- 40) Espitia C.I., Los antígenos inmunodominantes de *Mycobacterium tuberculosis* son glicoproteínas, Jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, 1993, 359-368.
- 41) Sada D.E., Ferguson L.E., Daniel T.M., An ELISA for the serodiagnosis of tuberculosis using a 30 000 Da native antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, *J Infect Dis*, 1990, 162 :928-931.
- 42) Kumate J., Manual de Infectología, 11a. edición, México D.F., 1987, páginas 240-241.
- 43) Escobar G. A., Hipersensibilidad, 1995, artículo en revisión.

44) Kovacs E. J., Fibrogenic cytokines : the role of immune mediators in the development of scar tissue, *Immunol Today*, 1991, 12(1), 17-23.

45) Dannenberg A. M., Delayed type hypersensitivity and cell mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology Today*, 1991, 12(7) : 228-233.

46) Daniel T.M., Ellner J.J., Tuberculosis : A comprehensive International Approach, Chapter 4 : Immunology of tuberculosis, 1993, 75-101.