

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE TECNOLOGIA MEDICA – LABORATORIO CLINICO



**ANTICUERPOS FLUORESCENTES PARA UN DIAGNOSTICO  
RAPIDO DE MENINGITIS MENINGOCOCICA**

SEMINARIO DE GRADUACION

PRESENTADO POR:

EV A GUADALUPE ZELAYA OSEGUEDA

MARIBEL BERENA ULLOA SANCHEZ

*PREVIA OPCION AL TITULO DE  
LICENCIADA EN LABORATORIO CLINICO*

ASESOR  
T.M. JAIME SOUNDY CALL



*Septiembre de 1985.*

T  
16.82  
-49a



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE TECNOLOGIA MEDICA - LABORATORIO CLINICO

" ANTICUERPOS FLUORESCENTES PARA UN DIAGNOSTICO  
RAPIDO DE MENINGITIS MENINGOCOCICA "

POR : MARIBEL BERENA ULLOA SANCHEZ  
EVA GUADALUPE ZELAYA OSEGUEDA

SEMINARIO PRESENTADO ANTE EL JURADO CALIFICADOR DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE EL  
SALVADOR EN SATISFACCION PARCIAL DE LOS REQUERIMIENTOS  
PREVIOS A LA OPCION DEL TITULO DE LICENCIADA EN LABO-  
RATORIO CLINICO.

SEPTIEMBRE 1985

SAN SALVADOR EL SALVADOR CENTRO AMERICA

## AGRADECIMIENTOS

AL SEÑOR T.M. JAIME SOUNDY CALL

Quien fuera nuestro guía y compañero de esfuerzos, sin cuya colaboración y dirección no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A LOS MIEMBROS DEL JURADO CALIFICADOR

Dres. Isabel Murillo de Linares, Carlos Flores y Efraín Mena, por su desinteresada colaboración en la revisión y corrección de este seminario.

Al personal de la sección de Bacteriología de los Hospitales Rosales y Benjamín Bloom.

Quienes de una manera u otra hicieron un valioso aporte para el desarrollo de este trabajo.

MARIBEL B. ULLOA

EVA G. ZELAYA

DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO

LA LUZ DE MI CAMINO Y POR CUYA VOLUNTAD  
HE ALCANZADO ESTA META.

A MI MADRE

POR SUS DESVELOS, ESFUERZOS Y SACRIFICIOS  
QUE ME LLEVARON A LA CONSECUION  
DE UN IDEAL SUYO Y MIO.

A MI ESPOSO E HIJA

POR SU AMOR Y PACIENCIA DURANTE LA REALIZACION  
DE ESTE TRABAJO

A TODAS LAS PERSONAS QUE DESINTERESADAMENTE  
ME BRINDARON SU COLABORACION Y ME  
ALLANARON EL CAMINO PARA HA-  
CER LA TAREA MAS FACIL.

EVA GUADALUPE

D E D I C A T O R I A

A DIOS NUESTRO SEÑOR  
CON INFINITA FE

A MI MADRE POR SU ABNEGACION,  
AMOR Y COMPRENSION.

A MIS HERMANOS Y HERMANAS  
CON CARÍÑO Y GRATITUD POR  
AYUDARME A CORONAR MI  
IDEAL.

MARIBEL BERENA

" ANTICUERPOS FLUORESCENTES PARA UN DIAGNOSTICO  
RAPIDO DE MININGITIS MENINGOCOCICA "

# I N D I C E

	<u>Página</u>
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS DEL TRABAJO	5
MATERIALES Y METODOS	6
RESULTADOS	16
DISCUSION	26
CONCLUSIONES	31
APENDICE	32
BIBLIOGRAFIA	37

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

El encéfalo y la médula espinal, partes vitales del sistema nervioso central, se encuentran protegidos contra las injurias de diversa índole por tres sistemas bien definidos: - tres membranas delgadas unidas muy estrechamente llamadas meninges, el líquido cefalorraquídeo (L.C.R.) que actúa como - amortiguador y, la barrera hematoencefálica.

El líquido cefalorraquídeo es producido en los plexos coroideos (pelotones de capilares de los ventrículos cerebrales) como resultado de la filtración del plasma sanguíneo, cuyo - proceso es regulado activamente por las células de revestimiento de dichos plexos que vienen a conformar lo que se conoce - como barrera hematoencefálica, supuesta a ser impenetrable por los agentes microbianos, ciertos cristaloides, antibióticos, - etc. Durante procesos inflamatorios se altera la función primaria de estas células de revestimiento y la barrera hematoencefálica pierde su permeabilidad selectiva y permite el paso de microorganismos, proteínas de alto peso molecular, toxinas, metabolitos, etc. hacia el espacio subaracnoideo, de aquí que, - en condiciones patológicas el L.C.R. sufre alteraciones en sus características físicas y composición citoquímica normal que - se reflejan en diversas manifestaciones neurológicas que acompañan y/o caracterizan este tipo de patologías. Cuando el proceso inflamatorio alcanza las meninges, el estado se denomina meningitis y si la respuesta inflamatoria se debe a una infección bacteriana se denomina entonces meningitis bacteriana.

Las meningitis bacterianas se clasifican como:

- a) Meningitis primarias, cuando el proceso patológico que - sigue a la infección se localiza primariamente en las meninges.
- b) Meningitis secundarias, cuando el proceso patológico derivado de la infección se inicia en otra parte del orga-

nismo de donde parte hacia las meninges por vía hemática o linfática (4).

Característicamente se ha observado que las meningitis primarias son producidas en su mayoría por cocos grampositivos o cocos gramnegativos; las secundarias en cambio, tienen como agente etiológico bacilos gramnegativos entéricos y otras bacterias menos comunes (4). Se ha demostrado que las principales especies bacterianas que intervienen en las meningitis primarias son: Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis y Haemophilus influenzae tipo b (4,9)

La Neisseria meningitidis es un coco gramnegativo inmóvil, que no forma esporas y generalmente se agrupa en parejas. Son organismos de tamaño pequeño (0.6-0.8 m) que pueden adoptar formas atípicas por procesos de autólisis parcial. Están recubiertas de una pared celular constituida por una capa densa y por fuera de ésta generalmente se encuentra una cápsula constituida básicamente por polisacáridos que son específicos de grupo por lo que son usados para la clasificación de estos microorganismos (10). Serológicamente los meningococos han sido clasificados en grupos A, B, C, X, Y y Z. Recientemente se ha aislado un nuevo serogrupo que ha sido clasificado como grupo L; todos ellos, exceptuando los grupos B y D, producen un polisacárido capsular que es el antígeno responsable para la especificidad de grupo (16,25).

Las Neisserias patógenas son bacterias relativamente difíciles de cultivar en el laboratorio porque son muy sensibles a la desecación, a las variaciones de temperatura, a los agentes físicos y químicos e incluso a trazas de metales que estuviesen presentes en el agar de cultivo o caldo de peptona. Su crecimiento se ve estimulado por una atmósfera del 5 al 10% de CO<sub>2</sub> y por la adición de suero o sangre a los medios de cultivo simples (10).

En el huésped, el meningococo infectante se aloja primariamente en la nasofaringe, donde se reproduce y de donde par-

te hacia la sangre produciéndose una fase de bacteremia después de la cual ocurre la meningitis purulenta aguda. Casi mundialmente la meningitis meningocócica ha demostrado la tendencia de presentarse como brotes epidémicos y se les considera casos prioritarios pues son muy transmisibles, de ahí que es necesario el rastreo de contactos y el tratamiento preventivo de los mismos para evitar una expansión abrupta de la enfermedad la cual en el quinquenio 78-82 alcanzó en nuestro país una tasa de mortalidad del 10% (23).

Ya que la debida y oportuna terapia antimicrobiana es lo más importante para la resolución satisfactoria de los casos, se hace necesaria la identificación rápida y segura del agente etiológico. Debido a ésto se han diseñado con este propósito pruebas que se basan en técnicas cromatográficas, de radioinmunoensayo, contrainmunolectroforesis y de anticuerpos fluorescentes para la identificación de diversos agentes bacterianos. De entre todos estos sistemas se prefirió la inmunofluorescencia para realizar esta investigación porque contamos con la metodología, los materiales y el equipo necesarios, así como con la experiencia de personas que la practican en el país.

En el pasado se han llevado a cabo investigaciones sobre la efectividad de las pruebas de anticuerpos fluorescentes para identificar bacterias como : Streptococcus del grupo A, - Pasteurella pestis, Escherichia coli enteropatógenas, Treponema pallidum, Haemophilus pertussis, Neisseria gonorrhoeae, - Corynebacterium diphtheriae , Salmonella typhi y Shigellas, - Listeria monocytogenes, Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae y Neisseria meningitidis (8) . Por ejemplo, Metzger y Smith produjeron reactivos para la identificación de Neisseria meningitidis por medio de la inmunofluorescencia y aunque ellos no aplicaron sus conjugados y técnicas a problemas diagnósticos clínicos, se impresionaron con el valor potencial de la inmunofluorescencia para el diagnóstico rápido

y específico de meningitis agudas causadas por meningococcus, neumococos y Haemophilus influenzae (8). Grossman y colaboradores reportaron en 1964 que los conjugados para H. influenzae y N. meningitidis que manejaron mostraron excelente potencia y especificidad. La mayoría de reacciones cruzadas fueron obtenidas con N. gonorrhoeae y N. catarrhalis (recientemente ubicada en el género Branhamella) ninguna de las cuales puede ser importante en el L.C.R. Ellos no obtuvieron mucha correlación entre la tinción de AF y los cultivos en el sentido de que ni la tinción de Gram ni la tinción de AF fueron tan sensibles como los cultivos para la detección de los meningococos o H. influenzae (8,9). Page y colaboradores obtuvieron una correlación mucho mayor entre la tinción de AF y los cultivos para H. influenzae (8). Los resultados de Biegeleisen y colaboradores, en el gran número de casos que estudiaron, indican muy buena correlación entre AF y cultivos, y probaron que la técnica es altamente sensible para la identificación de los organismos con los que trabajaron (meningococo, neumococo y H. influenzae tipo b) y que además tiene la virtud de permitir la detección de células bacterianas inhibidas o muertas por las drogas (2).

Tomando como punto de apoyo los prometedores resultados de estos estudios previos, producimos en nuestro laboratorio los antisueros conjugados para montar y evaluar en cuanto a especificidad y sensibilidad, una prueba de inmunofluorescencia directa para la identificación y clasificación serológica de la Neisseria meningitidis en el L.C.R. (o en el sedimento del mismo) de pacientes con diagnóstico presuntivo de meningitis bacteriana.

## OBJETIVOS DEL TRABAJO

El presente estudio tiene por objeto producir en el laboratorio antisueros para *Neisseria meningitidis* enlazados a material fluorescente (antisueros conjugados). Los conjugados se usaron en una prueba directa de anticuerpos fluorescentes para identificar y clasificar los meningococos en el extendido o el sedimento del L.C.R. También se evaluó la bondad de la prueba por medio de la comparación de los resultados obtenidos con la AF con los que proveen los métodos de uso rutinario para la identificación como el frotis directo coloreado por Gram y cultivo.

También se estudió la habilidad del conjugado para reaccionar específicamente con la bacteria en cuestión, eliminando en lo posible las reacciones cruzadas entre los distintos serogrupos, así como con otras bacterias, de manera que pudiera ser usada con cierto grado de confianza para identificación y clasificación.

## MATERIALES Y METODOS

### Población Estudiada:

Se estudiaron 100 muestras de líquido cefalorraquídeo (L.C.R.) obtenidas por punción lumbar practicada a 88 pacientes con diagnóstico presuntivo de meningitis bacteriana en diferentes instituciones de salud del país (Hospital Rosales, Hospital de Niños Benjamín Bloom, Hospital de Maternidad, Hospital San Rafael y Hospital Centro Ginecológico). Todas las muestras de L.C.R. fueron tomadas por un médico y distribuidas en dos frascos estériles que fueron llevadas al Laboratorio y sometidas a un estudio físico, citoquímico, bacteriológico y de inmunofluorescencia. Este trabajo se realizó en el período comprendido entre Enero de 1984 y Abril de 1985.

Para llevar a cabo el presente estudio se utilizaron los siguientes materiales y reactivos, que incluyen aquellos que pueden ser obtenidos comercialmente así como los que fueron preparados en nuestro laboratorio:

- Cepas patrón de Neisseria meningitidis obtenidas de aislamientos de muestras de L.C.R.
- Sueros hiperinmunes de conejos contra los antígenos específicos de cada serogrupo, producidos en nuestro laboratorio.
- Isotiocianato de fluoresceína (E. Merck Art. 24546)
- Microscopio de luz ultravioleta con filtro OG1 + BG12 + barredor amarillo.
- Muestras de L.C.R. de pacientes con sospecha de meningitis bacteriana.
- Láminas portaobjeto (menos de 1 mm de espesor) con círculos de aproximadamente 7 mm de diámetro marcadas con lápiz de diamante; laminillas cubreobjeto (22 x 22 mm).
- Medios de cultivo: agar sangre, agar chocolate, caldo de tioglicolato y caldo de tripticasa soya.

- Antisueros hiperinmunes para tippo por aglutinación en lámina de Neisseria meningitidis de los grupos A, B y C (Grupo A Art. 2228-50, Grupo B Art. 2229-50, Grupo C Art. 2230-50, DIFCO).
- Cámara húmeda (para uso en el procedimiento de coloración por anticuerpos fluorescentes).
- Solución de montaje para láminas coloreadas para inmunofluorescencia.
- Aceite de inmersión de baja fluorescencia, de preferencia grado A.
- Columna de Sephadex G-50 (para la separación de las globulinas conjugadas con el material fluorescente).
- Colorantes para la tinción de Gram .
- Reactivo de Nessler.
- Azul de Evans al 0.005%.
- Acetona pura.
- Agua destilada.
- Solución saturada de sulfato de amonio.
- Timerosal 1:10000 (preservador).
- Anhídrido carbónico gaseoso.
- Jeringas descartables de diversa capacidad con aguja - Nº 25 para el procedimiento de inmunización de los conejos.
- Cristalería como: erlenmeyers de 500 y 125 ml, pipetas serológicas de 5 y/o 10 ml, tubos cónicos plásticos o de vidrio (graduados), pipetas Pasteur estériles, probeta plástica graduada a 100 ml, etc.

#### Preparación del Antígeno:

Se utilizó una cepa fresca que tuviera menos de 24 horas de crecimiento con la cual se preparó una suspensión bacteriana de turbidez comparable con la de un tubo patrón McFarland Nº 3. La suspensión se preparó recogiendo el crecimiento puro comprobado de Neisseria meningitidis obtenido en dos placas de agar sangre o agar chocolate, e inoculándolo en 45 ml

de caldo de tripticasa soya. De esta suspensión se tomaron - aproximadamente 25 ml y se trasladaron a un tubo estéril con tapón de rosca y éste es el volumen que se sometió al procedimiento de criólisis, el cual es un simple procedimiento de congelaciones y descongelaciones repetidas que da por resultado la lisis bacteriana sin alteraciones en la estructura - antigénica, la cual sí se ve afectada por el calor o las sustancias químicas. La suspensión bacteriana fue congelada con una mezcla de CO<sub>2</sub> en cubos que se agregaron al recipiente que contenía acetona pura y donde estaba colocado el tubo con dicha suspensión; después de congelada la muestra inmediatamente fue descongelada en un baño de agua de chorro (a temperatura ambiente), procedimiento que se verificó por cinco veces - consecutivas. La suspensión criolizada fue preservada de la contaminación agregándole timerosal al 1:10000. Para comprobar si la bacteria está muerta después de haber sido sometida a este tratamiento, se realizó una prueba de viabilidad de la misma, la cual consiste en sembrar una alícuota de la suspensión criolizada en una placa de agar sangre o agar chocolate que se incubaba a 37°C a una atmósfera del 10% de CO<sub>2</sub>. Si a las 24 horas se observa crecimiento ésto nos indica que la suspensión todavía tiene bacterias vivas y debe repetirse el procedimiento de criólisis; en cambio, si no hay crecimiento significa que la bacteria está muerta e inmediatamente se procede a la inmunización del conejo.

#### Esquema de Inmunización:

Se utilizó un conejo adulto joven (2-3 meses) de 3 - 3.5 kg de peso que fue inoculado en una vena marginal de la oreja.

Día de inoculación	1	4	8	12	16
Volumen inoculado	0.5 ml	2 ml	2 ml	3 ml	4 ml

Una semana después de la última inoculación, se realizó un sangrado de prueba para ver qué título de anticuerpo aglutinantes se ha alcanzado hasta ese momento, para la cual se obtuvieron 2 ml de sangre completa (sin anticoagulante) a partir de una vena periférica de la oreja (usando aguja N° 21), que se centrifugó para obtener el suero, del cual se prepararon diluciones seriadas 1:2 hasta 1:32, luego se realizó una prueba de aglutinación en lámina (utilizando la cepa homóloga) y se tomó como título aquella dilución en la que todavía se observó una reacción franca. Si el título de anticuerpos aglutinantes es muy bajo (menor de 1:8) es necesario repetir el esquema hasta obtener un título aceptable y habiéndolo alcanzado, se procede a la obtención del mayor volumen posible de sangre del animal. La sangre se extrajo por punción directa al corazón, utilizando una jeringa de 50 ml, usando aguja N° 18 estéril; esta sangre se depositó en 4 tubos pyrex (capacidad 15 ml), tapón de hule, siliconados, estériles y se guardó en refrigeración durante toda una noche para obtener una mayor cantidad de suero, el cual una vez separado fue repartido en 4 tubos estériles conteniendo alícuotas de aproximadamente 8 ml; 3 de ellos fueron almacenados a -80°C para su conservación y uno se utilizó para la determinación de las proteínas totales, albúminas y globulinas, siendo este último dato el más importante pues en base a él se calcula la cantidad de material fluorescente con que debe ser conjugado el suero. El Cuadro I contiene los resultados de las determinaciones del contenido proteico (total y fracciones) según el método de Biuret, de los 3 antisueros producidos.

### Conjugación del Antisuero con Isotiocianato de Fluoresceína

#### a) Preparación del concentrado globulínico.

El fraccionamiento del suero de conejo con sulfato de amonio, tradicionalmente es hecho mezclando volúmenes iguales de suero y una solución saturada de la sal o una

apropiada dilución de la solución saturada para producir una concentración final del 40 al 50%. Cuando la concentración final es del 50% se obtiene un mayor rendimiento de globulinas pero el precipitado contiene una cantidad apreciable de albúmina. Cuando la concentración final es del 40% se obtiene un rendimiento más bajo de globulinas altamente purificadas sin la albúmina contaminante. Estudios recientes han demostrado que la albúmina tiene una marcada afinidad por el isotiocianato de fluoresceína; por lo tanto, la fluoresceína conjugada a la llamada "fracción globulínica" de un suero precipitado con sulfato de amonio al 50% podría contener una cantidad apreciable de albúmina conjugada. Este material puede causar una considerable tinción no específica (19).

#### Procedimiento:

1. En un erlenmeyer de 125 ml se prepara una dilución 1:10 de 5 ml de suero puro, utilizando agua destilada y obteniendo un volumen final de 50 ml.
2. Con movimiento rotatorio del frasco y poco a poco (para que la precipitación sea homogénea) agregarle a esta dilución 34 ml de solución saturada de sulfato de amonio. Mezclar perfectamente, tapar con papel y dejar en reposo durante una hora a temperatura ambiente.
3. Centrifugar la solución en 2 tubos cónicos de 50 ml de plástico a 5.000 rpm por 20 minutos. Remover el sobrenadante con una pipeta pasteur.
4. Reconstituido el sedimento con agua destilada al volumen inicial que se obtuvo del suero diluido (50 ml) y repetir los numerales 2 y 3. El sedimento obtenido debe ser reconstituido utilizando en esta ultima fase buffer fosfato salino. Agregar de nuevo 34 ml de sulfato de amonio y poco a poco con movimiento rotatorio mezclar bien, tapar y dejar en reposo durante una hora a tempe

ratura ambiente.

5. Centrifugar en 2 tubos cónicos de 50 ml a 5.000 rpm - durante 20 minutos y luego remover el sobrenadante con una pipeta Pasteur.
6. Pasar con lavado químico (con unas gotas de buffer fosfato salino) el sedimento de un tubo al otro tubo y reconstituir el sedimento total a la mitad (2.5 ml) - del volumen inicial del suero puro procesado, utilizando siempre el buffer fosfato salino.

Hasta este punto el concentrado globulínico contiene sulfato de amonio a una concentración tal que no hay riesgo de contaminación, pero este concentrado globulínico debe ser sometido a un proceso de diálisis para eliminar el sulfato de amonio que contiene. El concentrado globulínico es trasladado a un saco de diálisis (que fue probado previamente que no poseía agujeros) el cual es anudado en ambos extremos y colocado en un erlenmeyer de 500 ml contra un volumen grande de buffer fosfato salino, manteniéndolo así durante por lo menos una hora. Cuando se ha cambiado el buffer fosfato salino por lo menos 3 veces (a intervalos de una hora) se prueba la presencia de sulfato de amonio en el líquido agregando unas gotitas de reactivo de Nessler a un volumen pequeño de buffer fosfato salino de diálisis; si se observa un color amarillo ladrillo en el buffer esto nos indica que todavía hay sulfato de amonio en el concentrado globulínico, entonces se continúa con el proceso de diálisis hasta lograr que la reacción sea negativa (19).

Una vez eliminado el sulfato de amonio, sí hay peligro de contaminación y si no se puede llevar a cabo la conjugación el mismo día, se puede guardar el concentrado globulínico dentro del saco de diálisis en un recipiente estéril en refrigeración y el día siguiente verificar la conjugación.

b) Preparación del Conjugado

En este caso para calcular la cantidad de isotiocianato de fluoresceína (FITC), se usó la relación de 0.025 mg FITC/mg de proteína .

Pesar en balanza analítica la cantidad correspondiente de fluoresceína. Preparar 5 mls de un buffer carbonato bicarbonato de la siguiente forma: en un tubo de ensayo poner 2.5 ml de solución de carbonato de sodio 0.5 M., - y agregar 2.5 ml de solución de bicarbonato de sodio - 0.5 M, mezclar bien. Esta solución nos dará un pH aproximado de 9 - 9.5, que es el más adecuado para la reacción porque a este rango de pH es mayor la afinidad del isotiocianato de fluoresceína por las proteínas.

Procedimiento:

1. Poner en un erlenmeyer de 125 ml 0.5 ml del buffer anteriormente preparado.
2. Agregar gota a gota los 2.5 ml del concentrado globulínico (lo que estaba en el saco de diálisis).
3. Lavar el saco de diálisis con 0.5 ml de buffer y agregarlo a la mezcla.
4. Disolver la fluoresceína en 0.5 ml de buffer y agregarlo a la mezcla.
5. Finalmente agregar 1 ml de buffer para completar 5 ml que corresponden al volumen de suero puro trabajado.
6. Mezclar bien, tapar con papel y dejar en reposo en la oscuridad a temperatura ambiente por dos horas.

c) Separación del material fluorescente no conjugado

Antes de usar la columna de Sephadex G-50 (PHARMACIA - Uppsala-Sweden), debe ser lavada tres veces con buffer fosfato salino. El Sephadex es un dextran modificado, inerte, con esfera hueca y poros calibrados, sin afini-

dad por ningún antígeno o anticuerpo y sin carga eléctrica alguna; por estos poros pasan moléculas de fluoresceína no conjugada permitiendo así la separación de fluoresceína conjugada (19).

Cuando se cumplen las dos horas de reacción, pasar la mezcla por la columna de Sephadex, de la cual se obtendrán tres soluciones diferentes que se colectarán en tres tubos identificados como 1, 2 y 3, siendo la solución 2 el antisuero conjugado que se utilizará para la coloración de muestras de L.C.R. por anticuerpos fluorescentes.

#### Técnica para Coloración por Anticuerpos Fluorescentes:

Se utilizaron frotis de L.C.R. de pacientes con sospecha de meningitis bacteriana, hechos en lámina porta-objeto marcadas con círculos. El objeto de estos círculos es delimitar el área donde ha sido colocada la muestra (antígeno). Se utilizaron también láminas control, impregnadas con suspensión ligera de neisserias preparadas con buffer fosfato salino de los serogrupos correspondientes.

Si el L.C.R. está turbio no es necesario centrifugarlo, pero si está transparente debe centrifugarse para una mayor concentración de las posibles bacterias presentes y por lo tanto mayor oportunidad de encontrarlas en la preparación.

Tomando en cuenta que aparecen residuos o elementos indeseables en las muestras, así como restos de medios del cultivo que se pudieran haber arrastrado con el crecimiento bacteriano con el que se prepararon las suspensiones para los extendidos control, y que estos elementos pueden dar lugar a interferencias en la lectura de las láminas coloreadas, debe llevarse a cabo un lavado previo de las láminas a colorear introduciéndolas en buffer fosfato salino durante cinco minutos. Después de transcurrido este tiempo, se secan al aire a temperatura ambiente y ya están listas para tratarse con el conjugado inmunofluorescente.

**Procedimiento:**

1. Dejar secar los frotis a temperatura ambiente y luego fijarlos suavemente al calor (mechero). Esto es muy importante tomarlo en cuenta, porque si la fijación se hace con calor fuerte pueden destruirse las bacterias y obtener resultados falsos negativos.
2. Preparar una dilución de trabajo del antisuero conjugado agregándole una solución de azul de Evans al 0.005%, de acuerdo al título de anticuerpos correspondientes al conjugado.
3. Colocar en cámara húmeda las láminas (controles y muestra) y cubrir los frotis con el antisuero conjugado correspondiente a cada lámina. Dejar en reposo a 37°C por 30 minutos y en la oscuridad.
4. Lavar las láminas 3 veces con buffer fosfato salino durante diez minutos cada vez.
5. Dejar secar al aire libre y en posición vertical y montar entre lámina y laminilla con solución de montaje y observar en el microscopio de fluorescencia, utilizando para su observación aceite de inmersión de baja fluorescencia (Cargille inmersión oil type LF, índice de refracción 1.515, American Optical N° 6140).

**Observaciones:**

- a) En el proceso de "coloración", cuando se coloca la gota del antisuero conjugado sobre los frotis a colorear, debe tenerse mucho cuidado que ésta no se esparza sobre la lámina sino que quede dentro del círculo marcado en la misma para que no queden partes secas en el lugar donde se encuentra el frotis (antígeno), con el objeto de obtener una buena "coloración".
- b) El objeto de colocar las láminas durante el proceso de coloración en una cámara húmeda, es evitar la desecación

del antisuero conjugado sobre los frotis, lo cual dá por resultado una mala coloración que conduce a interpretaciones erróneas.

- c) Cada vez que se prepare el buffer fosfato salino es bien importante tomarle el pH. Con un pH inadecuado, se corre el riesgo de echar a perder las láminas coloreadas.

#### Titulación del Antisuero Conjugado

Preparar con buffer fosfato salino una suspensión bacteriana que no contenga demasiados microorganismos de la cepa a ensayar que puede ser de cualquiera de los serogrupos aislados. De ésta se hace un frotis en lámina. Al mismo tiempo, hacer diluciones del antisuero conjugado correspondiente 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32 (usando como factor de dilución 2).

Dejar secar las láminas al aire libre y fijarlas para luego colorearlas por la técnica de anticuerpos fluorescentes descrita. Se establecieron patrones de reacción calificados como positivos 4+, 3+, 2+ y 1+ (dudoso) y negativo para determinar el título de anticuerpos fluorescentes. La mayor dilución que todavía da una reacción positiva 4+ es el título del antisuero conjugado. Los resultados obtenidos para los diferentes antisueros se detallan en el Cuadro II. En el caso del grupo B no se cumplió la positividad 4+ sino que fue de 3+ hasta llegar a 2+.

#### Especificidad del Antisuero Conjugado.

Para comprobar si el antisuero no conjugado y conjugado es específico y no presenta reacciones cruzadas con otras bacterias, se realizaron pruebas de aglutinación en lámina y coloraciones por anticuerpos fluorescentes con aquellas bacterias que se encuentran frecuentemente en L.C.R. como son: Streptococcus pneumoniae, Haemophilus sp., Staphylococcus aureus (coagulasa +) así como bacterias de su mismo género como Neisseria gonorrhoeae.

## R E S U L T A D O S

Se estudiaron 100 muestras obtenidas de 88 pacientes, - de las cuales 43 resultaron positivas por cultivo a diferentes especies bacterianas. Las tres especies bacterianas que se aislaron con más frecuencia de las muestras examinadas - fueron: Streptococcus pneumoniae (19 casos), Neisseria meningitidis (10 casos) y Haemophilus sp. (5 casos). Se aislaron con menor frecuencia: *E. coli*, *Salmonellas*, *Klebsiellas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Proteus* (Cuadro III).

Los antisueros conjugados que fueron producidos en nuestro laboratorio fueron probados para especificidad tanto inmediatamente después de su obtención y conjugación, como a lo largo del estudio, cuando se pusieron a reaccionar con cultivos puros de Streptococcus pneumoniae, Neisseria gonorrhoeae, *Haemophilus sp* y Staphylococcus aureus, así como con las diferentes bacterias presentes en las muestras estudiadas. No se observaron reacciones cruzadas entre los diferentes serogrupos de N.meningitidis aislados durante el estudio ni con las otras bacterias que se pusieron a reaccionar con dichos - antisueros (Cuadro IV).

Cuando se hizo el enfoque al campo oscuro (sin iluminación ultravioleta) de las preparaciones coloreadas con los - antisueros conjugados, aunque no pudo obtenerse ninguna otra característica pudieron observarse las diferentes morfologías correspondientes a las diferentes especies bacterianas presentes en las muestras (Cuadro V).

Usando la observación microscópica del frotis coloreado por Gram, tinción por AF y cultivo fue posible la identificación de Neisseria meningitidis en 23 muestras. Sólomente 10 de las mismas fueron cultivo, Gram y AF positivas. En las 13 muestras restantes que fueron cultivo-negativas la tinción de AF dió resultados positivos en 11 de ellas y la observación - de labacteria en el extendido coloreado por Gram fue posible

en 7 de estos 13 casos. La tinción de AF mostró una mayor sensibilidad para la detección de la bacteria (Cuadro VI).

Los extendidos de las 23 muestras en las cuales se identificó Neisseria meningitidis fueron tratados con los antisueros conjugados para N. meningitidis de los serogrupos B, C y de un serogrupo no clasificado y se observaron los diplococos fulorescentes en 21 de ellas. De estas 21 identificaciones 17 corresponden al grupo C (80.9%), 2 al grupo B (9.5%) y 2 al grupo no clasificado. (9.5%)

El Cuadro VII ilustra el efecto del tratamiento parcial previo a la punción lumbar y a la verificación de los análisis del L.C.R. sobre los resultados obtenidos con la tinción de Gram, tinción de AF y cultivos. Este tratamiento tal como aparece detallado en los expedientes de los pacientes, se limitaba a 2-3 dosis de penicilina sódica administrada según la edad y el peso del paciente, en algunos casos acompañadas de igual número de dosis de cloranfenicol o eritromicina. Tal como puede verse en el Cuadro, en todos los casos en que los pacientes habían recibido tratamiento el resultado del cultivo fue negativo y la tinción de AF fue más sensible que el directo coloreado por Gram para detectar el meningococco.

En el Cuadro VIII se resumen los resultados obtenidos con la observación del frotis coloreado por Gram, tinción por AF y cultivos, en los casos de los pacientes que no recibieron tratamiento previo a los análisis del L.C.R.; como podemos ver en estos casos los tres sistemas de detección-identificación de la bacteria fueron igualmente buenos, obteniendo resultados positivos con todos ellos en el total de esas muestras. Es bien evidente la diferencia de los hallazgos en las muestras entre uno y otro grupo.

C U A D R O I

VALORES OBTENIDOS EN LA DETERMINACION DE PROTEINAS  
 TOTALES, ALBUMINA Y GLOBULINA DE LOS 3 ANTISUEROS

PARA N. MENINGITIDIS

ANTISUERO	PROTEINAS TOTALES (gr/dl)	ALBUMINA (gr/dl)	GLOBULINA (gr/dl)
Grupo B	6.4	3.7	2.7
Grupo C	6.1	4.2	1.9
Grupo no Clasificado	8.3	5.7	2.6

C U A D R O    I I

RESULTADOS DE LA TITULACION DE ANTICUERPOS FLUORES-  
CENTES DE LOS 3 ANTISUEROS CONJUGADOS PARA N. MENINGITIDIS

ANTISUERO	D I L U C I O N E S					TITULO
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	
Grupo no Clasificado	++++	++++	++++	+++	++	1:8
Grupo B	+++	+++	+++	++	+	1:8
Grupo C	++++	++++	++++	++++	+++	1:16

C U A D R O    I I I

BACTERIAS AISLADAS EN 100 MUESTRAS DE L.C.R. DE PACIENTES  
 CON DIAGNOSTICO DE MENINGITIS BACTERIANA

BACTERIA AISLADA	Nº DE AISLAMIENTOS	PORCENTAJE %
<u>Neisseria meningitidis</u>	10	23.3
<u>Streptococcus pneumoniae</u>	19	44.3
<u>Haemophilus sp.</u>	5	11.6
<u>Pseudomonas sp.</u>	2	4.6
<u>Escherichia coli</u>	2	4.6
<u>Salmonella sp.</u>	2	4.6
<u>Proteus sp.</u>	1	2.3
<u>Klebsiella sp.</u>	1	2.3
<u>Enterobacter sp.</u>	1	2.3
T O T A L E S	43	100.0

REACCIONES OBTENIDAS CON 3 ANTISUEROS CONJUGADOS PARA N. MENINGITIDIS CON  
 DIFERENTES BACTERIAS PRESENTES EN MUESTRAS DE L.C.R. Y OTRAS BACTERIAS  
 OBTENIDAS EN CULTIVOS DE MUESTRAS DIFERENTES A L.C.R.

Nº DE CASOS	BACTERIA PRESENTE	ANTISUERO SEROGRUPO B	ANTISUERO SEROGRUPO C	ANTISUERO SEROGRUPO NO CLASIFICADO
2	<u>N. meningitidis</u> g.B.	P 3+	N	N
17	<u>N. meningitidis</u> g.C.	N	P 4+	N
2	<u>N. meningitidis</u> no clasif.	N	N	P 4+
19	<u>S. pneumoniae</u>	N	N	N
5	<u>Haemophilus</u> sp	N	N	N
3	<u>Pseudomonas</u> sp.	N	N	P 2+ (1)
3	<u>N. gonorrhoeae</u>	N	N	N
2	<u>Salmonella</u> sp	N	N	N
1	<u>Proteus</u> sp	N	N	N
1	<u>Klebsiella</u>	N	N	N
3	<u>S. aureus</u>	N	N	N
2	<u>E. coli</u>	N	N	N
1	<u>Enterobacter</u> sp	N	N	N

(1) En solamente uno de los casos, tratándose probablemente de una Ps. aeruginosa

P= Positivo

N= Negativo

RESULTADOS COMPARATIVOS DE LA OBSERVACION DE LOS FROTIS DE L.C.R.  
 COLOREADOS POR GRAM Y CON ANTISUEROS CONJUGADOS PARA N. MENINGITIDIS

BACTERIA IDENTIFICADA *	RESULTADO DE LA TINCION DE GRAM	RESULTADO DE LA TINCION AF	
		EN CAMPO OSCURO **	CON ILUMINACION U.V.
<u>Neisseria meningitidis</u>	Diplococos gramnegativos	Diplococos capsulados	Diplococos fluorescences
<u>Streptococcus pneumoniae</u>	Diplococos grampositivos	Diplococos capsulados	No se observan bacterias
<u>Haemophilus sp.</u>	Cocobacilos gramnegativos	Bacilos cortos delgados	No se observan bacterias
<u>Pseudomonas sp.</u>	Bacilos gramnegativos	Bacilos grandes gruesos	Bacilos fluorescences ***
<u>Escherichia coli</u>	Bacilos gramnegativos	Bacilos grandes gruesos	No se observan bacterias
<u>Salmonella sp.</u>	Bacilos gramnegativos	Bacilos	No se observan bacterias
<u>Proteus sp.</u>	Bacilos gramnegativos	Bacilos	No se observan bacterias
<u>Klebsiella sp.</u>	Bacilos gramnegativos	Bacilos	No se observan bacterias
<u>Enterobacter sp.</u>	Bacilos gramnegativos	Bacilos	No se observan bacterias

\* Se refiere a todos los casos en que fue observada cada especie bacteriana

\*\* Es el enfoque inicial que se hace sin iluminacion ultravioleta.

\*\*\* En solamente uno de los casos, tratándose probablemente de una Ps. aeruginosa

C U A D R O VI

COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR LA TINCION DE GRAM,  
CULTIVOS Y TINCION DE AF\* PARA LA IDENTIFICACION DE N. MENINGITIDIS

EXAMEN PRACTICADO	POSITIVOS/TOTAL	NEGATIVOS/TOTAL
Directo	17/23	6/23
Cultivo	10/23	13/23
AF	21/23	2/23

\* Anticuerpos fluorescentes

C U A D R O VII

RESULTADOS DEL EXAMEN DIRECTO, CULTIVO BACTERIOLOGICO Y TINCION DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES PARA INVESTIGAR N. MENINGITIDIS EN 13 MUESTRAS DE L.C.R. DE PACIENTES CON SOSPECHA DE MENINGITIS BACTERIANA QUE RECIBIERON TRATAMIENTO PREVIO A LA PUNCION LUMBAR

EXAMEN PRACTICO	POSITIVOS/TOTAL	NEGATIVOS/TOTAL
Directo	7 / 13	6 / 13
Cultivo	0 / 13	13 / 13
AF*	11 / 13	2 / 13

\* Anticuerpo fluorescente

C U A D R O V I I I

RESULTADOS DEL EXAMEN DIRECTO, CULTIVO BACTERIOLOGICO Y TINCION DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES PARA INVESTIGAR N. MENINGITIDIS EN 10 - MUESTRAS DE L.C.R. DE PACIENTES CON SOSPECHA DE MENINGITIS BACTE - RIANA QUE NO RECIBIERON TRATAMIENTO PREVIO A LA PUNCION LUMBAR.

EXAMEN DIRECTO	POSITIVOS/TOTAL	NEGATIVOS/TOTAL
Directo	10 / 10	0 / 10
Cultivo	10 / 10	0 / 10
AF*	10 / 10	0 / 10

\* Anticuerpos fluorescentes

## D I S C U S I O N

El examen físico, cito-químico y microbiológico del L.C.R. sigue siendo la técnica diagnóstica más difundida para la evaluación de los casos de meningitis bacteriana. Los reportes en cuanto a alteraciones físicas, recuentos celulares fuera de lo normal, variaciones en los contenidos de glucosa y proteínas, hallazgos en el sedimento o en el extendido de L.C.R. coloreado por Gram, así como los datos de la historia clínica, son toda, información valiosa para diferenciar los casos de meningitis aséptica (viral) y meningitis bacteriana. Sin embargo, en casos aislados, no siempre este bloque de información es tan útil como se espera para la confirmación del diagnóstico clínico (6). Por ejemplo, según algunos autores, en más del 40% de los casos de meningitis bacteriana pueden encontrarse concentraciones normales de glucosa en L.C.R.; igual ocurre con las concentraciones de proteínas aunque en un porcentaje mucho menor (6). También el resultado del recuento de glóbulos blancos y la fórmula diferencial puede ser confuso y ésto se ve con relativa frecuencia sobre todo en meningitis incipientes. Estos resultados inesperados se reportaron en 32 de las 100 muestras estudiadas aquí.

Aunque el examen microscópico de los extendidos de L.C.R. o del sedimento es hasta la fecha una de las pruebas de laboratorio más usadas para el diagnóstico rápido de meningitis bacteriana, el valor de esta prueba no debe ser sobreestimado (6). Algunos autores reportan un valor del 60-80% (9) de exactitud de la prueba y otros han comprobado que el tratamiento previo del paciente puede alterar la integridad de la pared celular bacteriana a tal punto, que falsee la reacción al Gram (2).

Esto ocurrió en uno de los casos que estudiamos, en que el paciente había sido sometido a múltiples tratamientos con

antibióticos por haber sufrido meningitis a repetición. En una de las ocasiones el reporte del directo coloreado por Gram fue: "bacilos gramnegativos", habiéndose recuperado en el cultivo del L.C.R. una cepa pura de Streptococcus pneumoniae, un microorganismo típicamente grampositivo.

En términos generales, en nuestros resultados la tinción de Gram probó ser más sensible que el cultivo y la tinción de AF mostró mayor efectividad que ambos sistemas para la demostración de la presencia de meningococos y combinada con ellos contribuyó a aumentar las posibilidades de identificación del microorganismo. Excepcionalmente en dos casos el resultado de la inmunofluorescencia fue negativo, habiéndose reportado "diplococos gramnegativos escasos" como resultado de la observación del frotis coloreado por Gram (Cuadro VI).

Específicamente, en los casos en que los pacientes habían recibido tratamiento previo, la tinción de Gram fue más efectiva que los cultivos (Cuadro VII) más en aquellos casos en que los pacientes no habían sido tratados ambos sistemas fueron igualmente efectivos para la detección de la bacteria (Cuadro VIII).

En relación a los resultados de los cultivos del L.C.R. cuando ha habido antibióticoterapia previa son más desalentadores, sobre todo en el caso de la recuperación de N. meningitidis. A lo largo de nuestro estudio pudimos observar que el tratamiento previo a la punción lumbar en pacientes que sufrieron meningitis a Streptococcus pneumoniae no afectaba su recuperación en los cultivos de las muestras correspondientes; no ocurrió así en los casos de meningitis por meningococo en los cuales pudimos comprobar que el tratamiento parcial previo a la punción lumbar negativizó los cultivos y en aquellos casos en que los pacientes no habían recibido tratamiento alguno, fue posible restacar la N. meningitidis de las muestras (Cuadros VII y VIII). Estos resultados ponen de manifiesto la gran sensibilidad del meningococo a los agentes -

antimicrobianos, por lo que, igual que otras patógenas de su género son bacterias frágiles para cultivarlas en el laboratorio. El Streptococcus pneumoniae aunque es igualmente sensible a la mayoría de antibióticos de elección, inexplicablemente fue recuperado en los cultivos de las muestras de aquellos pacientes que habían sido previamente tratados. Por lo que concierne a la bondad de la inmunofluorescencia, Biegeleisen y colaboradores trabajaron con la identificación de Streptococcus pneumoniae, Haemophilus tipo b y N. meningitidis directamente en el sedimento del L.C.R. usando la técnica directa de anticuerpos fluorescentes (AF). En el caso de la N. meningitidis ellos reportan positividad de la prueba cuando los métodos rutinarios fallaron y solamente en un caso la prueba de AF dio resultado negativo habiendo obtenido en cultivo una colonia de N. meningitidis del grupo B(2). Los resultados obtenidos en nuestro estudio son comparables a los reportados por estos investigadores aún cuando ellos enfatizan el hecho de que procesaron las muestras inmediatamente después de la punción lumbar, lo cual no ocurre con las muestras trabajadas en un laboratorio clínico hospitalario de nuestro país. En uno de los casos que estudiamos, la muestra de L.C.R. del paciente llegó a nuestras manos aproximadamente cuatro horas después de efectuada la punción lumbar, en un paciente parcialmente tratado, y aunque observamos una cantidad considerable de diplococos gramnegativos intra y extracelulares en el extendido de L.C.R. fue imposible recuperarlo en el cultivo, pero la tinción de AF dio un resultado francamente positivo.

En referencia a la especificidad de los antisueros conjugados para N. meningitidis producidos en nuestro laboratorio no se presentaron mayores problemas. Por ejemplo, cuando se llevaron a cabo tinciones de AF en frotis de suspensiones bacterianas preparadas a partir de cultivo, así como en extendidos de L.C.R. positivos a otras bacterias diferentes a Neisseria, los resultados fueron negativos, con excepción de una -

*Pseudomona* sp. que probablemente correspondía a la especie aeruginosa la cual posee fluorescencia propia y cuya morfología no puede ser confundida con la de la *Neisseria* (Cuadro V). Sin embargo, Biegeleisen y cols. (2) reportan reacciones cruzadas entre los diferentes antisueros específicos de grupo para *N. meningitidis* con los diferentes serogrupos bacterianos (A, B y C), lo cual no ocurrió con los reactivos preparados en nuestro laboratorio. Atribuimos esta diferencia de resultados al procedimiento de preparación del antígeno con el que se inmunizaron los animales de experimentación de los cuales se obtuvo el antisuero correspondiente.

El único problema que tuvimos que enfrentar fue que al inicio del trabajo al observar las preparaciones se evidenció una intensa fluorescencia de los leucocitos presentes en la muestra que constituía una gran interferencia óptica para la interpretación de la coloración. En primera instancia se pensó, que esta fluorescencia de los leucocitos se debía a que habían fagocitado meningococos y que incluso, podía establecerse una correlación entre tal fluorescencia y la positividad de la muestra. Para comprobar esta posibilidad se hicieron coloraciones de AF de muestras de L.C.R. positivos a meningococos y a otras bacterias (comprobadas por cultivo) con un recuento alto de leucocitos y de concentrados de leucocitos de sangre periférica. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: ya sea los leucocitos de las muestras de L.C.R. como los leucocitos de sangre periférica, mostraron una marcada fluorescencia, por lo tanto esa fluorescencia no se podía atribuir a la causa antes mencionada y se comprobó que es una fluorescencia inespecífica propia de los glóbulos blancos. En un intento de eliminar esta interferencia se utilizó el azul de Evans a una concentración de 0.005% como un colorante de contraste que dió como resultado la eliminación total de esa fluorescencia. En estos ensayos los leucocitos se observaron entonces teñidos de color rojo debido al efecto de la luz ultravioleta.

Los resultados obtenidos en nuestra investigación indican que la prueba de AF para N. meningitidis ostenta un grado - muy bueno de sensibilidad. Como puede verse en el Cuadro VII aún cuando el paciente ha recibido tratamiento previo, la misma es capaz de detectar las bacterias presentes en las mues - tras.

## C O N C L U S I O N E S

1. Basándonos en nuestros resultados podemos concluir que, en los casos de pacientes parcialmente tratados con antibióticos la prueba de anticuerpos fluorescentes es más sensible que los métodos rutinarios de directo coloreado por Gram y de cultivo.
2. El tiempo necesario para obtener una respuesta con inmunofluorescencia es prácticamente tan corte como la observación de un frotis teñido con Gram y con la ventaja de que aún en los pacientes previamente tratados los resultados pueden ser positivos por lo que es una gran promesa como prueba diagnóstica de apoyo a los métodos convencionales.

## A P E N D I C E

### PREPARACION DE REACTIVOS UTILIZADOS

1. Buffer fostado salino pH = 7.5 (0.01 M, ClNa 0.85%) (19)

a) Solución concentrada (10X)

Na <sub>2</sub> HPO (anhidro, grado reactivo)	12.0 gramos
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O (grado reactivo)	2.2 "
NaCl (grado reactivo)	8.5 "
Agua destilada hasta un volumen final de	1000 mls

b) Solución de trabajo (pH = 7.5, 0.01 M, NaCl 0.85%)

Solución stock concentrada (10X)	100 mls
Agua destilada hasta un volumen final de	1000 mls

2. Buffer carbonato - Bicarbonato (22)

Límites de pH, 9.2 - 10.7

Solución Concentrada A.

Se disuelven 5.3 gr. de (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) Carbonato de Sodio Anhidro en agua destilada y aforar en un frasco volumétrico de 100 mls (Solución 0.5 M).

Solución Concentrada B.

Se disuelven 4.2 gr de Bicarbonato de Sodio Puro (Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>) en agua destilada y aforar en un frasco volumétrico de - 100 mls (Solución 0.5 M).

3. Buffer glycerol solución de montaje (19)

Glycerol, grado reactivo	90 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.2 M (pH = 9.6 aproximadamente)	10 ml

4. Sulfato de amonio saturado (22)

SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	500 grs
Agua destilada	1000 ml

## 5. Reactivo de Nessler (Kock &amp; Mc Makin) (22)

Disuelva 2.25 gramos de yodo en 2 mls de agua conteniendo 3.0 gramos de yoduro de potasio. Cuando la solución es completa agregue 3.0 gramos de mercurio metálico puro y sacuda la mezcla bien evitando que se vuelva caliente introduciendo el frasco en agua de chorro. Continúe haciendo ésto hasta que el líquido pierda todo el color - amarillo del yodo. Decante la solución acuosa sobrenadante e investigue la presencia de yodo agregando unas gotas del sobrenadante a 0.5 ml de una solución de almidón al 1%. Diluya a 20 ml y mezcle bien. Agregue esta solución a 97.6 ml de NaOH al 10%, mezcle bien y deje aclarar en reposo.

## A G R E G A D O

### MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

El método del anticuerpo fluorescente es una técnica - más complicada para demostrar reacciones antígeno-anticuerpo. La técnica consiste en tratar un extendido o corte de tejido con una solución adecuada de una globulina inmune (anticuerpo) que ha sido marcada (conjugada) con un colorante fluorescente (isotiocianato de fluoresceína u otro).

Este preparado se examina contra un fondo oscuro (campo oscuro) iluminado con una fuente de luz brillante próxima al espectro ultravioleta. Esta luz hace que el complejo antígeno anticuerpo que se forma se vuelva fluorescente y aparezca como un objeto amarillo-verdoso brillante, contra el fondo - oscuro, cuando está coloreado con isotiocianato de fluoresceína. (3).

Un aspecto importante de esta técnica se refiere a la - fuente de luz, al microscopio y a diversas combinaciones de filtros de absorción de calor, de excitación y de barrera.

La mayoría de los sistemas de iluminación empleados actualmente usan una lámpara de mercurio o un tubo de carbono cuyo poder varía de 100 a 1000 vatios. Hay muchos tipos de unidades de iluminación en el comercio y debe procederse - con cuidado al seleccionar cada uno de ellos. Las unidades más caras se caracterizan por un sistema cerrado y pueden - instalarse de manera más definitiva que los tipos más baratos, provistos de una instalación de luz aparte, desde la cual hay que enfocar los rayos de luz al descubierto hacia el espejo bajo el condensador del microscopio. Este tipo - requiere que se reajuste con bastante frecuencia la trayectoria de la luz y produce una cantidad de luz "dispersada" que puede desconcertar al técnico. (9).

Entre más fuerte sea la fuente de energía, se producirá más luz pero **no solamente** en la región de ondas cortas del - espectro, sino también en el rango visible y en especial en el de los rayos infrarrojos productores de calor; por lo tanto, para evitar esto, es necesario colocar un filtro de calor que se utiliza con doble propósito: Proteger a los filtros - primarios o excitadores y a la muestra o el frotis a observar. Este filtro debe tener una buena transmisión de luz ultravioleta (9).

Los filtros excitadores están hechos para absorber toda la luz visible, o más exactamente, para absorber por completo toda la luz de longitud mayor que la luz excitante; por otra parte, esta combinación de filtros debe transmitir completamente toda la luz excitante de longitud de onda corta. Además de estos filtros excitadores usualmente se coloca un filtro celeste pálido que se usa para corregir contrastes. El propósito de éste es hacer el fondo del campo de visibilidad en el microscopio fluorescente aún más negro.

Un filtro de barrera, ~~bloqueador~~ o secundario que absorba la luz ultravioleta debe usarse para cada caso y sirve para quitar todo el remanente de luz excitadora, para que solo la fluorescencia llegue al ojo del observador. (9).

Aunque para la microscopía de fluorescencia de ciertos preparados puede emplearse un microscopio de campo claro, recomendamos el uso de un condensador de campo oscuro para el trabajo habitual, ya sea de tipo cardioide o paraboloides.

La desventaja es que con el condensador de campo claro, no se obtiene un campo de fondo tan oscuro como el que se obtiene con el condensador de campo oscuro. Con los condensadores de campo claro debe usarse una filtración mayor de luz excitadora. Los condensadores de campo oscuro dan imágenes con mayor contraste. El gran contraste que da el sistema de campo oscuro se debe al hecho de que prácticamente nada de -

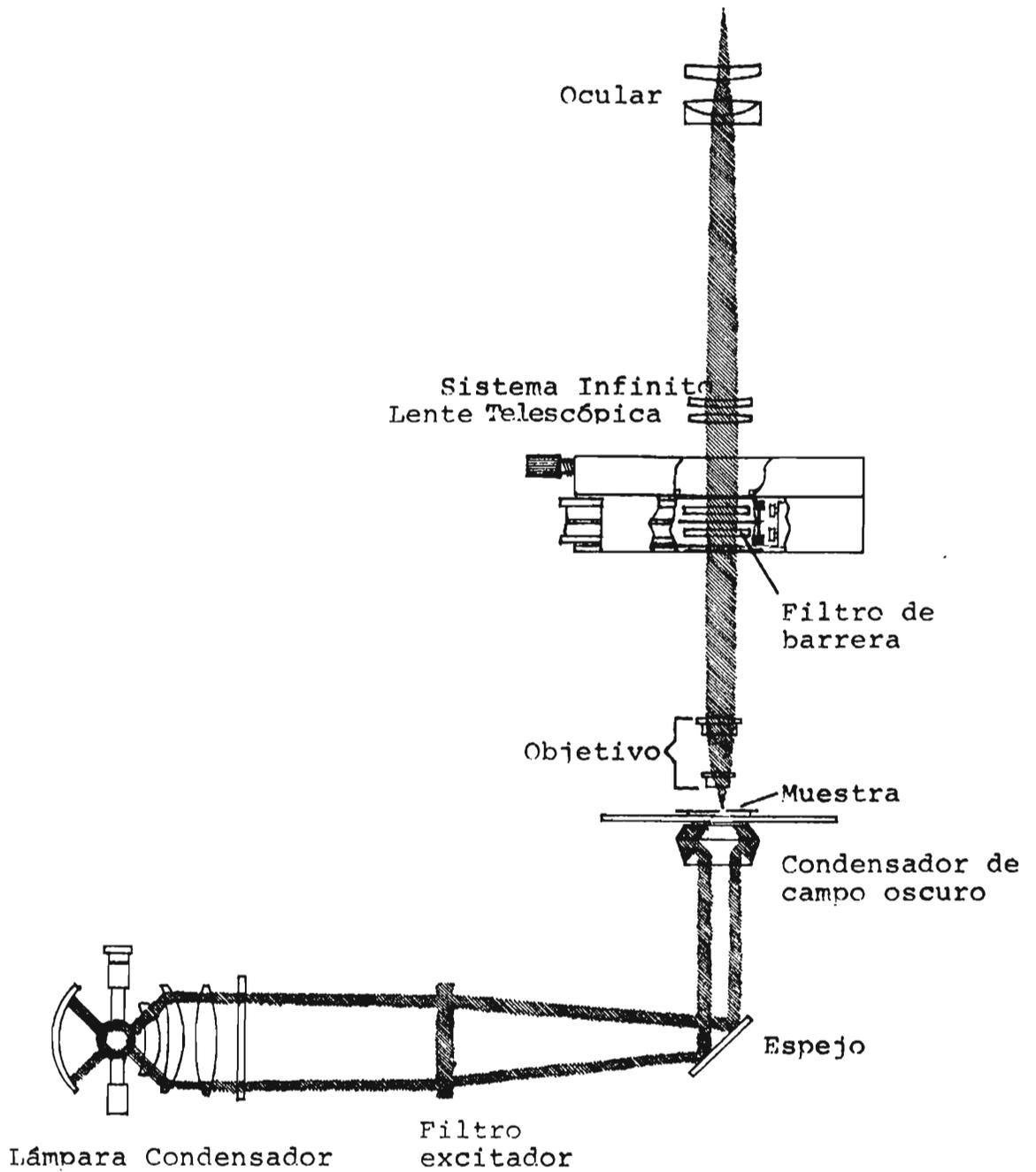
luz excitante entra al objetivo, con excepción de una pequeña cantidad de ella que es dispersada por la muestra.

El aceite de inmersión que se emplee para estos condensadores de campo oscuro debe ser de un tipo de fluorescencia muy baja y además de baja viscosidad, porque los de alta viscosidad forman burbujas muy fácilmente y éstas arruinan el contraste.

En nuestro trabajo la combinación utilizada en el microscopio fue la siguiente:

- Lámpara OSRAM HBO 200 W/4
- Filtro de calor KGI
- Filtro excitador BG12
- Filtro de contraste BG38
- Filtro de barrera OG1

A continuación presentamos un esquema de la composición del sistema de la microscopía de fluorescencia donde están señalados sus componentes más importantes.



TRAYECTORIA DE LA LUZ EN UN MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA.

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

1. APICELLA, M.A. Lipopolysaccharide Derived Serotype Polysaccharides from Neisseria meningitidis Group B. J. Infect Dis. 140(1): 62-72, 1979.
2. BIEGELEISEN, J.Z., Jr. and COWORKERS Immunofluorescence Techniques for Demonstrating Bacterial Pathogens - Associated With Cerebrospinal Meningitis, I. Clinical Evaluation of Conjugates on Smears Prepared Directly from Cerebrospinal Fluid Sediments, J. lab. & Clin, Med. 65: 976-989, 1965.
3. BAILEY, W.R. y SCOTT, E.G. Diagnóstico Microbiológico - 3a. Edición, Argentina, Editorial Médica Panamericana, S.A., 1973 p. 477-478.
4. BLOCH, M. col. Meningitidis Bacteriana Aguda. Epidemia - de Meningitis Meningocócica. Revista del Instituto de Investigaciones Médicas 12(2) 103-191, 1983.
5. BRAUDE, A.I., DAVIS, Ch. E. and FIERER, J. Medical Microbiology and Infectious Diseases, 1st Edition, Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1981, p. 604-606.
6. BRICE, J.L., TORNABENE, T.G. and LAFORCE, F.M. Diagnosis of Bacterial Meningitis by Gas-liquid Chromatography I. Chemotyping Studies of Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis, Staphylococcus aureus and Escherichia coli. J. Infect. Dis. 140(4): 443-451, 1979.
7. BROUD, D.D., GRIFFISS, J.M. and BAKER, J.C. Heterogeneity of Serotypes of Neisseria meningitidis that cause Endemic Disease. J. Infect. Dis. 140(4):465-469, 1979.

8. CHERRY, W.E. and MOODY, M.D. Fluorescent Antibody Techniques in Diagnostic Bacteriology, *Bacteriol. Rev.* 29(2): 222-237, 1965.
9. DAVIDSOHN, I. y HENRY, J.B. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. 6a. Edición, España, Salvat Editores, S.A., 1983, p. 955-960.
10. DAVIS, B.D. y COL. Tratado de Microbiología, 2a. Edición, España, Salvat Editores, S.A., 1983. p. 766-776.
11. EDWARDS, E.A. Immunologic Investigations of Meningococcal Disease. I. Group-Specific Neisseria meningitidis - Antigens Present in the Serum of Patients with Fulminant Meningococemia. *J. Immunol.* 106(2): 314-317, 1971.
12. FINEGOLD. S.M., MARTIN, W.J. and SCOTT, E.G. Diagnostic - Microbiology 5th. Edition, Missouri, C.V. Mosby, Saint Louis, 1978. p. 145-146.
13. GOLD, R. and COWORKERS. Antibody Responses of Human Infants to three Doses of Group A Neisseria meningitidis Polysaccharide Vaccine Administered at Two, Four and Six Months of Age. *J. Infect. Dis.* 138(6): 731-735, 1978.
14. GRIFFISS, J. McL. Epidemiological Value of Lipopolysaccharide and Heat-Modifiable outer-Membrane Protein Serotyping of Group A Strains of Neisseria meningitidis. *J. Med. Microbiol.* 15:327-330, 1982.
15. HARRELL, W.K. and COWORKERS. Procedural Manual for Production of Bacterial, Fungal and Parasitic Reagents. Microbiological Reagents Unit., Biological Reagents Section, Scientific Resources Branch. Atlanta, Georgia. Laboratory Division. Center for Disease Control.

Health Services and Mental Health Administration, Public Health Service. U.S. Department of Health, Education - and Welfare, 1970.

16. HOFFMAN, T.A. and EDWARDS E.A. Group-Specific Polysaccharide Antigen and Humoral Antibody Response in Disease due to Neisseria meningitidis . J. Infect. Dis. 126(6): 636-643, 1972.
17. JENNINGS, H.J. and COWORKERS. The Structure of the Capsular Polysaccharide Obtained from a new Serogrupo (L) of Neisseria meningitidis. Carbohydr. Res. 112: 105-111, 1983.
18. KAYTHY, H. and COWORKERS. Antibody Reponse to Capsular Polysaccharide of Groups A and C Neisseria meningitidis and Haemophilus influenzae type b during Bacteremic Disease. J. Infect. Dis. 143(1): 32-41, 1981.
19. Laboratory Outline for Training. Course in Principles and Bacterial Applications of Fluorescent Antibody Techniques. Course N° 8440-C, Atlanta Georgia, Center for Disease Control Health Services and Mental Health Administration. Public Health Service. U.S. Department of Health, Education and Welfare, 1970, p. 118-126.
20. LAFORCE, F.M., BRICE, J.L. and TORNABENE, T.G. Diagnosis of Bacterial Meningitis by Gas-Liquid Chromatography. II Analisis of Spinal Fluid. J. Infect. Dis. 40(4): 453-463, 1979.
21. LENNETTE, E.H. and COWORKERS. Manual of Clinical Microbiology 3rd. Edition U.S.A., American Society for Microbiology, 1980, p. 122-127.
22. LYNCH. M.J. and COWORKERS. Métodos de Laboratorio 2a. Edición, Mexico, Editorial Interamericana, 1969, p. 1301,

23. Reporte Epidemiológico Semanal. Epidemia de Meningitis Meningocócica de los años 1978-1979, El Salvador, - Dirección General de Salud, 1980.
24. ROBINSON, J.A. and APICELLA, M.A. Isolation and Characterization of Neisseria Meningitidis Group A. C. X and Y Polysaccharide Antigens. Infect. Immun. 1(1): 8-14, 1970.
25. SMITH, A.L. and COWORKERS. Microbiology and Patology - 12th Edition. U.S.A., American Society for Microbiology, 1980, p. 217-220.
26. STEPHENS, D.S. and COWORKERS, Pili and Outer Membrane - Appendages on Neisseria meningitidis in the Cerebrospinal Fluid of and Infant. J. Infect. Dis. 146(4):568, 1982.
27. STEPHENS, D.S. and MCGEE, Z.A., Association of Virulence of Neisseria meningitidis with Transparent Colony - and Low-Molecular Weight outer Membrane Proteins. J. Infect Dis. 147(2): 282-292, 1983.