

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

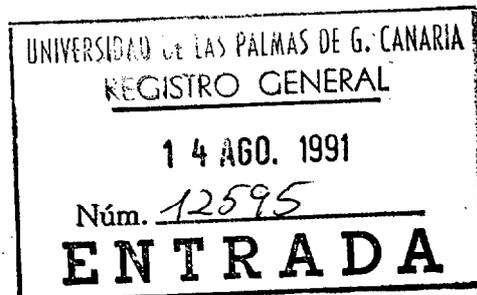


TESIS DOCTORAL

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL
FRENTE A LOS ANTÍGENOS MICOBACTERIANOS 6 Y 60
EN LA TUBERCULOSIS: ESTUDIO DE SU CINÉTICA
Y RENTABILIDAD DIAGNOSTICA**

FELIPE RODRÍGUEZ DE CASTRO

Las Palmas de Gran Canaria, 1991



D. Zoilo González Lama, Director del Departamento de Ciencias Clínicas de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

Informa de la Remisión de un ejemplar de la Tesis Doctoral de D. Felipe Rodríguez de Castro titulada : "Evaluación de la respuesta inmune humoral frente al antígeno 6 y 60 en la tuberculosis. Estudio de su cinética y rentabilidad diagnóstica."

Para que conste donde proceda firmo la presente en Las Palmas de G.C. a 30 de Julio de 1991.



Fdo.: Dr. Zoilo González Lama

ILMO. SR. SECRETARIO GENERAL DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE
GRAN CANARIA



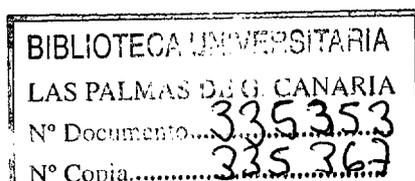
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS Y DE LA SALUD

**EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL FRENTE
A LOS ANTIGENOS MICOBACTERIANOS 6 Y 60 EN LA
TUBERCULOSIS.**

ESTUDIO DE SU CINETICA Y RENTABILIDAD DIAGNOSTICA

Memoria para optar al grado
de Doctor en Medicina y Cirugía
Felipe Rodríguez de Castro

Las Palmas de Gran Canaria, Julio 1991



D. PEDRO BETANCOR LEON, CATEDRATICO DE PATOLOGIA GENERAL,
DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS Y DE LA SALUD DE LA
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA Y JEFE DEL
DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA DEL HOSPITAL INSULAR DE LAS
PALMAS DE GRAN CANARIA

CERTIFICA:

Que D. Felipe Rodríguez de Castro, Licenciado en Medicina
y Cirugía, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado
«EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL
FRENTE A LOS ANTIGENOS 6 Y 60 EN LA TUBERCULOSIS.
ESTUDIO DE SU CINETICA Y RENTABILIDAD
DIAGNOSTICA».

Dicho trabajo reúne las condiciones precisas para ser
sometido a lectura y discusión ante el Tribunal designado a
tal efecto.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, y en
cumplimiento de las disposiciones vigentes, extiendo y firmo
el presente Certificado en Las Palmas de Gran Canaria, a
veintinueve de Julio de 1991.



Fdo.: Prof. Dr. D. Pedro Betancor León

A Teresa

A Mercedes

AGRADECIMIENTOS

La Tesis Doctoral es, en mi opinión, un trabajo de investigación que debe reflejar el grado de madurez científica del doctorando y es, por tanto, producto de una trayectoria profesional. Así pues, colocado en el trance de su lectura, no puedo por menos que recordar aquí, a todos los que de una u otra manera me han ayudado en este camino.

Mis primeras líneas de agradecimiento son para mis padres. Ellos han influido de modo decisivo en mi vida profesional, orientándome y ayudándome en todo momento y participando plenamente en mis alegrías y preocupaciones. Son el ejemplo de un modo de vida que siempre procuraré seguir.

Una deuda de gratitud especial me une con mi amigo **Arcadi Gual i Sala**, hoy catedrático de Fisiología de la Universidad de Barcelona. El ha sido y es para mí un maestro indiscutible y un modelo constante de rigor científico.

Todo mi agradecimiento merecen mis compañeros del Servicio de Neumología del Hospital «Ramón y Cajal», que pacientemente me iniciaron en lo que hoy es mi profesión, y los del Servicio de Neumología del Hospital «12 de Octubre», a cuyo lado tuve la oportunidad de aprender cómo aplicar el método científico en la práctica clínica diaria.

Agradezco a todos los miembros de la Sección de Neumología del Hospital «Ntra. Sra. del Pino» su apoyo y aliento constante y, en especial a su jefe, el Dr. D. **Pedro Cabrera Navarro**, sus siempre sabios consejos.

En la elaboración de esta Tesis he tenido la fortuna de contar con la inestimable ayuda del Dr. D. **José A. Caminero Luna**, sin lugar a dudas, uno de los mejores fisiólogos de nuestro país. Para él mi agradecimiento más sincero. Asimismo, mi reconocimiento a los Dres. **Antonio Losada Cabrera** y **Agustín González García**, sin cuya colaboración este trabajo no hubiera sido posible.

A la Dra. Dña. **Manuela Cuevas Agustín**, del Servicio de Inmunología del Hospital «Ramón y Cajal» de Madrid, he de dedicarle un recuerdo cariñoso y agradecido por su desinteresada ayuda en aspectos fundamentales de este trabajo.

También quiero dar las gracias públicamente al Dr. **Thomas M. Daniel**, de la Universidad de Case Western Reserve en Cleveland, Ohio, que amablemente proporcionó Antígeno 6 para su utilización.

Me gustaría dedicar un agradecimiento particular a Gran Canaria y a la gente que aquí me ha brindado su amistad, en especial a **Luis López Rivero**, cuya tenacidad, dedicación y amabilidad han sido siempre para mí motivo de admiración.

Finalmente, mi reconocimiento al Prof. Dr. D. **Pedro Betancor León**, por su constante disposición y del que siempre he recibido asesoramiento y apoyo.

A todos, gracias.

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO

Ac:	Anticuerpo
ADN:	Acido desoxirribonucleico
Ag:	Antígeno
BCG:	Bacilo Calmette-Guerin
DO:	Densidades ópticas
ELISA:	Enzimoinmunoensayo
S_m:	Error Estándar de la Media
Ig:	Inmunoglobulina
INH:	Isoniacida
LCR:	Líquido cefalorraquídeo
LJ:	Lowenstein-Jensen
LL:	Lepra Lepromatosa
LT:	Lepra Tuberculoide
m:	Media Aritmética
M:	Mycobacterium
PBS:	Tampón Fosfato Salino
PBS-Tw:	PBS 0,1% Tween 20
PPD:	Derivado Proteico Purificado
PZ:	Pirazinamida
RAI:	Riesgo Anual de Infección
RCP:	Reacción en cadena de la polimerasa
RIA:	Radioinmunoanálisis
RIF:	Rifampicina
SEPAR:	Sociedad Española de Patología del Aparato Respiratorio

SIDA:	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
STF:	Suero de Ternera Fetal
TB:	Tuberculosis
TBR:	Tuberculosis residual
TIR:	Grupo de Trabajo de Tuberculosis e Infecciones Respiratorias
UE:	Unidades ELISA
VIH:	Virus de la inmunodeficiencia humana
VPN:	Valor predictivo negativo
VPP:	Valor predictivo positivo
ZN:	Ziehl-Neelsen

INDICE

INDICE

CAPITULO I: INTRODUCCION

I.1. <u>EPIDEMIOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS</u>	1
1.1 LA TUBERCULOSIS COMO ENFERMEDAD EPIDEMICA	1
1.2 PARAMETROS DE ANALISIS DE LA TUBERCULOSIS	3
1.3 ESTADO ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS EN EL MUNDO	4
1.4 ESTADO ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS EN ESPAÑA	7
1.4.1. Estado actual de la infección tuberculosa	8
1.4.2. Estado actual de la enfermedad tuberculosa	9
1.5 ESTADO ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS EN GRAN CANARIA .	10
I.2 <u>EPIDEMIOLOGIA DE OTRAS MICOBACTERIOSIS</u>	15
I.3 <u>PROBLEMAS DIAGNOSTICOS DE LA TUBERCULOSIS Y DE OTRAS</u> <u>MICOBACTERIOSIS</u>	16
I.4 <u>METODOS DIAGNOSTICOS</u>	18
4.1 FROTIS DIRECTO	18
4.2 CULTIVOS CONVENCIONALES	20
4.3 CULTIVOS RADIOMETRICOS	21
4.4 INOCULACION EN ANIMALES	23
4.5 TIPIFICACION DE MICOBACTERIAS	24
4.6 ESTUDIOS SEROLOGICOS	27
4.7 METODOS BASADOS EN LOS ACIDOS NUCLEICOS PARA LA DETECCION DE MICOBACTERIAS	28
I.5 <u>INMUNOLOGIA DE LAS ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR</u> <u>MICOBACTERIAS</u>	31

I.6 <u>CARACTERISTICAS DE LOS TEST SEROLOGICOS</u>	33
I.7 <u>TECNICAS INMUNOLOGICAS EMPLEADAS</u>	35
7.1 TECNICAS DE AGLUTINACION	35
7.2 TECNICAS DE PRECIPITACION	36
7.3 TECNICAS DE FIJACION DEL COMPLEMENTO	37
7.4 TECNICAS DE INMUNOANALISIS CON INDICADORES	
MARCADOS	38
7.4.1 Radioinmunoanálisis	38
7.4.2 Técnicas inmunoenzimáticas	39
7.4.3. Otras técnicas de inmunoanálisis	40
I.8 <u>ANTICUERPOS ESTUDIADOS</u>	41
8.1 INMUNOGLOBULINA A	41
8.2 INMUNOGLOBULINA M	42
8.3 INMUNOGLOBULINA G	43
I.9 <u>ANTIGENOS UTILIZADOS</u>	44
I.10 <u>VARIABLES QUE PUEDEN INFLUIR EN LOS RESULTADOS</u>	49
10.1 COMPLEJOS INMUNES	49
10.2 VACUNACION BCG PREVIA	50
10.3 EFECTO DEL TRATAMIENTO ANTITUBERCULOSO	51
10.4 TUBERCULOSIS RESIDUAL	52
10.5 ESTADIO DE LA ENFERMEDAD Y BACILOSCOPIA DIRECTA	
NEGATIVA	53
10.6 INFLUENCIA DEL ESTADO TUBERCULINICO	54
10.7 INFLUENCIA DE LA SELECCION DE LOS GRUPOS CONTROL. .	55
10.8 OTROS FACTORES	56

I.11 <u>ESTUDIOS SEROLOGICOS EN LA TUBERCULOSIS</u>	57
11.1 RENTABILIDAD SEGUN LA ELECCION DEL ANTIGENO	57
11.1.1 Antígenos bacilares crudos	57
11.1.2 BCG	59
11.1.3 PPD	60
11.1.4 Antígenos purificados y semipurificados	61
11.1.5 Antígeno 60	63
11.2 RENTABILIDAD DE LOS ESTUDIOS SEROLOGICOS EN LA TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR	64
11.2.1 Tuberculosis meníngea	64
11.2.2 Tuberculosis pleural	66
11.2.3 Otras localizaciones	67
11.3 RENTABILIDAD EN GRUPOS DE POBLACION ESPECIALES	68
11.4 DETECCION DE ANTIGENOS Y ANTICUERPOS EN OTRAS MUESTRAS BIOLÓGICAS	69
I.12 <u>ESTUDIOS SEROLOGICOS EN LA LEPRO</u>	71
12.1 ANTIGENOS BACILARES CRUDOS	71
12.2 GLICOLIPIDO FENOLICO	71
12.3 OTROS ANTIGENOS	72
I.13 <u>MICOBACTERIOSIS HUMANAS NO TUBERCULOSAS</u>	73
I.14 <u>ENFERMEDADES ANIMALES PRODUCIDAS POR MICOBACTERIAS</u> .	74
I.15 <u>ENFERMEDADES GRANULOMATOSAS NO MICOBACTERIANAS</u> ...	75
15.1 SARCOIDOSIS	75
15.2 ENFERMEDAD DE CROHN	75

CAPITULO II: OBJETIVOS	77
 CAPITULO III: MATERIAL Y METODOS	
III.1 SELECCION DE LA POBLACION	79
III.2 MATERIAL	84
2.1 ANTIGENO 60	84
2.2 ANTIGENO 6	85
III.3 METODO	86
3.1 ELISA PARA ANTIGENO 60	86
3.2 ELISA PARA ANTIGENO 6	88
3.2.1 Sensibilización de las placas	88
3.2.2 IgG específica	88
3.2.3 IgM específica	89
III.4 METODO ESTADISTICO	90
 CAPITULO IV: RESULTADOS	
IV.1 HOMOGENEIDAD DE LA POBLACION	92
IV.2 ESTUDIO DEL ANTIGENO 60. ANALISIS GENERAL	94
IV.3 PACIENTES TUBERCULOSOS. ESTUDIO DEL ANTIGENO 60	96
3.1 TUBERCULOSIS PULMONAR	96
3.1.1 Relación con la baciloscopia	97
3.1.2 Relación con la agresividad del método diagnóstico . . .	98
3.1.3 Relación con la infección por el VIH	99

3.2 TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR	100
IV.4 <u>ESTUDIO DEL ANTIGENO 60. ANALISIS DE LOS CONTROLES</u>	102
IV.5 <u>RENTABILIDAD DIAGNOSTICA</u>	103
5.1 SENSIBILIDAD DEL TEST	103
5.2 ESPECIFICIDAD DEL TEST	104
5.3 VALORES PREDICTIVOS Y EXACTITUD DEL TEST	106
IV.6 <u>EMPLEO DEL ANTIGENO EN TUBERCULOSIS PLEURAL</u>	107
6.1 ANALISIS DEL LIQUIDO PLEURAL	108
6.2 ANALISIS SERICO	109
6.3 ANALISIS CONJUNTO	110
6.4 RELACION ENTRE LOS NIVELES DE IGG ESPECIFICA EN SUERO Y EN LIQUIDO PLEURAL	110
IV.7 <u>SEGUIMIENTO DE LA RESPUESTA IGG ESPECIFICA</u>	112
IV.8 <u>ESTUDIO DEL ANTIGENO 6</u>	116
8.1 MEDICIONES DE IGG ESPECIFICA	117
8.2 MEDICIONES DE IGM ESPECIFICA	118
8.3 ANALISIS CONJUNTO DE IGG E IGM	119
8.4 COMPORTAMIENTO EN LA TUBERCULOSIS RESIDUAL	120
8.4.1 IgG frente a Antígeno 6	120
8.4.2 Comparación con Antígeno 60	120
8.5 IGG FRENTE A ANTIGENO 6 EN LEPROSOS	122

CAPITULO V: DISCUSION

V.1 <u>EVALUACION GENERAL DE LAS TECNICAS INMUNOENZIMATICAS EN EL DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS</u>	123
1.1 ASPECTOS GENERALES	123
1.2 DETECCION DE ANTIGENOS MICOBACTERIANOS POR ENZIMOINMUNOENSAYO	124
1.3 RESPUESTA INMUNITARIA CELULAR: INTRADERMORREACCION TUBERCULINICA	126
1.4 RESPUESTA INMUNITARIA HUMORAL: SEROLOGIA DE LA TUBERCULOSIS	127
1.5 OTRAS TECNICAS INMUNOENZIMATICAS	129
V.2 <u>EVALUACION GENERAL DE LOS RESULTADOS SEROLOGICOS CON ANTIGENO 60</u>	130
V.3 <u>ANALISIS DE LA RENTABILIDAD DIAGNOSTICA DE LA DETECCION DE IGG ESPECIFICA FRENTE A ANTIGENO 60</u>	133
3.1 SENSIBILIDAD DE LA TECNICA	133
3.2 ESPECIFICIDAD DE LA TECNICA	134
3.3 VALOR PREDICTIVO POSITIVO	136
V.4 <u>VALORACION DE LA TECNICA EN LIQUIDO PLEURAL</u>	139
4.1 CONSIDERACIONES GENERALES	139
4.2 RENTABILIDAD DEL TEST EN LA TUBERCULOSIS PLEURAL	140
4.3 RELACION ENTRE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS EN SUERO Y LIQUIDO PLEURAL	141
V.5 <u>INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS FALSOS POSITIVOS</u>	142

V.6 <u>INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS FALSOS NEGATIVOS</u> . . .	143
V.7 <u>CINETICA DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL</u>	145
7.1 ANALISIS DE LOS RESULTADOS	145
7.2 INTERPRETACION TEORICA DE LOS RESULTADOS	147
7.3 PERSISTENCIA DE TITULOS ELEVADOS	148
V.8 <u>ANTIGENO 6</u>	150
8.1 COMPORTAMIENTO EN LA TUBERCULOSIS RESIDUAL	150
8.1.1 Hipótesis de la población persistente	150
8.1.2 Hipótesis de las formas ultrafinas	151
8.2 RENTABILIDAD CONJUNTA EN LA TUBERCULOSIS	
RESIDUAL	154
8.3 IGM ESPECIFICA FRENTE A ANTIGENO 6	154
8.4 RENTABILIDAD DEL ANTIGENO 6 VERSUS ANTIGENO 60 .	155
CAPITULO VI: CONCLUSIONES	157
CAPITULO VII: BIBLIOGRAFIA	159

I. INTRODUCCION

I.1. EPIDEMIOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS

I.1.1. LA TUBERCULOSIS COMO ENFERMEDAD EPIDEMICA

La epidemiología es el estudio de la distribución y dinámica de las enfermedades en la población¹. Aunque la tuberculosis (TB) ha acompañado al hombre desde los tiempos prehistóricos y constituyó durante la Edad Media una enfermedad endémica, hoy se acepta que la Revolución Industrial fue la causa que provocó una exacerbación epidémica que se inició en Europa, concretamente en Inglaterra, a finales del siglo XVII, en Norteamérica en el XIX y en Asia, Sudáfrica y entre los esquimales en el siglo XX.

El acmé de esta onda epidémica llegó a provocar unas tasas de mortalidad de 700 a 1.000 por 100.000 habitantes. Aún, entre los años 1.920 y 1.950, la mortalidad controlada en los esquimales alcanzó tasas de 1.200 entre las mujeres de 20 a 29 años, falleciendo anualmente el 1% de la población como consecuencia de esta enfermedad.

El declive espontáneo de esta onda epidémica se inició 100 años antes de que se organizara una lucha antituberculosa y de conocerse su agente causal. Cuando éste es finalmente identificado por Koch en 1.882, la mortalidad por TB ya había descendido a la mitad y, en 1.910, al inaugurarse los primeros sanatorios, se había reducido en $\frac{3}{4}$ partes continuando su disminución, de forma no influenciada por las diversas terapéuticas, hasta el comienzo de la moderna quimioterapia. Esta provoca una nueva inflexión y

INTRODUCCION

acelera en 3-4 veces el declive previo existente, imprimiendo una nueva orientación epidemiológica que llegó a hacer previsible una posible erradicación futura².

Por lo tanto, el factor desencadenante en el declive de la TB fue la mejora de las condiciones socioeconómicas de la población. Además, el descenso empezó antes en aquellos países que iniciaron el despegue económico y social. Asimismo, en aquellos países en que la lucha ha sido correctamente planificada y ejecutada y donde las condiciones económicas son favorables (Canadá, Estados Unidos, Holanda, Dinamarca, etc.), se ha demostrado que es posible el control de la infección y enfermedad tuberculosa, e incluso ha llegado a especularse con la posibilidad de erradicar la enfermedad en los primeros años del próximo siglo³.

La TB presenta, pues, un ritmo de autoeliminación natural. Este se estima en torno al 4% anual, porcentaje que se verá incrementado dependiendo de lo acertado de las medidas de lucha contra esta enfermedad. Así, en países subdesarrollados, con elevada incidencia de TB, si se adoptan unas adecuadas medidas de control, este porcentaje puede llegar al 10-12%.

Sin embargo, si no existe un planteamiento correcto de lucha antituberculosa, no se superará un 6-7% anual, a pesar de la existencia de fármacos eficaces contra la enfermedad. En España, donde no se han seguido programas adecuados para el control de la TB, el ritmo de eliminación de la enfermedad se estima que no debe superar el 6-7%.

I.1.2. PARAMETROS DE ANALISIS DE LA TUBERCULOSIS

Para cuantificar la magnitud y evolución temporal de la TB en una comunidad se suelen utilizar tres tipos de parámetros: La mortalidad, la morbilidad y la infección. Durante la etapa prequimioterápica y, teniendo en cuenta que el 50% de los tuberculosos morían en el transcurso de los dos primeros años del inicio de su enfermedad, se pudo establecer la siguiente relación:

**1 caso de muerte (MORTALIDAD) ⇒ 2 casos de enfermos nuevos (INCIDENCIA) ⇒
4 casos de enfermos existentes (PREVALENCIA)**

Esta relación permitió establecer estimaciones válidas sobre la morbilidad, actualmente superadas debido a la actividad terapéutica de los fármacos antituberculosos modernos. Hoy día, la morbilidad se debe determinar mediante notificaciones y registros⁴.

Desde la aparición de la quimioterapia moderna, la mortalidad no constituye un índice representativo de la endemia tuberculosa ya que el porcentaje de enfermos que fallecen es mínimo y, en todo caso, inferior al 1%. Sin embargo, es importante recordar como en 1.801, el 30% de todas las muertes en Inglaterra eran atribuidas a la TB, o como, incluso en la segunda mitad del siglo XVIII la mortalidad ocasionada por la TB era de 1.000/100.000 habitantes, lo que significa que el 1% de la población moría por TB.

Los datos sobre mortalidad en España arrojan unas tasas en torno a

200/100.000 habitantes en las primeras décadas de este siglo. Estas tasas disminuyeron progresivamente marcando una notable inflexión negativa a partir de 1.950, fecha en la que se introdujeron en España los primeros fármacos con acción antituberculosa. El Instituto Nacional de Estadística señala una tasa de mortalidad en 1.960 de 25,7, cifra que descendió a 6 en 1.977⁴.

En la actualidad, el enfermo que recibe quimioterapia muy pocas veces muere a causa de su TB, sino con su TB y a consecuencia de otras enfermedades que son una simple secuela de su enfermedad ya curada (insuficiencia respiratoria, cor pulmonale crónico, amiloidosis, etc.), o bien carecen de relación directa con ella (cáncer, enfermedades cardiovasculares, etc.).

Desde el inicio de la etapa quimioterápica, la enfermedad tuberculosa sólo puede ser cuantificada correctamente por los parámetros de morbilidad, es decir, la incidencia (número de tuberculosos que inician en un año la enfermedad) y la prevalencia (número total de enfermos en un momento dado).

1.1.3. ESTADO ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS EN EL MUNDO

Cuando se analiza la prevalencia e incidencia de la TB en el mundo, éste parece estar dividido en tres grandes grupos. El primero de ellos comprendería

los países de Europa y America del Norte en los que la TB ha disminuido hasta el punto de ser considerada, hoy en día, un problema menor. El segundo grupo estaría representado por países como Singapur, Argentina, Malasia, Argelia, Corea, etc., donde el problema de la TB es todavía importante pero en regresión de año en año. El último grupo engloba a todos los países subdesarrollados o en vías de desarrollo en los que la TB constituye un problema de salud mayor, como es el caso de Indonesia donde se estima que unas 150.000 personas mueren por TB cada año⁵.

Según los cálculos de Styblo y Rouillon⁶, la OMS⁷ estimaba, en 1.982, que cada año se producían en el mundo de 4 a 5 millones de nuevos casos de TB altamente contagiosos, con frotis positivos, y un número igual de casos activos, menos contagiosos, que incluyen los casos positivos solamente en el cultivo. Estos valores se mantienen para 1.990 según las estimaciones realizadas por Murray et al⁸ y de acuerdo a las cifras recientemente comunicadas por la OMS⁹.

Según esta Organización Internacional, una tercera parte de la población mundial se encuentra infectada por el *Mycobacterium (M) tuberculosis*, lo que correspondería a unos 1.700 millones de habitantes. De éstos, solamente unos 380 millones corresponden al mundo desarrollado, mientras que los restantes pertenecen a países del Tercer Mundo. Es de señalar que cerca de 1.000 millones de las personas infectadas se encuentran en Asia, el reservorio mundial más importante en la actualidad⁹. Este importante número de infectados es el responsable de que se produzcan más de 8 millones de

INTRODUCCION

nuevos casos cada año en todo el mundo, con una mortalidad cercana a los 3 millones de fallecimientos.

Nuevamente, en los casos de enfermedad, existen diferencias importantes entre el mundo desarrollado y los países en vías de desarrollo. Así, en 1.990 se ha estimado que el número de casos que se han producido en Europa y resto de países desarrollados ha sido de 410.000, con 40.000 muertes por esta enfermedad. Esta situación cambia radicalmente en Africa (1.400.000 enfermos y 660.000 muertes) y, sobre todo, en Asia, continente en el que se ha estimado que el número de pacientes ha sido de 5.040.000 y el número de fallecimientos por TB de 1.830.000⁹.

Como se puede apreciar, la situación epidemiológica es completamente distinta de unas zonas del mundo a otras, con resultados muy diferentes en la lucha contra esta enfermedad. Así, mientras el número de muertes por año en los países desarrollados se sitúa alrededor del 10% del número de enfermos, en Asia esta cifra se acerca al 33% y en Africa casi alcanza el 50%.

Por tanto, aunque el mayor reservorio de la enfermedad se encuentra en el continente asiático, la peor lucha contra esta enfermedad se está desarrollando en Africa, lugar donde sorprende el elevado número de enfermos (1.400.000) en relación a un número no tan alto de infectados (171 millones), en comparación con Asia.

En un nivel intermedio se sitúan los países de Iberoamérica con 117 millones de infectados, 560.000 nuevos casos de enfermedad en 1.990 y 220.000 muertes en ese año. En estos países, al igual que sucede en algunas regiones asiáticas y africanas (Argelia, Corea, etc.), en los que las tasas de infectados y de enfermos continúan siendo muy elevadas, se produce una disminución aceptable año a año.

I.1.4. ESTADO ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS EN ESPAÑA

A pesar de la importancia de los datos expuestos, España, país económicamente situado en el mundo desarrollado, no ha sido capaz de comunicar datos fiables a los Organismos Internacionales sobre el estado de la TB en nuestro país. Así, mientras en 1.976-77 se declaraba una incidencia de la enfermedad de 8 casos por 100.000 habitantes¹⁰, en 1.990 figura entre los pocos países de Europa que no aportan ningún dato a la Unión Internacional contra la Tuberculosis¹¹, lo que probablemente sea debido a la poca efectividad de los sistemas de declaración obligatoria. Según esta fuente, la incidencia en 1.978 fué de 9,8 casos por 100.000 habitantes y, a partir de ese año, se produjo un paulatino incremento que llegó a hacer pensar en un no probado aumento de la TB en nuestro país. Sin embargo, este crecimiento, atribuible a una mayor declaración de casos, alcanzó su techo en 1.986, con una tasa de 35,6 casos por 100.000 habitantes, y descendió en 1.988 hasta una tasa oficial de 21 casos por 100.000 habitantes¹².

Ante esta situación, la incidencia de la TB en nuestro país, ha tenido que ser calculada por trabajos estimativos¹³ o basándose en datos proporcionados por regiones donde los programas de control han hecho funcionar los sistemas de declaración obligatoria^{14,15,16}. Quizás, el estudio que más se aproxima a la realidad de la situación de la enfermedad e infección tuberculosa en nuestro país, es el recientemente publicado por el Grupo de Trabajo de Tuberculosis e Infecciones Respiratorias (TIR) de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR)¹⁷.

1.1.4.1. Estado actual de la infección tuberculosa

La prevalencia estimada de infectados a los 6 años de edad en España en 1.988, era del 1%. A los 14 años, esta cifra se elevaba al 3,91%¹⁷. Este 1% a los 6 años, indicaría que continúa el declive del riesgo anual de infección en torno al 7% anual^{13,18-22}, disminución inferior a la que están experimentando el resto de los países desarrollados y que sitúa nuestros niveles de infección en los últimos lugares de este grupo de países^{1,21,22}.

La prevalencia de la infección tuberculosa en España, a la edad de 7 años y en el bienio 1.965-66, era del 7,17%, porcentaje que descendió hasta el 2,9% en 1.979-80 y situándose actualmente, en la ciudad de Barcelona, en torno al 0,97%¹⁹. Lo que sí parece claro, es que existen diferencias importantes entre las distintas regiones españolas, oscilando de zonas con baja prevalencia (Murcia, Baleares o Jerez de la Frontera) a zonas que duplican

e, incluso, triplican estas cifras (Bilbao, Galicia, La Linea de la Concepción o Cantabria)¹⁷.

El 3,91% de prevalencia global de la infección a los 14 años, situaría a nuestro país, según las tablas de Styblo y Sutherland²³, con un Riesgo Anual de Infección (RAI) de alrededor de 0,19-0,20.

1.1.4.2. Estado actual de la enfermedad tuberculosa

La incidencia de enfermedad en España en 1.988, estimada por el Grupo TIR¹⁷ sobre una población de 15.262.772 habitantes, ha sido de 35,7 casos por 100.000 habitantes.

En los últimos 4-5 años, la tasa de TB en nuestro país se ha estimado cercana a los 60 casos por 100.000 habitantes¹³. Esta cifra se aproxima a la comunicada por Caylá para Barcelona capital en 1.988¹⁵. Sin embargo, ambas tasas se refieren a estudios realizados en una ciudad industrial con una elevada población. El número de habitantes de una ciudad y su carácter industrial o no, influyen de forma importante en la incidencia de TB. Así, en 1.979 en Estados Unidos, esta tasa oscilaba de 23,1, en ciudades con una población superior a los 500.000 habitantes, a 9,6 cuando era inferior a los 100.000 ciudadanos¹. La incidencia media, para ese año y en aquel país fue de 12,6.

INTRODUCCION

No hay nada que haga suponer que la situación en España sea diferente. De este modo, Miret et al¹⁶ han evidenciado que, en el área 7 de Cataluña, la tasa en 1.988 ha oscilado de 52,19 en la población industrial, a 25,89 en la rural, con una media para el área de 38,62. Como se comentará posteriormente, en los estudios epidemiológicos llevados a cabo en nuestra isla, ocurre algo similar. Por todo ello, la incidencia mencionada de 35,7, aunque posiblemente sea ligeramente inferior a la real, es una cifra aproximativa que hay que considerar como un mínimo en nuestra morbilidad tuberculosa.

En Europa, nuestra tasa actual de 35,7 es similar a la comunicada, también para 1.988, por Italia (35,1) y Hungría (37,9). España se situaría en un nivel medio entre países con bajas tasas como Dinamarca (5,4), Holanda (6,2), Noruega (6,2), Islandia (6,4), Suecia (6,5), Inglaterra y Gales (10,2) y Escocia (10,7), y otros con elevada incidencia de la enfermedad como la U.R.R.S. (45,8), Polonia (48,9), Rumanía (56,1), Yugoslavia (59,4) y Portugal (61,3)¹¹. Nuestra tasa continúa siendo muy superior a la referida en Estados Unidos para 1.988^{24,25}, e inferior a la comunicada y calculada para los países del tercer mundo^{8,26}.

I.1.5. ESTADO ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS EN GRAN CANARIA

En la isla de Gran Canaria, se realiza todos los años una minuciosa búsqueda de los casos de TB diagnosticados en cualquiera de los centros

INTRODUCCION

sanitarios de la isla, tanto hospitales como consultas ambulatorias, ya sean de carácter público o privado. Con cada uno de los casos recogidos, se rellena un cuestionario que incluye datos de filiación, epidemiológicos, clínicos, diagnósticos, terapéuticos y de evolución del enfermo.

En 1.988 se detectaron 214 casos de enfermedad tuberculosa, lo que supuso una tasa de 32,26 por 100.000 habitantes¹². En 1.989 el número de casos descendió a 195, lo que corresponde a una tasa de 29,85 y supone un descenso anual del 7,5%. La mayor tasa de enfermos se encontró en el area del puerto de La Luz con 71,15, y la menor en el cuadrante suroeste de la isla con 21,25.

La tasa encontrada para Gran Canaria es notablemente superior a la notificada para el resto de España por las Autoridades Sanitarias, en base a los Sistemas de Declaración Obligatoria. Por el contrario, nuestra tasa es muy inferior a la de comunicada para los residentes de Barcelona capital en 1.988¹⁵ y a la estimada para España en algunos trabajos¹³. Esta diferencia, como ya se ha comentado, puede estar condicionada, al menos parcialmente, por la población y el carácter industrial de las zonas de estudio. Nuestros estudios también apoyan esta teoría.

La incidencia por grupos de edad para el año 1.989, expresado en cifras absolutas y en tasas por 100.000 habitantes, se detalla en la figura 1.

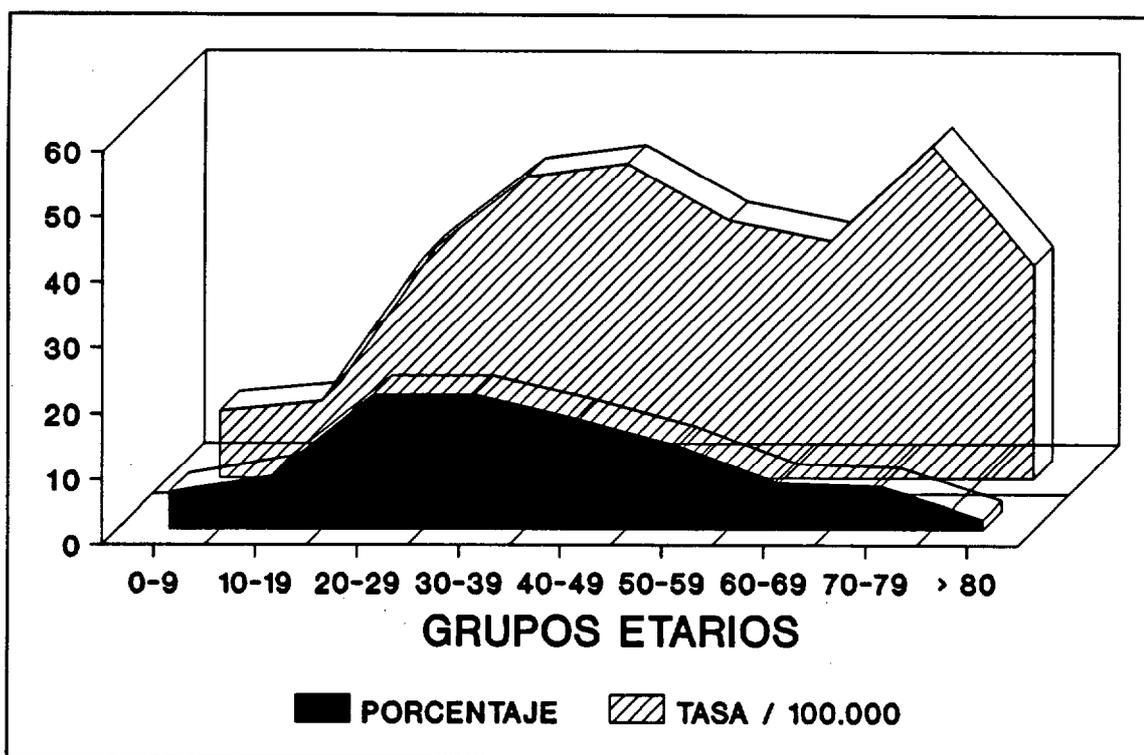


Figura 1. Incidencia de TB por grupos de edad en 1.989 en Gran Canaria.

Como se puede observar, se produce una curva distinta al valorar los grupos etarios en cifras absolutas o expresados en tasas. Al analizarlos por cifras absolutas, la curva representada es parecida a la estimada para 1.990 para los países en vías de desarrollo⁸, con un predominio de la enfermedad en las edades jóvenes y medias de la vida. Este dato ha sido comunicado en otros estudios sobre TB llevados a cabo en España^{14,16,27-29}, y es discordante con lo observado en los países desarrollados. En éstos últimos, la mayor incidencia de TB se encuentra en las edades más avanzadas^{1,30,31}.

Sin embargo, al expresar los grupos de edad de nuestros enfermos en tasas específicas, se produce un desplazamiento de la curva hacia edades más

INTRODUCCION

avanzadas, algo más parecido a lo que ocurre en el mundo desarrollado y opuesto a lo objetivado en Barcelona capital y en el resto de Cataluña^{15,32} (Ver figura 2).

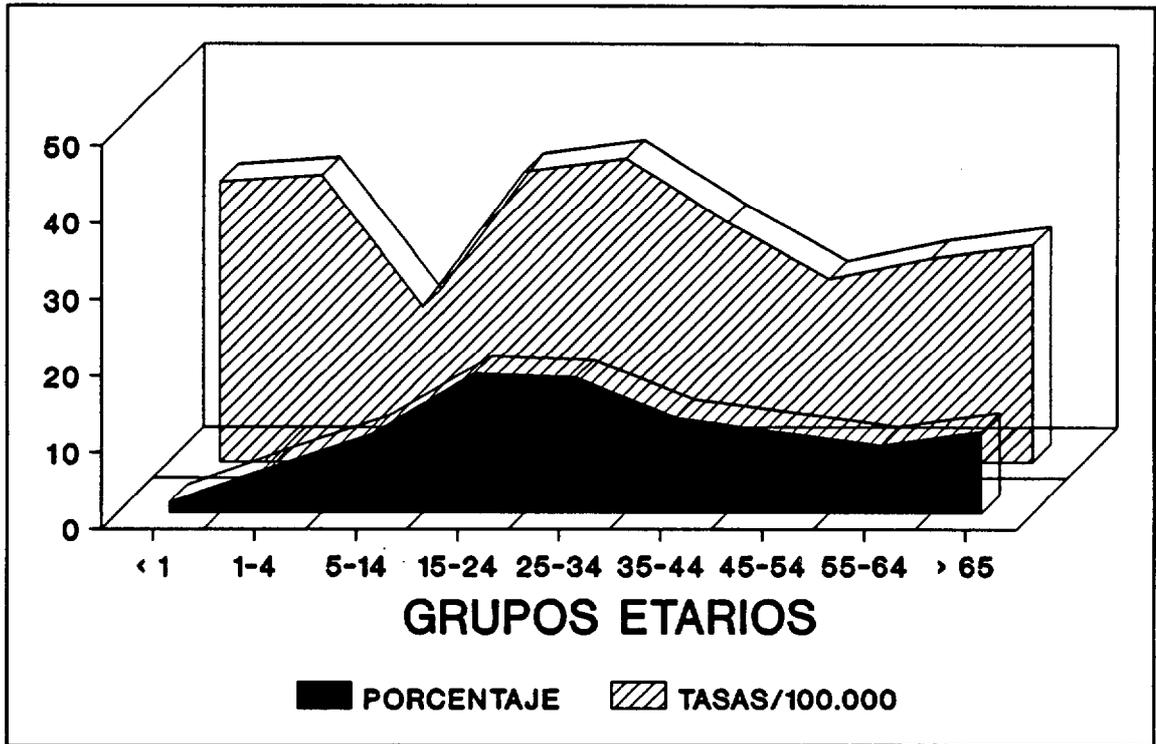


Figura 2. Incidencia de TB en distintos grupos etarios. Comparación de porcentajes y tasas por 100.000 habitantes, en Cataluña en los años 1.982-89. Tasa global 30,53.

Este dato, quizás, sugiera que nuestra situación epidemiológica es mejor que la de otras regiones españolas. La edad media de nuestros enfermos fué de 34,6 años en 1.988, teniendo el 62,15% de los mismos una edad inferior a los 40 años¹². En 1.989, la edad media fué de 37,51 y eran menores de 40 años el 54,28%.

En cuanto a la distribución por sexo, fué prácticamente igual en los dos

INTRODUCCION

años, con un marcado predominio de los varones, que en 1.988 constituyeron el 69,62% de la población estudiada y en 1.989 el 69,95%. Considerando las tasas, éstas eran de 45,62 y 19,9 para varones y hembras respectivamente. En la población normal de Gran Canaria la relación δ/φ es de 1:1, mientras que entre los enfermos tuberculosos fué de 2,29:1. Esta situación ha querido ser explicada en base a los, hoy todavía distintos, hábitos sociales del hombre¹⁴.

La relación δ/φ resultó inversa en la primera década de la vida (0,28:1), para pasar, en la segunda década, a 1,28:1. En la tercera década fué de 2,56:1. Al analizar conjuntamente la edad y el sexo, la situación encontrada es similar a la que ocurría en 1.978 entre los negros de Estados Unidos, con un predominio de las mujeres hasta los 15 años de edad, a partir de la cual, comienzan a ser lentamente superadas por los varones³³.

Sería, por tanto, una situación intermedia entre poblaciones con baja incidencia de TB, como los blancos americanos en quienes la distribución de sexo es homogénea hasta los 20 años de edad en que comienza el predominio de los varones³³, y zonas con elevadas tasas de TB, donde existe predominio de las mujeres desde el nacimiento hasta los 25 años en que se invierte la frecuencia^{34,35}. Este dato, de acuerdo con los estudios de Styblo³⁵, corrobora que Gran Canaria no es una zona con elevada incidencia de TB, ya que, si así fuera, la tasa de TB en mujeres de 15 a 25 años de edad sería tan alta como la de los hombres de la misma edad.

1.2 EPIDEMIOLOGIA DE OTRAS MICOBACTERIOSIS

Aunque la TB es la micobacteriosis más extendida en el mundo, existen otras micobacterias capaces de producir enfermedad en el ser humano y en los animales. A la cabeza de ellas se sitúa la lepra que, con una prevalencia mundial estimada en 10 millones de casos³⁶, también constituye un auténtico problema sanitario. En España, el censo de esta enfermedad es de 3.100 enfermos³⁷.

Además, en los últimos 100 años, se han descrito gran número de micobacterias que, aunque en su mayoría saprofitas y con poca capacidad patógena, pueden llegar a producir enfermedad en circunstancias especiales, casi siempre en relación con una disminución de los mecanismos de defensa del huésped³⁸. Debido a la epidemia ocasionada por el Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), algunas de estas micobacterias han adquirido gran relevancia, especialmente el complejo *M. avium-intracellulare* y el *M. kansasii*.

Este grupo de microorganismos también son importantes patógenos en los animales en los que, en otras épocas, llegaron a provocar auténticas epidemias. La enfermedad de Johne, producida por el *M. paratuberculosis*, la TB producida por el *M. bovis* e incluso por *M. tuberculosis* y la infección por *M. avium-intracellulare*, son los principales exponentes actuales de las micobacteriosis animales.

I.3. PROBLEMAS DIAGNOSTICOS DE LA TUBERCULOSIS Y DE OTRAS MICOBACTERIOSIS

Las enfermedades producidas por micobacterias plantean problemas diagnósticos importantes. En la TB, estos problemas están motivados, fundamentalmente, por el lento crecimiento del *M. tuberculosis* en los medios de cultivo y por la dificultad de obtener muestras válidas para su estudio en pacientes con enfermedad limitada o con localización extrapulmonar de la misma y en niños. En estos casos, para llegar a un diagnóstico de certeza, es necesario, con frecuencia, recurrir a técnicas agresivas.

El diagnóstico de la lepra se basa en una clínica cutánea y neurológica, en distintas pruebas de laboratorio (de la histamina, del lapiz tinta y de la lepromina), en estudios anatomopatológicos y en la bacteriología³⁹. Como sucede en toda enfermedad infecciosa, el diagnóstico no queda confirmado hasta que no se identifica el agente causal pero, en la lepra, por la dificultad que a veces encierra su aislamiento en los casos iniciales, el diagnóstico podrá establecerse por «la pérdida de sensibilidad en las lesiones cutáneas y el engrosamiento de los nervios», puesto que estos dos síntomas no se dan en ninguna otra afección dermatológica.

Además, en la lepra, el frotis directo de la muestra sólo es positivo en la forma lepromatosa de la enfermedad (LL), y el *M. leprae* no crece en los medios de cultivo habituales, necesitando su inoculación en el armadillo para la confirmación diagnóstica.

INTRODUCCION

Con el resto de las micobacteriosis humanas ocurre algo similar a la TB, ya que la mayoría de estas micobacterias son crecedoras lentas en los medios de cultivo y, con frecuencia, la obtención de especímenes válidos es difícil.

Por último, en las enfermedades animales producidas por estos patógenos, es frecuente tener que recurrir a técnicas agresivas o, incluso, al sacrificio del animal para la obtención de muestras.

I.4.METODOS DIAGNOSTICOS

I.4.1. FROTIS DIRECTO

El único método diagnóstico rápido en las micobacteriosis continúa siendo la visualización directa de la muestra a través del microscopio. Los procedimientos más utilizados para realizar esta baciloscopia son, fundamentalmente, la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) y el método de la fluorescencia. También se ha descrito recientemente el método de la gota gruesa fluorescente⁴⁰.

La tinción de ZN se basa en la resistencia de las micobacterias a la decoloración por los ácidos y el alcohol una vez teñidos con la anilina. Constituye un método rápido, sencillo de realizar y muy barato, cuya sensibilidad depende estrechamente del grado de extensión de la enfermedad (son necesarias más de 10^4 micobacterias/ml para que sea positivo)^{41,42} y, por supuesto, de la experiencia del microbiólogo que lo realiza⁴³. Así, en la TB pulmonar, la sensibilidad de esta técnica en el esputo oscila entre el 39% y el 79% según las distintas series^{41,42,44-48}; siendo del 20-40% en formas iniciales no cavitarias, del 60-70% en estadios intermedios y alcanzando hasta el 90-95% en fases avanzadas de la enfermedad (lesiones cavitarias)^{41,42}. Esta sensibilidad desciende de forma notable en las TB de localización extrapulmonar, destacando la baja rentabilidad de esta técnica en los diferentes tipos de serositis^{49,50}.

La especificidad de este método para la TB es muy elevada, ya que sólo se verá disminuida por la existencia de otros microorganismos que también sean bacilos ácido-alcohol resistentes. En este grupo se incluyen el resto de las micobacterias, nocardias, hongos, etc., aunque estos últimos no poseen forma bacilar. Por las características reseñadas es el procedimiento diagnóstico más frecuentemente utilizado en todo el mundo.

El método de la fluorescencia, al igual que el de ZN, se basa en la resistencia al ácido y al alcohol de las micobacterias, que se tiñen con un fluorocromo como la auramina y se decoloran con alcohol-clorhídrico. Se precisa un equipo similar al utilizado para la visualización por el método de ZN, pero con un microscopio de luz ultravioleta y con frascos de auramina y naranja de acridina en lugar de fucsina y azul de metileno. Tiene la ventaja de una mayor rapidez en la lectura, por lo que se pueden procesar más muestras por día que con el ZN convencional. La sensibilidad y especificidad son similares a la baciloscopia convencional, aunque algunos trabajos le atribuyen una mayor rentabilidad⁴³.

El método de la gota gruesa fluorescente⁵¹, supone una modificación de la técnica convencional de fluorescencia, usando una muestra más concentrada, en forma de gota gruesa (como en el paludismo). Los tiempos de tinción y decoloración también se modifican. El costo es el mismo que el de técnica de fluorescencia y, aunque el tiempo requerido para su realización es ligeramente superior (unos 30 minutos), se consigue una mayor rapidez de lectura por la mayor concentración de la muestra. Esta técnica se ha mostrado

mucho más sensible que la de ZN y también discretamente más específica⁴⁰.

En la lepra, como ya se ha mencionado previamente, la baciloscopia directa sólo es positiva en la LL. En este tipo de afección constituye, en la mayoría de los casos, la única herramienta diagnóstica disponible. El *M. leprae* se tiñe con la tinción de ZN, que es la que rutinariamente se utiliza, aunque también pueden emplearse las variantes Fite o Wade-Fite, o bien auramina con contraste con azul de Evans que eliminaría la fluorescencia parásita³⁹.

Las denominadas micobacterias atípicas son indistinguibles del *M. tuberculosis* en la baciloscopia directa, aunque la sensibilidad de esta técnica en este grupo de patógenos es inferior^{43,46}, debido, fundamentalmente, a que suelen ser formas menos bacilíferas.

1.4.2. CULTIVOS CONVENCIONALES

En la actualidad, es el único método que puede proporcionar el diagnóstico de certeza en la TB y en las otras micobacteriosis, excepto la lepra, ya que no se ha podido encontrar ningún medio en el que pueda crecer el *M. leprae*. Además de ser el procedimiento 100% específico, también es mucho más sensible que la baciloscopia. Esta última necesita de 10^4 a 5×10^4 bacilos por ml de muestra para ser positiva, sin embargo, los medios de cultivo pueden ser positivos con una cantidad de gérmenes 10 veces menor. El único y gran inconveniente es que, a excepción de las infrecuentes

INTRODUCCION

micobacterias de crecimiento rápido (*M. fortuitum* y *M. chelonae* fundamentalmente), en las que la lectura puede ser positiva al 5º-7º día, en la TB y en el resto de las micobacteriosis (las más importantes desde el punto de vista clínico), un resultado positivo no se puede esperar en menos de 20 días y, en la mayoría de los casos se precisan de 40 a 60 días. Es evidente que no conviene esperar tanto tiempo para iniciar un tratamiento y, por ello, se está intentando encontrar un método diagnóstico que pueda salvar esta dificultad.

El método de cultivo más utilizado es el de Löwenstein-Jensen (LJ) que utiliza fosfato monopotásico, sulfato de magnesio, citrato magnésico, asparagina, glicerol, fécula de patata, verde malaquita al 2%, agua destilada y huevo. Sin embargo, han sido múltiples los medios utilizados en los que se ha podido conseguir el crecimiento micobacteriano. Entre ellos destaca: Medio de Dubos, de Middlebrook 7H-9, Middlebrook 7H-10 agar, Löwenstein con pirúvico (favorece el crecimiento de *M. bovis*), Löwenstein con citrato de hierro amoniacal (CFA) (favorece el crecimiento de *M. haemophilum*), Coletsos, Stonebrink, Müller-Hinton y otros muchos medios diferenciales³⁹.

1.4.3. CULTIVOS RADIOMÉTRICOS

La microbiología clínica convencional de la TB y de las otras micobacteriosis presenta el problema de su laboriosidad y de su lentitud. Desde hace unos años existe en el mercado un sistema radiométrico

semiautomatizado, el BACTEC 460 TB[®] (Johnston Lab), que intenta solucionar el problema de la demora en la obtención de resultados.

Los primeros trabajos para determinar automáticamente el metabolismo bacteriano, midiendo la conversión de un substrato marcado con Carbono 14 (C-14) en CO₂ marcado, corresponden a De Land y Wagner, si bien la aplicación de estas técnicas en la detección del crecimiento de *M. tuberculosis* fue hecha por Cummings y Middlebrook et al. Posteriormente McClatchy estudió la sensibilidad a antimicrobianos. Aunque hay diferentes tipos de métodos, el más utilizado en la actualidad es el referido BACTEC 460 TB[®] que está especialmente calibrado para medir el índice de crecimiento del *M. tuberculosis*³⁹.

La principal ventaja de este sistema es su rapidez. En menos de una semana se puede disponer del 90% de los resultados totales de cultivo y de un estudio de resistencias, representando, en el peor de los casos, un ahorro de 20 días, en comparación con el clásico de las Proporciones^{39,52-54}. Como inconvenientes se podría mencionar su elevado costo, la necesidad de una instalación adecuada para manejar isótopos radioactivos, tener que procesar gran número de muestras para que sea rentable y los posibles problemas de contaminación que pueden retrasar el proceso. En relación a su fiabilidad, este sistema ha sido suficientemente contrastado y parece tener una sensibilidad y una concordancia con los sistemas convencionales de cultivo del 97%³⁹.

I.4.4. INOCULACION EN ANIMALES

En la actualidad, ante un producto sospechoso de micobacteriosis, la inoculación en cobayas con fines diagnósticos no resulta definitiva. Además del *M. tuberculosis* y del *M. bovis* resistente a isoniacida (INH), hay otras micobacterias atípicas que no producen enfermedad progresiva en el animal y sí cuadros patológicos en el hombre (*M. kansasii*, *M. avium*, etc). No obstante, en productos líquidos con pocos bacilos [líquido cefalorraquídeo (LCR), orina, etc.], constituye un procedimiento que completa el estudio microbiológico.

Su realización requiere varias etapas. El sedimento concentrado y neutralizado de la muestra se suspende en 1 cm³ de agua destilada estéril y se inyecta, por vía subcutánea o por vía parenteral, a dos cobayas que hayan tenido negativo el test de la tuberculina. Los animales inoculados serán examinados semanalmente mediante drenaje de los ganglios linfáticos regionales para ver si presentan hipertrofia. Hay que buscar también lesiones profundas que, de presentarse (*M. tuberculosis* o *M. bovis*), indican una enfermedad progresiva con aparición de ganglios caseosos e infección de bazo, hígado y pulmones. A las cuatro semanas, uno de los cobayas será sometido a la prueba de la tuberculina.

En la mayoría de los casos, un animal afectado de TB, estará tan sensibilizado que morirá en un plazo de 1-2 días. Si la reacción tuberculínica resulta negativa, se dejarán transcurrir otras 4 semanas más y se sacrificará

al animal para hacerle la autopsia. Serán examinados mediante ZN todos los tejidos que muestren alteraciones patológicas (sobre todo ganglios linfáticos, bazo, hígado y pulmones)³⁹.

En el caso del *M. leprae*, los animales que han sido inoculados con éxito son el ratón (en la almohadilla plantar), el armadillo de nueve bandas y el mono. No obstante, estos animales no se usan en el diagnóstico rutinario, sino sólo en centros de investigación o para intentar preparar vacunas³⁹.

1.4.5. TIPIFICACION DE MICOBACTERIAS

En primer lugar se tiene que proceder a la identificación del género *Mycobacterium* y a su diferenciación de los otros géneros. Para ello se utiliza: La capacidad de mantener su propiedad de resistencia a la decoloración tras la tinción directa de los cultivos (las nocardias, como otras micobacterias de crecimiento rápido, pierden parcial o totalmente esta propiedad), el cultivo de la cepa sobre un medio (Sabouread agar o Dubos agar) para que crezcan colonias asiladas y, finalmente, la reducción del paranitrofenol, prueba que, si es positiva, sugiere la presencia de nocardias y si es negativa la de micobacterias de crecimiento rápido⁵⁵.

En segundo lugar hay que proceder a la identificación de las distintas especies de este género. Para ello, se pueden utilizar métodos bacteriológicos y métodos bioquímicos.

Los métodos bacteriológicos simples son:

- La emulsionalidad de las colonias de la cepa que se quiere identificar (generalmente el *M. tuberculosis* es muy difícil que emulsione en agua, al contrario de lo que sucede con las otras micobacterias).

- Morfología y tinción de las micobacterias.

- Prueba de la termorresistencia (positiva el *M. phlei* y el *M. thermoresistibile*).

- Formación de cordones (se ha relacionado con las micobacterias de mayor virulencia).

- Crecimiento en los diferentes medios de cultivo relacionados previamente (el *M. tuberculosis* necesita medios muy enriquecidos, a diferencia de otras micobacterias).

- Pigmentación de las colonias. Según su capacidad para pigmentarse se distinguen tres grandes grupos de micobacterias: Las fotocromógenas que, tras su exposición a la luz y posterior incubación, adquieren una pigmentación amarilla o rosada (son fundamentalmente el *M. kansasii* y el *M. marinum*), las escotocromógenas que se pigmentan en la oscuridad sin necesidad de fotoinducción (por ejemplo el *M. scrofulaceum* y *M. vaccae*), o las no cromógenas, que no se pigmentan (el *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. avium-intracellulare*, principalmente).

- La velocidad de crecimiento constituye un buen elemento para una primera clasificación orientativa de las micobacterias. De acuerdo con este criterio se pueden dividir en: Las que crecen rápidamente, en menos de 7 días (*M. fortuitum* y *M. chelonae*) y las de crecimiento lento, que lo hacen en más de 7 días. Dentro de estas últimas, hay algunas micobacterias que crecen en

INTRODUCCION

un período de 7 a 10 días (*M. kansasii*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, etc.), denominadas de crecimiento intermedio por algunos autores, y otras como *M. tuberculosis* y *M. bovis*, que tardan más de 15-20 días e, incluso, varios meses.

- Temperatura óptima de crecimiento. La mayoría de las cepas crecen bien a 37 °C, pero hay algunas que pueden hacerlo a otra temperatura y este hecho puede servir para su diferenciación.

- Apetencia de oxígeno. Por este método se podría diferenciar el *M. tuberculosis* (aerobio) del *M. bovis* (microaerófilo) utilizando un cultivo semisólido complejo.

Los métodos bioquímicos utilizados para la tipificación de las distintas micobacterias son:

- Prueba de la niacina. Un resultado positivo es altamente sugestivo de *M. tuberculosis*, siendo esta prueba negativa para la gran mayoría de las micobacterias, incluyendo *M. bovis*, *M. avium-intracellulare* y *M. fortuitum*.

- Prueba de la catalasa caliente. Se obtiene un resultado positivo para *M. avium-intracellulare* y *M. fortuitum*, y negativo para *M. tuberculosis* y *M. bovis*.

- Prueba de la reducción de los nitratos. Es positiva para *M. tuberculosis* y negativa para la práctica totalidad de las otras micobacterias.

- Prueba de resistencia a la hidracida de ácido 2-tiofenocarboxílico (TCH). Son sensibles el *M. bovis* y *M. africanum*, y resistentes las demás micobacterias (incluida *M. tuberculosis*).

- Prueba de la arilsulfatasa. Es ligeramente positiva para el *M. avium-*

intracellulare, *M. fortuitum* y algunas otras micobacterias de excepcional presentación, y negativa para el *M. tuberculosis* y *M. bovis*.

- Crecimiento en medio de McConkey agar.
- Prueba de la hidrolisis de Tween 80.
- Prueba de la reducción de telurito potásico.
- Sensibilidad al ácido pipemídico.
- Crecimiento en medio de Sauton agar.
- Prueba de la sensibilidad al ácido Paranitrobenzoico (PNB).

1.4.6. ESTUDIOS SEROLOGICOS

El intento por lograr un test diagnóstico rápido e incruento que solucionase todos los problemas que plantean las distintas técnicas mencionadas, ha motivado el desarrollo de los estudios serológicos en la TB y otras micobacteriosis. En 1.898, sólo 16 años después de que Robert Koch identificara el bacilo tuberculoso, Arloing⁵⁶ desarrolló un test de aglutinación con resultados positivos en el 57% de los pacientes tuberculosos estudiados y en el 11% de los que constituían su grupo control, formado por sujetos sanos o con otro tipo de afección. Seis años después, el mismo autor⁵⁷ publicó otro estudio y, en 1.918, Brown y Petrof⁵⁸ utilizaron la técnica de fijación del complemento, con un filtrado de cultivo de micobacterias como antígeno (Ag), en el primer intento a gran escala de diagnóstico serológico de la TB.

Desde entonces, han sido múltiples los trabajos realizados y las técnicas empleadas, destacando, en este aspecto, la auténtica revolución que ha supuesto la introducción del enzimoimmunoensayo (ELISA), técnica descrita en 1.962 por Engvall y Perlmann⁵⁹, y aplicada por primera vez en el serodiagnóstico de la TB en 1.976 por Nassau et al⁶⁰. En la segunda parte de esta tesis se estudiará en profundidad este tema.

I.4.7. MÉTODOS BASADOS EN LOS ACIDOS NUCLEICOS PARA LA DETECCION DE MICOBACTERIAS

El desarrollo observado en el campo de la biología molecular ha permitido la elaboración de una nueva tecnología con métodos que son radicalmente diferentes de las técnicas convencionales microbiológicas e inmunológicas. En los últimos años se han evaluado diversos métodos basados en la detección específica de los ácidos nucleicos micobacterianos, y algunos de ellos parecen encontrarse en buen camino de poder cumplir los requisitos requeridos de rapidez, sensibilidad y especificidad.

El material genético o genoma de casi todos los microorganismos está compuesto por ácido desoxirribonucleico o ADN. Este ADN codifica las propiedades físicas de los organismos y se compone de dos hebras, unidas una alrededor de la otra en forma de doble hélice. En ambas hebras opuestas, los nucleótidos se localizan unos frente a otros y se mantienen unidos mediante enlaces electroquímicos débiles, que pueden disociarse bajo ciertas

INTRODUCCION

condiciones como temperatura elevada. La estabilidad se logra mediante un apareamiento fijo, de tal forma que una molécula de adenina de una de las hebras siempre se apareará con una molécula de timina presente en la otra hebra, y viceversa. Cuando se conoce la secuencia de una hebra de ADN, puede predecirse la secuencia complementaria de la otra, pudiendo utilizarse esta propiedad para la detección e identificación de los ácidos nucleicos de algún microorganismo particular; en otras palabras, para fines diagnósticos. Los dos test diagnósticos que se conocen en la actualidad son la reacción de hibridación y la reacción en cadena de la polimerasa (RCP).

La reacción de hibridación consiste en poder obtener cantidades cuantificables de segmentos o secuencias puras de ADN de una determinada micobacteria, para que puedan ser utilizados como sondas que detecten específicamente el ADN de este microorganismo en una mezcla de ADNs (ADN humano, ADN proveniente de la flora saprófita contaminante de la faringe, etc.), extraída del esputo de un paciente tuberculoso. Bajo condiciones experimentales apropiadas, la sonda de ADN puede asociarse con el ADN en estudio, denominándose a este proceso hibridación, debido a que el nuevo fragmento de doble hebra es un híbrido compuesto del ADN original y de la sonda complementaria. La identificación del nuevo híbrido se consigue mediante el marcaje previo de la sonda de ADN⁶¹. El mayor problema que presenta en la actualidad esta técnica de hibridación es que necesita un elevado número de gérmenes en la muestra para que se produzca la codificación, por lo que su sensibilidad sobre las muestras directas es incluso inferior a la del frotis directo. Por todo ello, actualmente sólo son válidas para

la identificación de las distintas micobacterias en los medios de cultivo.

La RCP se basa en la utilización de las polimerasas, que son las enzimas responsables de la síntesis de la hebra complementaria de una molécula de ADN de hebra simple. Estas enzimas polimerizan los nucleótidos libres generando secuencias complementarias. Por lo tanto, en la PCR se combina de manera muy fructífera el fenómeno de la disociación y reasociación, descrito previamente, con la amplificación de una de las hebras del ADN analizado. Sin embargo, para poder efectuar la RCP, además de la polimerasa, necesitamos los precursores nucleótidos, que nos permitirán construir la hebra complementaria, y los llamados iniciadores, es decir, secuencias cortas de aproximadamente 20 nucleótidos cada una, que pueden asociarse con la hebra simple del ADN estudiado y actuar como punto de iniciación para la polimerasa. Este proceso de multiplicación se puede repetir en muchas ocasiones y, debido a la naturaleza geométrica de este proceso de replicación, al cabo de varias horas (y de 30 a 40 ciclos de algunos minutos de duración cada uno), se obtiene una amplificación, de alrededor de un millón de veces, de la secuencia de ADN estudiada. Después de este proceso de amplificación es fácil poder detectar e identificar la micobacteria causante de la afección. El único problema que parece presentar este método diagnóstico es su falta de especificidad. Además, habrá que discernir si es capaz de diferenciar entre infección y enfermedad tuberculosa⁶¹.

I.5. INMUNOLOGIA DE LAS ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR MICOBACTERIAS

La inmunidad de la TB está mediada fundamentalmente por los linfocitos T, los cuales, en respuesta a una estimulación antigénica específica, liberan distintas linfoquinas que estimulan la fagocitosis y la lisis de las micobacterias^{62,63}.

La inmunidad humoral, codificada por los linfocitos B, es menos importante en la patogenia de la TB. Aunque se reconoce su existencia⁶⁴, su papel no está suficientemente aclarado y los estudios clínicos muestran resultados contradictorios⁶⁵. La respuesta humoral primaria contra esta enfermedad parece consistir en un incremento inicial de la inmunoglobulina (Ig) M^{66,67}, seguido por un aumento persistente de anticuerpo (Ac)s de la clase IgG⁶⁸. También se ha descrito una elevación de la IgA en pacientes con TB activa y se ha sugerido que su nivel se correlaciona con la extensión de la enfermedad, disminuyendo a medida que el tratamiento logra controlar la infección^{63,68}. Sin embargo, el papel de estos Acs en la inmunidad de la TB no está claro. Generalmente, los pacientes con enfermedad avanzada presentan hipergammaglobulinemia policlonal⁶⁵, y parece existir una relación por la cual, un incremento de la actividad de los linfocitos B y de su capacidad de producir Acs, va asociado a una menor actividad de los linfocitos T y, por tanto, a un determinado grado de anergia^{64,69}. Por ello, al estado de la inmunidad humoral en la TB se le ha concedido importancia en el pronóstico de la enfermedad^{64,70}. Todo lo expuesto anteriormente, tal vez pueda explicar porqué los mejores

INTRODUCCION

resultados en el diagnóstico serológico de la TB se han obtenido detectando IgG, y los peores con la cuantificación de IgM debido a que, generalmente, cuando el paciente es diagnosticado, su enfermedad lleva varias semanas de evolución. Con los test serológicos tratamos de detectar la respuesta humoral a los Ags micobacterianos, reacción inmunitaria no conocida con exactitud en la actualidad y que se presupone de escasa importancia en la TB.

Los estudios inmunológicos sobre la lepra indican que cada una de las formas de esta enfermedad presenta un espectro diferente. La LL se caracteriza, típicamente, por ser muy bacilífera y por una respuesta inmunológica mediada por linfocitos B que puede ser policlonal e inespecífica. La lepra tuberculoide (LT), sin embargo, contiene pocos bacilos y la respuesta inmunológica está mediada, fundamentalmente, por linfocitos T^{36,71}. Existen, además, formas intermedias de la enfermedad. Todo ello podría explicar los mejores resultados de los tests serológicos en la LL.

I.6. CARACTERISTICAS DE LOS TESTS SEROLOGICOS

La mayoría de los estudios sobre serología en las micobacteriosis han utilizado técnicas que son capaces de medir la cantidad de Acs que se ligan a un Ag seleccionado previamente. Sin embargo, en otras ocasiones, se han utilizado Acs para tratar de detectar un Ag micobacteriano, siendo ésta la prueba que más se ha empleado sobre muestras biológicas diferentes al suero, como LCR⁷²⁻⁷⁷, líquido pleural^{75,78}, ascítico⁷⁵ e, incluso, sobre esputo⁷⁹. En cualquier caso, los resultados obtenidos van a depender de la técnica empleada, del Ag seleccionado y de los Acs medidos.

La sensibilidad de las pruebas serológicas depende, fundamentalmente, de la técnica empleada y la especificidad del Ag utilizado^{36,80}. Cuando se realiza un test serológico se van a obtener grupos de «positivos» y «negativos» claros, en base a los niveles encontrados de Acs; pero, en la zona intermedia, se situará todo un rango de valores con poca variación. Es preciso, por tanto, establecer un nivel discriminativo o punto de corte que permita la separación de «positivos» y «negativos». Este nivel de Acs discriminativo es más elevado en regiones con endemia importante de TB⁸¹⁻⁸³, por lo que cada región debe calcular su propio nivel. Así, se ha podido demostrar que los pacientes bolivianos, incluidos en el estudio de TB de Benjamin y Daniel⁸⁴, tenían un título más alto de Acs que los procedentes de los Estados Unidos, y que los sujetos sanos de la India presentaban títulos cuatro veces superiores a los del centro de Europa⁸⁵. Por lo tanto, el cálculo de este punto de corte tiene gran importancia e influye directamente sobre la sensibilidad y la

especificidad de la prueba^{36,84-87}.

Los estudios serológicos realizados en regiones del Tercer Mundo, con una elevada prevalencia de TB, han sido más sensibles que los realizados en zonas donde la TB es infrecuente^{36,83,84,88}. En el primero de los casos la sensibilidad ha oscilado entre el 70% y el 80%, y en el segundo entre el 60% y el 70%. Este hecho se ha relacionado con el grado más avanzado y crónico de la enfermedad en el momento del diagnóstico, en los países en vías de desarrollo.

El cálculo del valor predictivo positivo (VPP) y del valor predictivo negativo (VPN) de estas técnicas, aunque se ha comunicado en muchos trabajos, ofrece una información sesgada ya que, en la mayoría de ellos, se ha valorado sobre pacientes con TB probada o con sospecha de esta enfermedad y con grupos control muy seleccionados. Desgraciadamente se han realizado muy pocos estudios de rastreo sobre amplios grupos de población^{45,85,89}.

I.7. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS EMPLEADAS

El primer test serológico utilizado en el diagnóstico de la TB fue la aglutinación directa⁵⁶. En los 90 años transcurridos desde entonces, se han empleado técnicas de aglutinación, de precipitación, de fijación de complemento y de inmunoanálisis con indicadores marcados.

I.7.1 TÉCNICAS DE AGLUTINACION

Dentro de este grupo, la técnica más empleada ha sido la hemaglutinación⁹⁰⁻⁹⁶, aunque también se ha utilizado la aglutinación directa^{56,97}, la aglutinación de látex^{98,99}, caolín aglutinación¹⁰⁰ y los tests de floculación con bentonita¹⁰¹ y de titulación globulínica¹⁰².

En general, los trabajos realizados utilizando la hemaglutinación como test diagnóstico, han mostrado un porcentaje elevado de falsos positivos entre los contactos cercanos a los tuberculosos y entre los controles tuberculín positivos^{92,93,95,96}. Esto ocurría tanto si se usaban Acs no purificados^{93,96} como purificados⁹⁵, aunque, en éstos últimos, el número de falsos positivos era menor y, por tanto, mejoraba la especificidad del test. Con esta técnica, se obtenían títulos más elevados de Acs entre los controles sanos con intradermorreacción positiva a la tuberculina que entre los que presentaban esta prueba negativa^{92,93}, no diferenciando correctamente entre enfermos e infectados. Algunos autores han encontrado una buena correlación entre la

INTRODUCCION

hemaglutinación y el ELISA^{90,91}, comunicando, algunos de ellos, resultados excelentes⁹¹.

En la mayoría de los trabajos, la sensibilidad de esta técnica ha oscilado entre el 47,4%⁹⁵ y el 70%⁹⁸. Reggiardo et al⁹⁵ logran que esta sensibilidad alcance el 82,5% al realizar la prueba con tres glicolípidos micobacterianos como Ags. En este trabajo, el 21% de los sujetos en contacto estrecho con pacientes tuberculosos fueron falsos positivos. Esta cifra es similar a la obtenida por Hall y Manion⁹² en sus controles sanos tuberculín positivos, y se eleva hasta el 84% en los contactos cercanos tuberculín negativos en la serie de Mitchison et al⁹⁶. No obstante, en este último trabajo, la utilización de un Ag bacilar crudo, puede haber influido en los resultados.

Con las restantes técnicas de aglutinación ocurre algo similar a lo descrito para la hemaglutinación⁹⁸, si bien, Nichols⁹⁷ comunicó una sensibilidad del 87% y una especificidad del 100% utilizando un test de aglutinación directa.

1.7.2 TÉCNICAS DE PRECIPITACION

Los test de precipitación empleados en la serología de las micobacteriosis han sido múltiples: Inmunodifusión^{103,104}, microinmunodifusión^{105,106}, doble difusión en gel¹⁰⁷, precipitación en gel¹⁰⁸ y doble difusión en agar¹⁰⁹. La sensibilidad de estas técnicas es baja^{105,106}, y

aunque se ha descrito un incremento en los títulos de Acs en los pacientes tuberculosos a lo largo del tratamiento^{105,106}, no se han encontrado diferencias entre los controles sanos tuberculín positivos y los negativos^{105,107}. Además, a pesar de que en estos trabajos no se ha detectado influencia del estado tuberculínico, si se ha objetivado títulos altos de Acs en un porcentaje importante de pacientes con sarcoidosis¹⁰³⁻¹⁰⁵ y con lupus eritematoso sistémico¹⁰⁵. Kaplan y Chase¹⁰⁵, utilizando la microinmunodifusión, comunicaron un 46% de «positivos» entre los pacientes con TB primaria y un 66% entre los que padecían una TB por reactivación de lesiones antiguas. Estos porcentajes se elevaban al 60% y 75% respectivamente con el tratamiento antituberculoso. También en este último trabajo, se obtenía un test positivo en el 33% de los pacientes con lupus y en el 10% de los que padecían sarcoidosis.

1.7.3. TECNICAS DE FIJACION DEL COMPLEMENTO

En 1.903 Bordet y Gengou¹¹⁰ publicaron un estudio llevado a cabo en animales y en el que utilizaron una reacción de fijación del complemento para detectar Acs, usando como Ag bacilos tuberculosos enteros. Con posterioridad, Brown y Petrof⁶⁸ aplicaron la misma técnica en humanos con TB pulmonar, empleando como Ag un filtrado de cultivo de micobacterias. Este test se ha utilizado muy poco, a pesar de que con él se aislaron y purificaron los fosfatidil-inositol manósidos¹¹¹, Acs semipurificados empleados con éxito en los últimos tiempos en el diagnóstico serológico de la TB.

I.7.4. TECNICAS DE INMUNOANALISIS CON INDICADORES MARCADOS

En este grupo se incluyen las dos técnicas más utilizadas en el serodiagnóstico de las micobacteriosis, el radioinmunoanálisis (RIA) y las pruebas inmunoenzimáticas. A este grupo también pertenecen el test del Ag soluble fluorescente^{112,113} y dos pruebas que se sitúan entre las técnicas de precipitación y las de isótopos radioactivos: la radioinmunodifusión¹¹⁴ y la radioinmunolectroforesis^{114,115}.

I.7.4.1. Radioinmunoanálisis

En la última década, el RIA se ha utilizado con frecuencia tanto en el diagnóstico serológico de la TB¹¹⁶⁻¹¹⁹ como de la lepra¹²⁰. Aunque la sensibilidad de la técnica es superior a la de las pruebas descritas anteriormente, se han comunicado gran número de falsos positivos entre los controles tuberculín positivos¹¹⁸ y, sobre todo, en formas inactivas de la enfermedad tuberculosa^{118,119}. Winters y Cox¹¹⁸ encontraron diferencias significativas entre las TB activas y los controles tuberculin negativos y no las comprobaron, por contra, entre las TB activas e inactivas. Carret et al¹¹⁹ describieron positividades en el 67% de sus pacientes con TB activa y, también, en el 31% de los sujetos con TB inactiva. Por lo tanto, en la TB, esta técnica no es capaz de diferenciar con claridad entre formas activas e inactivas de la enfermedad. Sólo Zeiss et al¹¹⁶, aplicando esta misma técnica, han objetivado claras diferencias entre TB y controles intradermorreacción

tuberculínica positiva.

1.7.4.2. Técnicas Inmunoenzimáticas

En 1.972, Engvall y Perlmann⁵⁹, describieron la técnica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) caracterizada por ser altamente sensible, fácilmente reproducible, no requerir instrumentación sofisticada y utilizar reactivos baratos. El método directo detecta la unión del Ac al Ag que se encuentra, normalmente, fijado a un absorbente en fase sólida. Desde su descripción, su uso se ha generalizado en el diagnóstico serológico de las enfermedades infecciosas.

Esta técnica se utilizó por primera vez en el diagnóstico de la TB en 1.976, revolucionando la historia de la serología en la TB y demás micobacteriosis⁶⁰. Al mejorar considerablemente la sensibilidad, se realizaron gran número de estudios con Ags cada vez más purificados, contribuyendo con ello a una notable mejoría de la especificidad.

Los resultados de esta prueba pueden expresarse de distintas formas¹²¹. Los valores pueden referirse como densidades ópticas (DO) medidas según el color final emitido en la reacción. Si estas DO se comparan con las obtenidas a partir de unos sueros de referencia, el resultado final podrá ser expresado en índice de DO.

Además del ELISA directo, ya comentado, también se ha utilizado el ELISA de inhibición competitiva⁷¹ y el ELISA sandwich^{71,72,79,122} para detectar Ags micobacterianos en suero¹²² y otras muestras biológicas humanas^{71,72,79} o animales¹²³.

I.7.4.3. Otras técnicas de inmunoanálisis

La radioinmunodifusión y la radioinmunolectroforesis tampoco han sido capaces de diferenciar claramente entre TB activas e inactivas, aunque sí encuentran títulos más elevados en éstas que en los controles sanos¹¹⁴.

En cuanto a la técnica del Ag soluble fluorescente, Chawla et al¹¹³ la comparan con el ELISA en su estudio sobre TB intestinal y encuentran que, aunque existía una buena correlación entre las dos técnicas, el ELISA era más discriminativo.

I.8. ANTICUERPOS ESTUDIADOS

A excepción de la lepra, en la TB y en el resto de las micobacteriosis humanas y animales, los valores más discriminativos para el diagnóstico de las mismas, se han obtenido determinando la proporción de IgG que se liga a un Ag preseleccionado. Como se verá más adelante, esta Ig es la que se ha detectado en la mayoría de los trabajos publicados, aunque en algunos estudios también se se ha determinado IgM e IgA. Curiosamente, en la lepra, ha sido la IgM la Ig con la que se han obtenido mejores resultados.

I.8.1. INMUNOGLOBULINA A

En la TB los resultados obtenidos con esta Ig son peores que los conseguidos con IgG^{81,82,124-126}, aunque son más discriminativos que los que se obtienen con IgM^{81,82}. Al utilizar un ELISA, la IgA logra diferenciar entre pacientes tuberculosos y sujetos control^{125,126} e, incluso, aumenta el poder discriminativo del test con respecto a la determinación única de IgG^{82,108,126}.

No obstante, hay que reseñar que, además de en la TB, también se han encontrado títulos elevados de esta Ig en sarcoidosis^{81,103,104}, en micobacteriosis humanas no tuberculosas^{125,126} y, sobre todo, en pacientes con enfermedad de Crohn⁸¹, donde los títulos han sido incluso superiores a los obtenidos en la TB. Raja et al¹²⁶ también realizaron el test en lavado broncoalveolar, encontrando que, tanto la IgG como la IgA, se ligaban a Ags

micobacterianos en niveles similares a como lo hacían en suero. Estos autores concluyeron que la presencia de IgA en esta muestra podría sugerir que la inmunidad local de la mucosa está garantizada.

I.8.2. INMUNOGLOBULINA M

La detección de IgM específica es la que peores resultados ofrece en el serodiagnóstico de la TB^{81,82}. Además de que los títulos obtenidos son similares a los controles⁸¹, también se detectan valores altos en la sarcoidosis^{103,104} y en la enfermedad de Crohn⁸¹ aunque, en esta última, los títulos son inferiores a los alcanzados por la IgA.

Por el contrario, como se verá más adelante, los mejores resultados en la lepra se han obtenido detectando IgM frente a Ag glicolípido fenólico I extraído del *M. leprae*¹²⁷. Por ELISA, la detección de IgM específica frente a este Ag, ha dado resultados excelentes¹²⁸⁻¹³⁰, con sensibilidad superior al 85% y especificidad del 100%¹²⁸ y, por supuesto, con títulos mayores a los obtenidos con IgG e IgA¹³⁰⁻¹³². No obstante, Brett et al¹³³, utilizando este Ag, encontraron mejores resultados con IgG que con IgM. También ha dado buenos resultados la detección de IgM frente a epítomos seleccionados de este Ag, aunque inferiores a los obtenidos cuando se emplea glicolípido fenólico I completo¹²⁹. Por último, en algunos trabajos sobre lepra en los que se usaron Ags no purificados del *M. leprae*, comunes por tanto a otras especies micobacterianas^{120,134,135}, la detección de IgG se mostró útil, siendo, incluso,

su rentabilidad superior a la obtenida con IgM¹²⁰.

I.8.3. INMUNOGLOBULINA G

Ha sido la Ig con la que se han conseguido títulos más elevados y discriminativos, tanto en los estudios sobre serología de TB, como en otras micobacteriosis humanas y animales, a excepción de la lepra. Por ello, son múltiples los trabajos que han tratado de cuantificar esta IgG y se comentarán cuando abordemos las distintas afecciones en las que se ha empleado.

1.9. ANTIGENOS UTILIZADOS

Las distintas sustancias que se han empleado en el diagnóstico serológico de la TB contienen determinantes antigénicos comunes a otras especies micobacterianas e, incluso, a otros géneros de microorganismos tales como nocardias, corinebacterias, etc.¹³⁶⁻¹³⁸. Como consecuencia de ello, se producen reacciones cruzadas que dan lugar a una serie de falsos positivos que disminuyen la especificidad del test^{36,62}. En este contexto hay que destacar que, utilizando inmunoelectroforesis cruzada, se han identificado al menos 20 determinantes antigénicos comunes en cada una de las siguientes especies micobacterianas: *M. tuberculosis*^{139,140}, *M. bovis BCG*¹⁴¹⁻¹⁴³, *M. smegmatis*¹⁴⁴, *M. leprae-murium*¹⁴⁵, *M. simiae*¹⁴⁶ y *M. leprae*^{147,148}.

También hay que tener en cuenta que, tanto humanos como animales tienen contactos frecuentes con micobacterias ambientales no patógenas que, sin embargo, poseen determinantes antigénicos comunes al resto de las micobacterias y frente a los que se pueden producir bajos niveles de sensibilización^{36,149}. Por lo tanto, para poder obtener una especificidad del 100%, sería necesario aislar un Ag que sólo estuviera en la micobacteria que produce la enfermedad estudiada³⁶.

En la TB, los sucesivos estudios efectuados han permitido seleccionar Ags cada vez más purificados y específicos. En principio se usaron Ags bacilares crudos, destacando los numerosos trabajos del grupo de Grange y Kardjito^{81,82,150,151} utilizando preparados del Bacillus Calmette-Guérin (BCG), y

INTRODUCCION

los de Nassau et al⁶⁰ con filtrados de cultivo de *M. tuberculosis*. En los mejores resultados de estos estudios, la especificidad oscilaba entre el 95% y el 98%, porcentaje relativamente elevado si se tiene en cuenta que se han llegado a identificar cerca de 30 componentes antigénicos distintos en la *M. bovis*¹⁵². Con posterioridad se han realizado estudios con derivado proteico purificado (PPD), más específico, ya que los PPD usados no tienen más de 6 ò 7 determinantes antigénicos e incluso, la vieja tuberculina (old tuberculin) sólo tiene cinco¹⁵². A pesar de ello, la especificidad de estos tests ha oscilado también alrededor del 95%.

Los grupos que más han trabajado con PPD han sido el de Zeiss, Kalish y Radin^{44,116,124,153,154}. Cabe destacar en los últimos años los esfuerzos encaminados a obtener Ags purificados y específicos. Los mejores resultados en este sentido los han obtenido Daniel y Anderson¹⁵⁵ quienes han aislado el Ag 5 que parece encontrarse, tan solo, en el *M. tuberculosis* y en el *M. bovis*⁸⁴. Sin embargo, su proceso de obtención es laborioso y costoso, lo que hace que sea prácticamente imposible su uso rutinario y comercial. Estos mismos autores, con posterioridad han aislado el denominado Ag 6¹⁵⁶, menos específico que el anterior, pero más estable y sencillo de obtener. También se han obtenido buenos resultados con los 3 glicolípidos micobacterianos (SAG A₁, SAG B₁ y SAG C) aislados del *M. bovis BCG* por Reggiardo y Middlebrook¹⁵⁷.

En los últimos 3 años se han publicado varios estudios serológicos utilizando el Ag 60, purificado a partir de *M. bovis BCG* por Cocito y Vanlinden

INTRODUCCION

en 1.986¹¹⁷. Este Ag se localiza en el citoplasma y en la membrana celular de la micobacteria y, por fraccionamiento, en la porción ribosomal^{117,158}. Posee una estructura macromolecular termoestable y está compuesto por lípidos, lipopolisacáridos y lipoproteínas^{117,137,138,159,160}. Tiene la ventaja de ser un poderoso inmunógeno, capaz de inducir reacciones de inmunidad humoral y celular^{159,161}, y la de ser extraíble a gran escala⁹⁹, hecho que facilita su explotación comercial. Sin embargo, presenta el inconveniente de ser un Ag común a la práctica totalidad de las micobacterias, siendo el principal determinante antigénico del BCG, del PPD y de la llamada «tuberculina vieja»^{152,159}. Por lo tanto, no es un Ag específico, presentando reacción cruzada con otras micobacterias, por lo que su especificidad oscila del 95% al 98%, cuando los grupos control están formados exclusivamente por sujetos sanos¹⁵⁹. Desde hace más de dos años se dispone en el mercado del único test serológico para la detección de IgG específica frente a Ag 60 por ELISA. La sencillez de su realización ha suscitado un enorme interés y ha promovido la investigación en este campo de un gran número de grupos europeos.

En el diagnóstico de la lepra también se han utilizado múltiples Ags. De todos ellos, el más específico es el glicolípido fenólico I, purificado del *M. leprae* por Hunter et al¹²⁷ y que aporta una especificidad cercana al 100%^{58,128,162,163}. También se han utilizado, aunque con peores resultados, Ags aislados de cultivos de *M. smegmatis*, *M. vaccae*, *M. scrofulaceum*, *M. leprae*, *M. tuberculosis*, *M. bovis BCG*, *Corynebacterium diphtheriae* y *Corinebacterium xerosis*^{120,134,164}. Se han obtenido buenos resultados con los Ags obtenidos de cultivos crudos de *M. smegmatis*¹⁶⁴ y con el arabinmannan

de esta micobacteria¹³⁵. Todos ellos, al tratarse de Ags no purificados, disminuyen notablemente la especificidad del test, con falsos positivos entre contactos sanos de leprosos¹²⁰, en pacientes afectados de TB^{134,135} e, incluso, en voluntarios que han sido vacunados con BCG meses antes¹³⁵. Como se verá más adelante, la sensibilidad con cada uno de estos Ags varía notablemente según la forma de lepra que presenten los enfermos.

En el resto de las micobacterias humanas, a pesar de la importancia que han adquirido en los últimos años, los estudios de serología son muy escasos^{155,156}. Sólo se dispone de resultados de estas enfermedades por haber sido incluidas como grupo control en trabajos sobre TB^{44,84,91,125,153} o lepra^{128,129,133}. Así, en estudios en los que se han utilizado distintos Ags, tales como cultivo filtrado de *M. avium-intracellulare*¹⁶⁸, PPD^{44,153}, PPD preparado de *M. kansasii*¹⁶⁵ e, incluso, Ags purificados o semipurificados de *M. tuberculosis* como el Ag 5⁸⁴ o los glicolípidos SAG A₁, SAG B₁ y SAG C⁹¹, no se ha estudiado la especificidad por falta de grupos control¹⁶⁸ o ha estado muy disminuida, sobre todo por los resultados positivos obtenidos en los pacientes con TB^{44,91,153,165}, LL⁹¹ y afectados de otras micobacteriosis¹⁶⁵. Se hacen necesarios, por lo tanto, estudios que incluyan un mayor número de enfermos y de sujetos control y, a ser posible, la búsqueda de Ags más específicos para cada especie micobacteriana estudiada.

También se han realizado estudios serológicos sobre enfermedades animales causadas por *M. paratuberculosis*, *M. bovis* y *M. avium-intracellulare*. En la infección por *M. paratuberculosis* se han utilizado Ags bacilares crudos

INTRODUCCION

de esta micobacteria¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ e, incluso, un Ag purificado¹⁶⁷, siendo la especificidad mucho mayor con este último. En la enfermedad producida por el *M.bovis*, los mejores resultados han sido publicados con un Ag crudo de esta micobacteria¹⁷⁰, aunque también se ha usado PPD^{123,171,172}. Por último, en la afección producida en animales por *M. avium-intracellulare* se han utilizado *M. bovis* y *M. avium-intracellulare* muertos por calor¹⁷³, PPD preparado de esta micobacteria^{174,175} y Ags crudos de *M. bovis*¹⁷⁰, con resultados poco valorables por el escaso número de casos incluidos en los estudios.

I.10. VARIABLES QUE PUEDEN INFLUIR EN LOS RESULTADOS

I.10.1. COMPLEJOS INMUNES

Para poder explicar por qué no se detectan Acs circulantes en algunos enfermos con TB, habría que conocer a la perfección el mecanismo de respuesta inmunitaria humoral en esta enfermedad. Estos falsos negativos han tratado de justificarse por varios mecanismos. De todos ellos, el más aceptado es el de los complejos inmunes.

Distintos autores han demostrado que los pacientes con TB, además de Acs, tienen Ags micobacterianos circulantes que pueden unirse al Ac y formar inmunocomplejos, quedando poco Ac libre para poderse ligar al Ag utilizado en el test serológico, disminuyendo así la eficacia de la prueba^{108,118,119,176}. Estos complejos inmunes han sido descritos en múltiples trabajos, destacando el de Carr et al¹¹⁹ que los detectó en el 68% de los pacientes con TB activa que incluyó en su estudio. Sin poder aclarar con certeza la importancia de estos inmunocomplejos, parece que una mayor concentración de ellos podría asociarse con un peor pronóstico de la enfermedad¹⁷⁷ e, incluso, estar relacionado con una mayor virulencia del *M. tuberculosis*^{180,181}. También podrían utilizarse en el seguimiento de la respuesta a la quimioterapia¹⁷⁹⁻¹⁸².

I.10.2. VACUNACION PREVIA CON BCG

En 1.959, Parlett y Youman¹⁰⁷, utilizaron un test de doble difu gel y observaron que la vacunación BCG inducía Acs detectables ent y la 16ª semana después de esta vacunación. Sin embargo, previa Fusillo y Weiss¹⁰² no habían logrado detectar respuesta humoral administración de esta vacuna, aunque probablemente la detección de hizo precozmente. Con posterioridad, algunos autores han estud posibilidad de que esta vacunación pudiera influir en los resultados de l serológicos en las micobacteriosis^{67,82,87,101,135,153}. La gran mayoría estudios sobre serología, sin embargo, no han tenido en cuenta este seleccionar los grupos control. Hay discrepancia, entre los distintos a al analizar esta variable. Mientras existen trabajos que no enc diferencias en los títulos de Acs de los pacientes vacunados^{82,87,153} detectan un leve incremento¹⁰¹ e, incluso, en el trabajo de Miller et pacientes leprosos y tuberculosos, encuentran que el test que realizaban positivo en la cuarta parte de los voluntarios norteamericanos que habíar vacunados con BCG 2 ó 3 meses antes.

El estudio que mejor ha abordado este tema es el reciente publicado por Turner et al⁶⁷. Estos autores determinan, por ELISA, Ig frente a PPD en el suero de 75 adultos (todos con intradermorrr tuberculínica negativa) antes y después de ser vacunados. Encuentr tras la vacunación, al menos una de las dos Igs testadas experimen incremento estadísticamente significativo en el 89% de los ca

incremento observado en la IgG, aunque pequeño, se acercaba al que se obtenía cuando el test serológico se realizaba al grupo de enfermos con TB y frotis directo de esputo negativo. Por lo tanto, la vacunación BCG interfiere los resultados de la serología precisamente en el grupo de pacientes que más se puede beneficiar de estos procedimientos diagnósticos.

1.10.3. EFECTO DEL TRATAMIENTO ANTITUBERCULOSO

Kaplan y Chase publicaron, en 1.980, dos excelentes trabajos^{105,106} en los que demostraron que con el tratamiento antituberculoso se producía un incremento en los títulos de Acs que se ligaban a un filtrado puro de *M. tuberculosis*. Este hecho ocurría desde los primeros días de iniciada la quimioterapia y objetivaron que parte de los enfermos con TB inicialmente seronegativos, se positivizaban en el curso del tratamiento. Es probable que, efectivamente, los títulos de Acs se incrementen con la quimioterapia y que, en algunos pacientes, este aumento llegue a positivizar el test¹⁸³. Este incremento, que posiblemente ocurre durante los tres primeros meses de tratamiento⁸⁷, comienza a declinar a partir de los 3-6 meses¹⁸⁴ hasta los 3 años¹⁸⁵.

Con la lepra es probable que ocurra algo similar, aunque los títulos de IgG declinan lentamente a lo largo de los años. Sin embargo, los títulos de IgM parece que descienden bruscamente tras los dos primeros años de tratamiento. En el estudio de Bach et al¹³⁰, después de más de 10 años de

tratamiento, se encontraron títulos bajos de IgG e IgM frente a *M. leprae* íntegro, en el 75% y en el 15% de los casos respectivamente. No obstante, existían títulos de IgM frente al Ag glicolípidos fenólicos I en el 50% de ellos.

I.10.4. TUBERCULOSIS RESIDUAL

Los autores que han incluido en su estudio un grupo control de sujetos con TB inactiva o residual^{84,114,118,119,149,153,158}, obtienen resultados dispares según las técnicas empleadas. En aquellos trabajos en los que no se ha utilizado el ELISA, no se han objetivado diferencias estadísticamente significativas con los resultados encontrados en pacientes con TB activa^{114,118,119}, aunque eran inferiores tanto los títulos de Acs como el porcentaje de sujetos con enfermedad inactiva que daban el test positivo¹¹⁹.

Por el contrario, cuando se ha empleado la técnica inmunoenzimática, ha existido una perfecta diferenciación entre la forma activa y la residual inactiva de la enfermedad, aunque este grupo control es uno de los que más falsos positivos ha proporcionado en todos los estudios^{149,153,158}. En cualquier caso, como ya se comentó previamente, parece que los títulos de Acs disminuyen con el tiempo de inactividad de la enfermedad^{149,153}. En este contexto, Koshino et al¹⁴⁹ encontraban que en su estudio se detectaban 6 casos positivos de 7 casos que tenían una inactividad de su enfermedad inferior a 6 meses y, tan solo 2 de los 12 que hacía más de 6 meses que habían curado su TB. Igualmente, en el trabajo de Kalish et al¹⁵³ sólo se

comprobaba un test claramente negativo en 3 de los 7 casos con TB tratada en los últimos 10 años y, por el contrario, en 9 de los 13 con más tiempo de evolución.

I.10.5. ESTADIO DE LA ENFERMEDAD Y BACILOSCOPIA NEGATIVA

Exceptuando el trabajo de Krambovitis⁸⁷, que no encuentra asociación entre el título de Acs y el grado de evolución de la enfermedad, el resto de los autores^{86,88,185-187} refieren una perfecta correlación entre los resultados que obtienen y la mayor o menor extensión de la TB, objetivando los títulos más elevados entre los portadores de lesiones exudativas y cavitarias. Por el contrario, los títulos obtenidos en estos tests serológicos son generalmente inferiores en los enfermos con TB que presentan baciloscopia negativa^{108,188}.

Es de destacar el artículo de Palenque y Pérez¹⁸⁸, en el que se refiere que la sensibilidad de la prueba disminuía del 70,9% en las TB pulmonares activas con microscopia directa de esputo positiva, al 29,4% cuando ésta era negativa. Por otra parte, sólo en el 34% de los pacientes tuberculosos con baciloscopia negativa estudiados por Zeiss¹⁰⁸, se predijo la enfermedad con el estudio serológico. Sin embargo, Daniel et al⁴⁵ en un trabajo efectuado en Bolivia encontraron que la rentabilidad del ELISA empleado no disminuía en los pacientes que presentaban frotis directo de las muestras negativo. En cualquier caso, los estudios que han valorado conjuntamente la rentabilidad de la baciloscopia y de los tests serológicos comunican que ambas técnicas

se complementan^{44,45,108}.

De este modo, Zeiss et al⁴⁴ encontraron que, al combinar el primer frotis de esputo y el test serológico (por ELISA), la sensibilidad global era del 86%, mientras que la sensibilidad aislada de la baciloscopia fue del 57% y la del test serológico del 67%. Por su parte, Daniel et al⁴⁵ comunicaron una sensibilidad conjunta para ambas pruebas del 92%, siendo la sensibilidad por separado del 79% y del 69% respectivamente. En ambos estudios la especificidad fue superior con la técnica microbiológica.

1.10.6. INFLUENCIA DEL ESTADO TUBERCULINICO

Previamente nos hemos referido a la influencia del estado tuberculínico cuando los tests serológicos se realizan con técnicas de aglutinación^{92,93,98}. Esta influencia también se ha observado en algunos trabajos publicados con RIA¹¹⁸. En general, cuando se utiliza un ELISA, el título de Acs obtenido en los controles sanos es similar, sea cual sea su estado tuberculínico^{86,87,105,108,116,189,190}. Sin embargo, en ocasiones, se ha descrito un mayor número de falsos positivos entre los sanos con intradermorreacción tuberculínica positiva respecto a los que la tenían negativa^{82,84,153,191}, si bien, esta diferencia no ha sido estadísticamente significativa.

Los estudios sobre el estado tuberculínico en pacientes con TB pulmonar activa, han mostrado que del 7% al 17% presentan una

INTRODUCCION

intradermorreacción negativa^{192,193}. Este porcentaje varía dependiendo de la cantidad y tipo de tuberculina utilizada¹⁹³ y del estadio de la enfermedad, encontrándose con mayor frecuencia en los pacientes con enfermedad avanzada y lesiones cavitarias^{192,193}. Esta anergia puede resultar de la redistribución de subpoblaciones de linfocitos T circulantes periféricos^{194,195} o puede ser debida a la presencia de monocitos supresores¹⁹⁶ o de factores inhibitorios séricos¹⁹⁷. Gupta et al¹⁸⁶ encontraron un título de Acs más alto en los tuberculosos tuberculín-positivos que en los que tenían esta prueba negativa; sin embargo, esta relación no pudo confirmarse en los controles sanos que ellos estudiaron.

1.10.7. INFLUENCIA DE LA SELECCION DE LOS GRUPOS CONTROL

Se ha visto previamente que, cuando se utilizan técnicas diferentes del ELISA, la especificidad disminuye por los falsos positivos observados en los sanos tuberculín-positivos, los contactos cercanos con TB, etc.^{92,93,95,96}.

Con el ELISA, la especificidad ha sido inferior en los estudios en los que se han incluido, en los grupos control, enfermos de otras patologías, y no solamente sujetos sanos^{44,45,84,88,125,153,158,188,189,198,199}. En este caso, la especificidad ha oscilado entre el 79%⁴⁴ y el 96%^{188,189}, siendo, en la mayor parte de los estudios, inferior al 89%^{45,158,198}. Esta cifra se eleva hasta el 100% cuando sólo se incluyen personas sanas como control^{88,158,189}. Entre las distintas patologías incluidas en estos estudios, las que han presentado títulos

de Acs más elevados son la LL^{91.133}, el resto de micobacteriosis^{84.91.153}, otras granulomatosis no tuberculosas^{81.84.103.104.125.200} y, en menor medida, algunas micosis e, incluso, pacientes hipergammaglobulinémicos⁸⁴.

En los trabajos que sólo incluyen personas sanas en los grupos control, la especificidad oscila entre el 93,2%^{60.82.86.87.91} y el 100%^{134.149.190.201-203} en la mayoría de ellos. Por lo tanto, deben incluirse distintos grupos de enfermos en los trabajos para que el análisis de resultados sea fiable.

1.10.8. OTROS FACTORES

Daniel et al⁸⁶ encontraron que los títulos de IgG que se ligaban a PPD y Ag 5 eran más elevados en mayores de 45 años, en los varones y en los que tenían historia de tratamiento específico en el pasado sin, por el contrario, encontrar relación alguna con la raza. Sin embargo, esta diferencia no era estadísticamente significativa. La influencia de estas variables no ha sido investigada en el resto de los estudios, aunque no hay ninguna razón para creer que puedan influir en el resultado de los tests serológicos. Koshino et al¹⁴⁹ incluyeron 7 muestras de cordón umbilical en su grupo control, tratando de analizar la posible transferencia transplacentaria de Igs específicas frente a Ags micobacterianos. Mediante un ELISA y usando PPD como antígeno, encuentran DO muy bajas en todos ellos, dando a entender que esta transferencia es improbable y que las reacciones inespecíficas son por la producción propia de Acs.

I.11. ESTUDIOS SEROLOGICOS EN LA TUBERCULOSIS

I.11.1. RENTABILIDAD SEGUN LA ELECCION DEL ANTIGENO

De los 3 factores que influyen en los resultados de un test serológico (técnica, Ac y Ag), el que más ha variado en los distintos estudios ha sido el Ag seleccionado.

I.11.1.1. Antígenos bacilares crudos

Los Ags bacilares fueron los más utilizados en la primera época de los estudios serológicos. Estos Ags se han empleado con todo tipo de técnicas: De aglutinación^{56,90,96-90}, de precipitación^{105,109}, de fijación del complemento⁵⁸, inmunolectroforesis¹¹⁵, RIA¹¹⁸ y, por supuesto, ELISA^{60,90,112,125,126,134,165,185,198,204}.

En el primer estudio conocido sobre serología en TB se utilizó este tipo de Ag y un test de aglutinación directo⁵⁶. Nicholls⁹⁷, con esta misma técnica, publicó unos resultados excelentes, mientras que Mitchison et al⁹⁶, con hemaglutinación, obtuvieron una buena sensibilidad (70%) aunque con baja especificidad (36%). Kaplan y Chase¹⁰⁵, con microinmunodifusión, encontraron una sensibilidad del 46% en las TB iniciales y del 66% en las que tenían enfermedad activa por reactivación de lesiones antiguas. Estos mismos autores obtuvieron resultados positivos en 5 de los 15 pacientes estudiados

con lupus eritematoso diseminado, en 3 de los 30 casos con sarcoidosis y en ninguno de los controles sanos tuberculín-positivos.

Winters y Cox¹¹⁸ utilizaron RIA para medir IgG frente a cinco preparados antigénicos: Células enteras de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, determinantes antigénicos de paredes celulares de estas dos micobacterias y PPD preparado de *M. tuberculosis*. Los resultados cuando se utilizaban células enteras de *M. tuberculosis* y de *M. bovis* eran similares a los que se obtenían con PPD y, discretamente mejores que cuando se usaban Ags de pared celular.

Nassau et al⁶⁰ también utilizaron Ags bacilares crudos en el primer trabajo sobre serodiagnóstico de la TB en el que se empleó la técnica ELISA. Encontraron que los resultados variaban según las distintas diluciones empleadas. Benjamin et al¹⁶⁵, utilizaron cuatro fracciones antigénicas distintas, observando que la peor sensibilidad y especificidad se obtenía con la extraída del cultivo filtrado de *M. tuberculosis* cepa H37Ra (sensibilidad del 55,6%; especificidad del 84,4%). Los mejores resultados se lograron con el Ag 5, seguido por el PPD preparado de *M. Kansasii* y, finalmente, con el Ag 6. Baughman et al¹²⁵, al comparar un cultivo filtrado de *M. tuberculosis* y Ag 5 observaron niveles más discriminativos para éste último. Por contra, Kiran et al¹¹² observaron que al utilizar un extracto salino crudo de *M. tuberculosis* la sensibilidad era del 94% y la especificidad del 96,7%, mientras que con el PPD ambas cifras descendían al 80% y 90% respectivamente.

Recientemente se han publicado dos trabajos^{198,204} aplicando una

técnica ELISA y usando como Ag una fracción absorbente de cultivo micobacteriano. En el primero de ellos¹⁹⁸ se obtienen buenos resultados en TB y, en el segundo²⁰⁴, se ha tratado de diferenciar esta enfermedad de la sarcoidosis, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ambas

I.11.1.2. BCG

En la mayoría de los trabajos en que se ha empleado este Ag se ha utilizado la técnica ELISA^{81,82,134,150,151,205,206}. El grupo que más ha trabajado con BCG es el de Grange^{81,82,150,151}. En el primero de sus estudios⁸¹ determinaron IgG, IgM e IgA en 153 pacientes con TB pulmonar activa del este de Indonesia y en un amplio grupo control. Encontraron que la IgG era la más discriminativa para esta enfermedad y que, con IgM e IgA, sólo detectaban cinco casos no diagnosticados con IgG. En un segundo estudio¹⁵⁰ investigaron IgG frente a BCG y frente a fracciones de *M. Kansasii* y *M. smegmatis*, encontrando como los niveles de absorbencia eran más elevados cuando se utilizaba BCG obteniendo una sensibilidad del 73% y una especificidad del 96,7% .

En un trabajo posterior⁸⁷, observaron que los niveles de IgG frente a BCG eran significativamente más altos en los sanos tuberculín-positivos que en los negativos. La mayor diferencia entre controles y tuberculosos activos ocurría cuando se detectaba IgG, y la menor con IgM. Tanto esta última como

la IgA no se afectaban por el estado tuberculínico, y ambas incrementaban el poder discriminativo del test del 62% (sólo con IgG) al 75%.

En 1.982, Grange y Kardjito¹⁵¹ publicaron una recopilación de sus trabajos con BCG incluyendo resultados sobre 200 pacientes con TB y 50 controles. Obtuvieron una sensibilidad del 68% y una especificidad del 98%. Otros autores, como García y Gutierrez²⁰⁵, y Samuel y Adiba¹³⁴ han empleado la técnica ELISA con este Ag comunicando excelentes resultados. Por último, García-Carreño et al²⁰⁶, han encontrado, también con BCG, una sensibilidad del 100% pero con una baja especificidad (80%).

1.11.1.3 PPD

Esta tuberculina, al ser purificada, tiene un menor número de determinantes antigénicos que los Ags estudiados previamente¹⁵². Aunque hace más de 20 años que se empezó a utilizar en este campo, en técnicas de hemaglutinación⁹³, la mayoría de los estudios se han desarrollado en la última década con RIA^{116,118} y con ELISA^{90,112,116,165}. Se han utilizado múltiples preparados de PPD, encontrándose entre ellos diferencias en su actividad y en los determinantes antigénicos que contienen¹⁵². Destacan los trabajos llevados a cabo por el grupo de Zeiss^{44,108,116,124,153,154} que, si bien utiliza grupos control amplios y bien seleccionados, el número de pacientes con TB que se incluyen es escaso. La sensibilidad que obtienen oscila entre el 61,1%¹⁵³ y el 67%^{44,108}, y la especificidad entre el 79%^{44,108} y el 96,6%¹⁵³.

Los mejores resultados los consiguen al determinar IgG, aunque la IgA también se correlaciona con el diagnóstico de TB¹²⁴.

Jagannath et al⁹⁰ utilizan la hemaglutinación pasiva y el ELISA, y encuentran con ésta última una baja sensibilidad (43%) y una especificidad del 88,5%. El grupo de Gupta¹⁸⁶ comunicó una especificidad del 96% y una sensibilidad que oscilaba entre el 68,2% y el 74,2%. Daniel et al también han utilizado PPD como material antigénico^{83,86,165}. Al emplear PPD preparado de *M. Kansasii* encontraron una sensibilidad del 59,2%, con una baja especificidad por los falsos positivos debidos al resto de las micobacteriosis¹⁶⁵. En dos estudios posteriores^{83,86}, los resultados obtenidos fueron peores con PPD que con Ag 5. Otros autores han trabajado con este Ag^{112,149,187}, destacando la elevada sensibilidad y especificidad conseguida por Koshino et al¹⁴⁹.

En España se ha comenzado a trabajar en el campo del diagnóstico serológico de la TB hace muy pocos años. En la actualidad, hay grupos que están trabajando con PPD²⁰⁷⁻²⁰⁹.

1.11.1.4 Antígenos purificados y semipurificados

De todos los Ags aislados, el más específico del *M. tuberculosis* es el Ag 5 obtenido por Daniel y Anderson en 1.978¹⁵⁵. Este Ag es rico en ácido aspártico lo que sugiere un origen citoplásmico y, tan solo, se ha podido identificar en el *M. tuberculosis* y en el *M. bovis*²¹⁰. Es posible, no obstante,

que contengan epítomos comunes a otras micobacterias³⁶. Al probar este Ag en suero de 75 tuberculosos (de los cuales 50 eran de Bolivia y 25 de Cleveland), encontraron una sensibilidad del 84% para los pacientes norteamericanos y del 94% para los bolivianos. Obtuvieron, también títulos más elevados de Acs en este segundo grupo, aunque sin significación estadística. La especificidad global de los 150 sueros control fue baja (81,4%) fundamentalmente por el grupo de micobacteriosis no tuberculosas y el de los controles sanos con intradermorreacción tuberculínica positiva. En un estudio realizado en China⁸⁸, se lograron mejores resultados, alcanzando una especificidad del 100% entre los controles sanos. El mismo grupo de Cleveland²¹¹ consigue una peor rentabilidad con el Ag 5 que con el Ag 6. Este último ha sido aislado, por el mismo equipo de investigadores, a partir de filtrados de *M. tuberculosis*¹⁵⁶. En 1.988 Daniel y Sanson²¹² identificaron el epítomo peptídico del Ag 6, reconocido como TB-C-21, que puede ser específico de especie al no encontrarlo en *M. avium-intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. Kansasii* y *M. gordonae*, a diferencia del epítomo R-2 que reaccionaba con cultivos filtrados de todas las micobacterias. El Ag 6, aunque no es altamente específico, es fácil de preparar y tiene gran estabilidad¹⁵⁶. Con este Ag, Daniel et al²¹¹, encuentran una baja sensibilidad (39,1%) con una especificidad del 99,6%. Por el contrario, Stroebel et al²¹³ obtienen una muy buena sensibilidad (93,7%) con un 100% de especificidad en un estudio sobre 36 TB osteoarticulares.

Reggiardo y Middlebrook¹⁵⁷ purificaron 3 glicolípidos micobacterianos a partir del *M. bovis BCG* a los que llamaron SAG A₁, SAG B₁ y SAG C. Estos

INTRODUCCION

autores han realizado varios estudios con estos Ags utilizando ELISA y hemaglutinación pasiva^{91,95,214}. En todos ellos obtienen unos resultados excelentes con los tres Ags. Tan solo en uno de los estudios encuentran que el 21% de los contactos tenían un test positivo, al menos a uno de los tres Ags⁹⁵.

Otros Ags semipurificados han sido menos empleados. Krambovitis⁸⁷ utilizó un Ag extraído de células micobacterianas, con el que obtuvo una elevada sensibilidad (94%) y especificidad (96,8%). Daniel et al⁴⁵ lograron buenos resultados utilizando un Ag aislado con inmunoabsorbentes de anticuerpos monoclonales TB-C-1. Verbo et al²¹⁵ utilizan las proteínas 16KD, 24KD y 12KD aisladas de cultivos de *M. tuberculosis* por cromatografía de gel obteniendo una sensibilidad y una especificidad del 80%. Por último, en España, Martin et al²¹⁶ han comunicado también muy buenos resultados al detectar IgG frente a fenolglucólipido PGL-Tb1 purificado de *M. tuberculosis*.

I.11.1.5 Antígeno 60

El Ag 60, purificado del *M. bovis BCG* por Cocito y Vanlinden en 1.986¹¹⁷, posee la ventaja de ser fácilmente extraíble a gran escala y el inconveniente de ser un Ag genérico de las micobacterias y no específico del *M. tuberculosis*^{121,152}. Algunos autores, como McFadden y Houdayer²⁰⁰, también han trabajado con Ag 60 de *M. paratuberculosis* y de *M. avium*, encontrando con este último una sensibilidad del 100% y demostrando el alto

grado de reactividad cruzada de este Ag con las distintas micobacterias. Homasson et al¹⁵⁸, en un estudio en el que incluyen 200 TB (173 pulmonares y 27 extrapulmonares), encuentran que la sensibilidad global con este Ag fue del 80%, (92,5% en las TB extrapulmonares y 78% en las pulmonares). La especificidad global fue del 93%.

En España, algunos grupos están trabajando en la actualidad con este Ag^{188,190,199,202,210,219}. En los estudios publicados hasta la fecha, los controles sólo han sido personas sanas²¹⁸ y, en algunos de ellos, el número de TB ha sido muy pequeño. La sensibilidad ha oscilado entre el 65%¹⁹⁰ y el 100%²¹⁷. La especificidad ha variado entre el 83.3%²¹⁷ y el 100%¹⁹⁰. Nuestro grupo^{189,219}, en Gran Canaria, ha comunicado unos resultados preliminares con una sensibilidad entre el 65,5% y el 77,5% y una especificidad entre el 87,9% y el 96,8%. En Madrid, Palenque et al¹⁸⁸ han comunicado una sensibilidad del 61,1% para las TB pulmonares y del 40% para las extrapulmonares, con una especificidad global del 96,2%.

I.11.2. RENTABILIDAD DE LOS ESTUDIOS SEROLOGICOS EN TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR

I.11.2.1. Tuberculosis meníngea

Plouffe et al²²⁰, al estudiar pacientes con TB meníngea, encontraron que con PPD, se producía una mayor estimulación y proliferación de linfocitos en

INTRODUCCION

LCR que en suero. Este hecho sugería una respuesta local específica, fundamentalmente linfocitaria, introduciendo el concepto de compartimentalización inmunológica. Quizás ello explique los buenos resultados obtenidos con el ELISA al detectar Ags o Acs en LCR. La mayoría de estudios llevados a cabo han utilizado esta técnica para detectar Ags micobacterianos en LCR⁷²⁻⁷⁷, aunque hay otros trabajos en los que se detectan Acs frente a Ags preseleccionados^{77,153,221,222}.

Sada et al⁷², al detectar Ags micobacterianos en LCR, obtuvieron un resultado positivo en las cuatro TB meníngeas probadas bacteriológicamente y en nueve de los doce casos con diagnóstico de presunción de meningitis tuberculosa. Los 16 controles utilizados fueron negativos. Bat et al⁷³ utilizando un ELISA de inhibición, detectaron Ags micobacterianos en los LCR de las siete TB meníngeas confirmadas y en uno que no tenía diagnóstico de certeza. De nuevo la especificidad fue del 100%. Kadival et al⁷⁴ utilizan un ELISA sandwich y detectan estos Ags en 25 de los 38 LCR de pacientes con TB meníngea (sensibilidad del 65,8%) y en ninguno de los 52 controles.

Ramkinsson et al⁷⁵ realizaron su estudio sobre 10 TB meníngeas, 10 meningitis bacterianas, 14 virales y 25 LCR controles. Estos autores encontraron que existía una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de Ags micobacterianos aislados en LCR procedente de los pacientes con meningitis tuberculosas, y el resto de los controles. Asimismo, Wa et al⁷⁶, por el mismo método, demostraron títulos más elevados de Ags en los cinco casos de meningitis tuberculosa no tratadas, en relación a las seis que habían

recibido tratamiento y, por supuesto, con respecto a los 134 pacientes control.

Por otra parte, Coovadia et al²²¹ trataron de detectar por ELISA IgG frente al Ag 5 en LCR y obtuvieron una muy baja sensibilidad (18,9%) con una especificidad del 95,2%. Kalish et al¹⁵³ observaron que los tres LCRs de pacientes con TB meníngea tenían títulos elevados de IgG anti-PPD y Hernández et al²²², al cuantificar, IgG e IgM frente a Ags micobacterianos en LCR, obtuvieron un test positivo en las 20 meningitis tuberculosas estudiadas y negativo en los 70 controles sin TB. Por último, Watt et al⁷⁷ intentaron detectar Ags y Acs en el LCR de 29 TB meníngeas y de 98 controles, encontrando una sensibilidad del 52% y una especificidad del 96%, disminuida por cuatro falsos positivos en meningitis bacteriana.

Estos datos apuntan la potencial utilidad de estas técnicas en el diagnóstico rápido de la TB meníngea, aunque son necesarios mayor número de estudios.

1.11.2.2 Tuberculosis pleural

Petterson et al²²³ y Shimokata et al²²⁴ demostraron que en la TB pleural, el número absoluto y el porcentaje de linfocitos T en líquido pleural es más elevado que en sangre periférica, ocurriendo lo contrario para los linfocitos B. Esto conlleva una menor concentración de Igs en el líquido y, quizás explique

el que hayan sido muy pocos los estudios publicados²²⁵⁻²²⁸ sobre la detección de Acs frente a Ags micobacterianos en líquido pleural. Por el contrario, si se han realizado trabajos en los que se han tratado de demostrar Ags micobacterianos en este exudado^{75,78}. Ramkisson et al⁷⁵ detectaron Ags solubles del *M. tuberculosis* en 25 líquidos biológicos (pleurales o ascíticos) de etiología tuberculosa, consiguiendo una sensibilidad y especificidad del 100%. Sin embargo, recientemente, Daniel²²⁹ sugiere que pueden existir impedimentos técnicos para poder aplicar el ELISA al líquido pleural.

Otros autores^{45,158} han incluido en sus estudios séricos, pacientes con TB pleural. Así, Homasson et al¹⁵⁸ en su trabajo con Ag 60 estudia los sueros de 14 pacientes con TB pleural, en 13 de los cuales el test resultó positivo.

1.11.2.3. Otras localizaciones

Existen pocos trabajos que hagan referencia a la inclusión de formas TB extrapulmonar en sus estudios^{158,188,217}.

Strobel et al²¹³ investigaron la existencia de IgG anti Ag 6 en suero de 36 pacientes con TB osteoarticular y en 21 controles con afección osteoarticular no tuberculosa. De las 36 TB osteoarticulares, 16 estaban en fase activa y en ellas la prueba fue positiva en 15. En ninguno de los 20 casos inactivos ni en los 21 controles la prueba fue positiva. Chawla et al¹¹³ realizaron un trabajo con suero de 24 TB intestinales y de otras 24 afecciones

intestinales no tuberculosas. Por ELISA y utilizando como Ag un extracto salino crudo, encontraron que la sensibilidad era del 91,7% y la especificidad del 87,5%. Homasson et al¹⁵⁸ han encontrado una sensibilidad global del 92,5% para las 27 formas extrapulmonares que incluían en su estudio y Palenque et al¹⁸⁸ han conseguido una elevada sensibilidad (77,7%) en TB renales. En ambos casos, los trabajos se realizaron con Ag 60. La disparidad de datos observados hace necesarios más estudios de evaluación de estas técnicas.

1.11.3. RENTABILIDAD EN GRUPOS DE POBLACION ESPECIALES

La respuesta inmune humoral tras estimulación antigénica es más baja en pacientes infectados por el VIH incluso cuando se utilizan Ags selectivos, debido a la disfunción de los linfocitos, principalmente linfocitos T²³⁰. Por ello se ha pensado que los estudios serológicos en estos pacientes serían menos rentables. Diversos autores han incluido en sus trabajos a portadores de Acs frente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o con SIDA^{186,199,201,202,209}. Casi todos ellos han referido malos resultados de los tests serológicos, aunque el escaso número de pacientes incluidos no permite sacar conclusiones definitivas.

Por otra parte, uno de los mayores problemas diagnósticos de la TB sigue siendo la obtención de muestras para estudio en pacientes pediátricos. Estos han sido incluidos en pocas ocasiones en los estudios sobre serología

de esta enfermedad^{188,189,203}. Alde et al²⁰³ detectaron IgG anti-Ag 5 en 40 niños, 21 de ellos con diagnóstico de TB y 19 controles sanos. La sensibilidad que obtuvieron fue del 86% y la especificidad del 100%, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre los títulos de Acs en las TB con respecto a los controles.

I.11.4. DETECCION DE ANTIGENOS Y ANTICUERPOS EN OTRAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

Aunque la mayoría de los estudios han sido realizados en suero, también se han hecho trabajos con otras muestras biológicas. Ya se ha revisado la rentabilidad de estos tests en LCR y pleural, pero también se ha trabajado sobre esputo⁷⁹, lavado bronquial¹⁹⁸ y lavado broncoalveolar^{125,126}. Asimismo se han detectado Ags micobacterianos en distintos medios de cultivo^{52,231-233}.

Levy et al¹⁹⁸, por ELISA, detectaron en suero y lavado bronquial la IgG que se ligaba a una fracción absorbente de cultivo micobacteriano. La sensibilidad y especificidad obtenida en lavado bronquial fué del 72,7% y del 82,2% respectivamente. En suero, por el contrario, la sensibilidad fue del 70% y la especificidad del 86,7%. El grupo de Daniel et al^{125,126}, detectó, en suero y lavado broncoalveolar, IgG e IgA frente a el Ag 5 y un cultivo filtrado de *M. tuberculosis*. Para el lavado broncoalveolar encontraron que el test presentaba una sensibilidad con el Ag 5 del 66,6% y, con el cultivo del filtrado del 88,9%. Las especificidades respectivas fueron 84,3% y 53,2%. Estos mismos

INTRODUCCION

autores observaron que en los pacientes con TB, los niveles e IGG e IgA frente a Ags micobacterianos eran similares en las dos muestras estudiadas.

Friedman et al⁵² utilizaron un ELISA de inhibición para detectar Ags micobacterianos en botes de cultivos radiométricos (BACTEC®). En el décimo día de cultivo, cuando el índice de crecimiento micobacteriano era todavía insignificante, encontraron estos Ags permitiendo, de esta manera, el diagnóstico de TB en pacientes con baciloscopia negativa con una antelación de, al menos, 10 días con respecto al sistema radiométrico convencional. Por último, Raja et al²³³, con la misma técnica, lograban detectar Ag 5 a los 14 días, en los cultivos radiométricos de *M. tuberculosis* y no en los de otras micobacterias, por lo que la técnica se ha utilizado en la identificación de esta especie micobacteriana.

I.12. ESTUDIOS SEROLOGICOS EN LA LEPRA

Esta enfermedad está producida por el *M. leprae*, micobacteria que no puede ser cultivada «in vitro» y cuyo diagnóstico bacteriológico se limita a la baciloscopia directa en la LL. Este hecho, unido a su prevalencia mundial y a la similitud clínica de alguna de las formas de lepra con otras enfermedades dermatológicas, confieren una especial importancia a los estudios sobre diagnóstico serológico de esta enfermedad.

I.12.1. ANTIGENOS BACILARES CRUDOS

Existen distintas publicaciones^{120,134,234} en las que se ha investigado la presencia de Acs específicos frente a distintos Ags micobacterianos en el diagnóstico de la lepra. En general se han obtenido mejores resultados utilizando IgG, con mayor sensibilidad para las LL que para las LT. Respecto a la especificidad, los datos varían ostensiblemente según las características del grupo control.

I.12.2. GLICOLIPIDO FENOLICO I

Los mejores resultados en el serodiagnóstico de la lepra se han obtenido detectando la IgM que se liga al Ag glicolípido fenólico I, purificado de *M.leprae* por Hunter et al¹²⁷. En la literatura se recogen distintos trabajos¹²⁸⁻

INTRODUCCION

^{131,133} con oscilaciones importantes en sus resultados. Los mejores valores corresponden a un trabajo español²⁰⁸ en el que, utilizando el glicoconjugado 40-BSA, consiguen una sensibilidad y especificidad del 100%, incluyendo en esta serie un porcentaje significativo de LT y controles tuberculosos.

I.12.3. OTROS ANTIGENOS

Ha habido resultados contradictorios con los glicolípidos micobacterianos SAG A₁, SAG B₁ y SAG C^{91,214}. Miller et al¹³⁵ detectaron IgG utilizando como Ag el arabinomannan extraído del *M. smegmatis*, obteniendo una sensibilidad del 73,1% en las LL y del 50% en las LT. La especificidad disminuía considerablemente al incluir pacientes tuberculosos e incluso voluntarios vacunados con BCG varios meses antes. Finalmente, se han obtenido buenos resultados empleando Acs monoclonales²³⁵.

I.13. MICOBACTERIOSIS HUMANAS NO TUBERCULOSAS

A pesar de la importancia que este grupo de enfermedades está adquiriendo en los últimos años por su asociación al SIDA y por los problemas diagnósticos que presentan, se han realizado muy pocos estudios sobre serología en estas micobacteriosis^{165,166}. Sólo se encuentran resultados de estas enfermedades, en la mayoría de casos, por haber sido incluidas como grupo control en estudios de TB^{44,84,91,125,153} o lepra^{128,129,133}. No hay que olvidar que en el SIDA, este grupo de patógenos produce enfermedad en una fase tardía cuando, probablemente, la respuesta de Acs se encuentra ya alterada. Este hecho confiere mayor valor a la detección de Ags de estas micobacterias en las distintas muestras, al ser pacientes que normalmente tienen una notable población bacilar²²⁹.

Los resultados obtenidos son poco concluyentes e, incluso, Ags supuestamente muy específicos presentan importante reactividad cruzada⁸⁴.

I.14. ENFERMEDADES ANIMALES PRODUCIDAS POR MICOBACTERIAS

En 1.903 Bordet y Gengou¹¹⁰ demostraron una reacción de fijación del complemento en suero de animales usando bacilos enteros como Ags. Desde entonces, han sido pocas las publicaciones en veterinaria sobre el tema que nos ocupa, la mayoría de ellas con escaso número de sueros. La enfermedad de Johne producida por el *M. paratuberculosis* ha sido junto con las producidas por el *M. avium-intracellulare* y por el *M. bovis* las más estudiadas, la mayoría de ellas mediante ELISA^{167-169,171,174,175}.

I.15. ENFERMEDADES GRANULOMATOSAS NO MICOBACTERIANAS

I.15.1. SARCOIDOSIS

Esta enfermedad, de etiología desconocida, llegó a asociarse en décadas pasadas, a formas inusuales de presentación de la TB. El trabajo de Mitchell y Rees (123)²³⁶ logrando aislar *M. tuberculosis* de ratones inoculados con tejido sarcoideo homogeneizado y filtrado, otorgó un soporte experimental a esta antigua, y actualmente desechada, teoría. Hace más de 20 años, el grupo de Chapman^{103,104}, encontró Acs de las clases IgA e IgM frente a Ags micobacterianos en el suero de pacientes con esta enfermedad. Desde entonces, la sarcoidosis ha sido objeto de estudios serológicos^{81,204} y ha sido incluida como grupo control en otros^{84,105,125,153}. En su estudios sobre TB, Kaplan y Chasé¹⁰⁵ encontraron Acs frente a un filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* en 3 de 30 sarcoidosis. El grupo de Cleveland⁸⁴ también encontró IgG anti-Ag 5 en algunas de sus sarcoidosis, hallazgo que no se ha confirmado en otras series de este mismo grupo¹²⁵.

I.15.2. ENFERMEDAD DE CROHN

Los trabajos realizados por Chiodini et al²³⁷ lograron aislar y cultivar de tejido afecto por enfermedad de Crohn, una micobacteria extremadamente lenta en su crecimiento. Este microorganismo era similar en su cultivo y propiedades bioquímicas al *M. paratuberculosis*. Su lentitud de crecimiento

INTRODUCCION

sugirió inicialmente que esta enfermedad podría ser producida por formas defectuosas (fundamentalmente en su pared celular) de esta micobacteria. Más recientemente los trabajos de McFadden et al²³⁸ utilizando pruebas de hibridación de DNA han demostrado que la especie micobacteriana aislada de tejidos afectos con enfermedad de Crohn es indistinguible de este *M. paratuberculosis* y distinta de *M. avium*. Todo esto aporta un interés especial a los estudios serológicos de estas enfermedades.

Grange et al⁸¹ encontraron niveles elevados de IgA e IgM anti-BCG en el suero de 40 pacientes con enfermedad de Crohn. Sin embargo, en publicaciones posteriores^{191,200}, utilizando diferentes Ags no se han podido reproducir estos resultados. La ausencia de incremento en los títulos de Acs que se ligan a estos Ags, quizá ocurra porque las formas defectuosas micobacterianas que pudieran producir esta enfermedad, no expresan estos Ags, probablemente porque no los poseen. Otros autores²³⁹ han encontrado una estrecha correlación entre los títulos obtenidos por ELISA para el Ag aislado de *M. paratuberculosis* y para un Ag similar preparado a partir de un microorganismo semejante a esta micobacteria y aislado de especímenes quirúrgicos de pacientes con enfermedad de Crohn.

II. OBJETIVOS

II.1. OBJETIVOS

Como se ha visto, la respuesta inmune humoral en la TB ha sido investigada en numerosos estudios. Sin embargo, los resultados han sido, a menudo contradictorios y, en general, realizados en áreas con una prevalencia de la enfermedad muy diferente a la nuestra.

Este trabajo fue planteado con el objeto de establecer la rentabilidad diagnóstica de los nuevos métodos serológicos en la TB de nuestra región. Los objetivos concretos han sido:

- 1.- Estudiar, mediante técnicas de ELISA, y de forma prospectiva, la respuesta IgG específica frente al Ag 60 en distintos grupos de pacientes tuberculosos y no tuberculosos.
- 2.- Evaluar la rentabilidad de técnicas inmunoenzimáticas en el diagnóstico serológico de la tuberculosis en áreas de alta prevalencia.
- 3.- Valorar la rentabilidad de la determinación de Acs en otras muestras biológicas tales como el líquido pleural.
- 4.- Estudiar la interacción de la respuesta inmune humoral en suero y en líquido pleural.

OBJETIVOS

5.- Monitorizar la cinética de la respuesta inmune humoral durante las diferentes etapas de la enfermedad tuberculosa.

6.- Evaluación de la respuesta IgG e IgM frente a un nuevo antígeno micobacteriano recientemente purificado y potencialmente comercializable.

7.- Estudio del comportamiento de la IgG específica frente a ambos Ags en la tuberculosis residual (TBR).

III. MATERIAL Y METODOS

III.1. SELECCION DE LA POBLACION

Durante el período comprendido entre Mayo de 1.988 y Abril de 1.991 se incluyeron en este estudio prospectivo 404 personas. Procedían, en su mayor parte, de la consulta externa de la Sección de Neumología del Hospital Universitario «Ntra. Sra. del Pino» de Las Palmas de Gran Canaria, aunque también se incluyeron todos los pacientes tuberculosos o con sospecha de TB que fueron ingresados en el Complejo Hospitalario durante ese período de tiempo.

Estos sujetos fueron divididos en:

1. Pacientes con TB: 222. Fueron clasificados en:

A. 164 con TB pulmonar. El diagnóstico de certeza se estableció mediante cultivo en medio de LJ de las distintas muestras. Por su interés clínico este grupo de pacientes se subclasificó de la siguiente forma:

A.1 Atendiendo al resultado de la microscopía directa de la muestra:

- ◆ 104 con microscopía directa positiva.
- ◆ 60 con microscopía directa negativa, pero con cultivo en medio de LJ positivo.

A.2 Atendiendo a la agresividad diagnóstica empleada:

- ◆ 27 necesitaron realización de fibrobroncoscopia para llegar al diagnóstico.

- ◆ 137 fueron diagnosticados por estudio de esputo.

A.3 Atendiendo a la infección por el VIH:

- ◆ 15 presentaban Acs frente al VIH, de entre los cuales 7 cumplían criterios de SIDA; 12 de estos pacientes tenían baciloscopia positiva y 3 negativa.
- ◆ 149 no presentaban ningún déficit inmunológico significativo.

B. 58 pacientes con TB extrapulmonar cuyo diagnóstico fue establecido mediante cultivo, o por la demostración de granulomas con necrosis caseosa en el estudio anatomopatológico de la muestra. Estos pacientes correspondían a:

- ◆ TB pleurales: 28
- ◆ TB ganglionares periféricas: 15
- ◆ TB osteoarticulares: 5
- ◆ TB renales: 4
- ◆ Otras formas: 6 (2 meníngeas, 1 laríngea, 1 de oído medio, 1 peritoneal y 1 prostática).

2. Grupo control integrado por 182 sujetos que se clasificaron en:

A. 20 sujetos sanos diagnosticados de TBR inactiva ante una historia clínica previa sugestiva de TB, radiografía de tórax compatible e intradermorreacción tuberculínica positiva.

B. 22 pacientes afectos de LL.

C. 31 pacientes con neumonías inespecíficas de lóbulos superiores,

radiológicamente similares a la TB.

D. 30 pacientes con carcinoma broncogénico.

E. 33 pacientes con derrame pleural relacionado con distintas enfermedades:

- ◆ Derrame pleural maligno secundario a distintas neoplasias: 19
- ◆ Derrame pleural paraneumónico: 5 (3 con criterios de empiema).
- ◆ Trasudado: 7 (3 por insuficiencia cardíaca congestiva, 3 por cirrosis hepática y 1 por insuficiencia renal crónica).
- ◆ Embolismo pulmonar: 1
- ◆ Lupus eritematoso sistémico: 1.

F. 7 pacientes afectados del SIDA sin TB.

G. 16 pacientes con distintas neumopatías no tuberculosas (incluyendo 2 sarcoidosis).

H. 3 pacientes con Enfermedad de Crohn.

I. 20 personas sanas, la mitad de las cuales tenían la intradermorreacción tuberculínica positiva.

A todos los sujetos que se incluyeron en el estudio, se les extrajo una muestra de 10 cm³ de sangre venosa. Una vez centrifugada la muestra a 1.000 g, se separó el suero que fue alicuotado y congelado a - 30 °C hasta su posterior utilización.

Además, en los 61 pacientes que presentaban derrame pleural, se practicó, el mismo día de la extracción sanguínea, una toracocentesis con

obtención de 10 cm³ de líquido pleural que también fue centrifugado, alicuotándose y congelándose el sobrenadante a - 30 °C. En este grupo también se realizaron, en el líquido pleural, las siguientes determinaciones:

- Proteínas totales (y su relación con las determinadas en suero)
- LDH (y la relación con su contenido sérico)
- Glucosa
- pH
- Adenosindeaminasa (ADA)
- Lisozima (y su relación con el contenido sérico)
- Recuento total y diferencial de células, valorándose la presencia de células malignas.
- Tinciones y cultivos para investigar la presencia de bacterias, incluido el *M. tuberculosis*.

En 35 casos fue necesario practicar una biopsia pleural transparietal para conseguir un diagnóstico exacto. Basándose en el diagnóstico final, los pacientes fueron divididos en dos grupos:

- ▶ 28 pacientes con derrame pleural tuberculoso, en los que tuvo que practicarse, en todos los casos, una biopsia pleural ciega ya que la tinción de ZN del líquido pleural resultó siempre negativa. El diagnóstico se confirmó, en todos los casos, por cultivo del líquido pleural o de la biopsia o de ambos y/o por la existencia, en el espécimen de biopsia, de granulomas con necrosis caseosa.

MATERIAL Y MÉTODOS

- ▶ 33 pacientes cuyo derrame pleural era secundario a distintas causas ya señaladas anteriormente.

En un grupo de 72 pacientes, de los 222 con TB (51 con TB pulmonar confirmada mediante cultivo de esputo en medio de LJ y todos ellos con bacilosopia directa positiva; y 21 con TB extrapulmonar de distintas localizaciones), se estudio la cinética de la respuesta inmune humoral en las diferentes etapas de la enfermedad.

A todos estos pacientes se les instauró una pauta de tratamiento con INH y Rifampicina (RIF) durante 6 meses, añadiendo Pirazinamida (PZ) durante los dos primeros. Se realizó un seguimiento a lo largo del tratamiento en el que se pudo comprobar la correcta toma de la medicación prescrita. Una vez concluida ésta, se les revisó periódicamente durante otros 18 meses, sin que en ningún caso se observara fracaso terapéutico o recidiva de la enfermedad. En todos los sujetos se obtuvieron muestras séricas, además de al inicio del estudio, en el segundo, cuarto y sexto mes de tratamiento; y, posteriormente, al duodécimo, decimoctavo y vigesimocuarto mes desde el inicio de la terapéutica.

III.2. MATERIAL

III.2.1. ANTIGENO 60

Las micobacterias poseen varios componentes inmunológicamente activos. El Ag 60 es un miembro de la familia de Ags macromoleculares (10^6 - 10^7 daltons) y termoestables, siendo el principal componente de la llamada «Tuberculina vieja» y del PPD. Es capaz de estimular una respuesta inmunológica tanto de tipo humoral como celular.

Este Ag ha sido purificado del citoplasma del *M. Bovis BCG* por cromatografía en gel¹¹⁷. De forma esquemática, se destruyen las paredes celulares de suspensiones de micobacterias y el citoplasma bacteriano, tras tratamiento con nucleasas, se fracciona por cromatografía en columnas de Sepharosa 6B[®] (Pharmacia). La fracción excluida, que contiene el Ag 60, se analiza por inmunoelectroforesis bidimensional, empleando antisuero anti-BCG[®] (Dako). Finalmente, mediante determinación espectrofotométrica se evalúa el contenido proteico y polisacárido. Puesto que la BCG es virtualmente equivalente, desde el punto de vista antigénico, a las cepas virulentas de *M. tuberculosis*²⁴⁰, el Ag 60 podría utilizarse para el diagnóstico de la TB en humanos.

III.2.2. ANTIGENO 6

Se trata de un Ag nativo del *M. tuberculosis* y con un peso molecular aproximado de 30.000 daltons. Su preparación es fácil, mediante métodos sencillos y baratos. Brevemente, este Ag se recupera a través de cromatografía de intercambio iónico en dietilaminoetil-celulosa, a partir de la filtración de cultivos, no pretratados por calentamiento, de *M. tuberculosis*. Por inmunolectroforesis, el pico recuperado a una concentración de fosfato 0.8 M, contiene un único componente identificado como Ag 6, de naturaleza proteica y con especificidad de especie. Finalmente, es estable si se mantiene adecuadamente refrigerado.

III.3. METODO

III.3.1. ELISA PARA EL ANTIGENO 60

El ELISA IgG se llevó a cabo según la metodología descrita por Cocito¹⁶¹. En resumen, se incubaron 100 μl de cada uno de los sueros problema en placas microtiter con los pocillos recubiertos con Ag 60, por duplicado y diluidos al 1/100 en Tampón Fosfato Salino pH 7,3 (PBS), durante 60 minutos a 37 °C. Tras un ciclo de lavado con PBS, se añadió a cada pocillo 100 μl de anti-IgG humana marcada con peroxidasa y se procedió a una segunda incubación a 37 °C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se efectuó un segundo ciclo de lavado, procediéndose, a continuación, a añadir el substrato enzimático suministrado por la casa comercial (ortofenilendiamina pH 5,3). Finalmente, tras permanecer las placas 30 minutos en oscuridad, se detuvo la reacción colorimétrica con SO_4H_2 4N.

Los resultados se interpretaron a partir de la medición de las DO alcanzadas con un fotómetro y a una longitud de onda de 492 nm. Con el objeto de corregir las posibles variaciones interdía, los resultados obtenidos en cada ensayo se correlacionaron con curvas control de calibración elaboradas a partir de sueros de referencia negativos y positivos, lo que permitió la transformación de las DO en serounidades o unidades ELISA (UE)²⁴¹.

Puesto que el contenido proteico total en líquido pleural tenía un rango

MATERIAL Y MÉTODOS

mucho más amplio que en suero, cuando se realizaron ensayos con este líquido biológico, se analizaron las concentraciones proteicas de los especímenes y, posteriormente, se diluyeron hasta alcanzar una concentración de 1 mg de proteína original por ml, con el objeto de poder comparar los resultados entre sí y con los obtenidos en suero.

Las placas microtiter (ANDA-TB®) fueron suministradas por BIO-SELL S.A. (Madrid, España).

III.3.2. ELISA PARA ANTIGENO 6

III.3.2.1. Sensibilización de las placas

La detección de IgG e IgM específica frente a Ag 6 se realizó por ELISA indirecto optimizado, según procedimiento descrito anteriormente²⁴². De forma esquemática, se sensibilizaron placas microtiter (Costar 3590®) con 0,1 ml por pocillo de una dilución al 1/100 de Ag 6 en PBS, por incubación a 4°C. Tras 18 horas de incubación, y con el objeto de lograr la máxima adsorción del Ag a las paredes de los pocillos, se procedió a eliminar el Ag sobrante (no pegado a placa) mediante lavado de las placas con PBS 0,1% Tween 20 (PBS-Tw). A continuación se saturaron los pocillos con 200 μ l de PBS 0,1% de Albumina Sérica Bovina, durante 15 minutos. Finalmente, se lavaron de nuevo las placas con PBS-Tw, y se almacenaron a 4 °C hasta su posterior uso.

III.3.2.2. IgG específica

Se utilizaron las placas sensibilizadas con Ag 6, según método descrito en el apartado anterior. Se incubaron, por pocillo y por duplicado, 0.1 ml de cada uno de los sueros problema, diluidos al 1/1000 en PBS-Tw, 5% de Suero de Ternera Fetal (STF), manteniéndolos durante una hora a temperatura ambiente. Después se lavaron enérgicamente las placas cinco veces con PBS-Tw y se procedió a añadir, por pocillo, 0,1 ml del conjugado, manteniendo las placas durante una hora a temperatura ambiente. El conjugado utilizado fué

anti-IgG humana de cabra, marcada con peroxidasa (Tago®), diluida al 1/4000 en PBS-Tw, 25% STF. Después de 30 minutos de incubación y tras efectuar los lavados correspondientes, se procedió a añadir el sustrato, Ortofenilendiamina (2 mg/ml) en tampón citrato pH 5, conteniendo 0,03% de peróxido de hidrógeno. Por último, se mantuvieron las placas durante 15 minutos a temperatura ambiente y se paró la reacción por adición de SO_4H_2 4N. Las placas se leyeron con un lector de ELISA (Titertek Multiskan®) a una longitud de onda de 492 nm. Se consideraron positivos aquellos valores que superaron, en al menos 0,2 DO, los valores alcanzados por los blancos que corrieron en paralelo en todos los ensayos, efectuados en un mismo tiempo.

III.3.2.3. IgM específica

Se realizó mediante el mismo procedimiento y utilizando idénticas diluciones que para la IgG específica. Como antisuero se empleó antiIgM humana de cabra marcada con peroxidasa (Tago®) diluido, en este caso, al 1/2000, en PBS-Tw-25% STF.

III.4. METODO ESTADISTICO

Considerando los resultados del cultivo en medio de LJ o, en su caso, el hallazgo de granulomas caesificantes en las piezas de biopsia como método de referencia, el valor diagnóstico de la técnica inmunoenzimática se evaluó en términos de sensibilidad, especificidad y valores predictivos. La sensibilidad de un test diagnóstico es la proporción de los pacientes correctamente identificados como portadores de la enfermedad por el test; la especificidad es la proporción de sujetos normales correctamente evaluados por el test; el VPP representa la proporción de pacientes en los cuales el test es positivo y, el VPN sería la probabilidad de que la enfermedad no esté presente cuando el test es negativo. Finalmente, la exactitud de la prueba indicaría el porcentaje de todos los resultados que son resultados verdaderos²⁴³.

Desde el punto de vista descriptivo, las variables cuantitativas fueron tratadas analizando los índices de centralización y dispersión: media aritmética (m), desviación típica (σ) y error estándar de la media (S_m). Los datos en el texto se expresaron como $m \pm S_m$. La normalidad de la distribución se estudio mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las variables cualitativas se trataron analizando la frecuencia absoluta de la aparición de cada una de las categorías, así como los porcentajes corrientes.

Desde el punto de vista analítico, cuando la distribución de las variables era no paramétrica, se realizó la comparación de muestras de datos «pareados» mediante el test de Wilcoxon, empleándose el test de Friedman

para la comparación en bloque de un conjunto de muestras. La prueba de **Mann-Whitney** se aplicó en la comparación de muestras de datos «independientes». Cuando las variables seguían una distribución normal, la comparación de las mismas se realizó mediante el test de **Student**.

La comparación de varias variables de distribución normal se efectuó por el análisis de la varianza. Las comparaciones múltiples se hicieron por el método de **Newman-Keuls**. Si la distribución no era paramétrica se utilizó el test de **Kruskall-Wallis**. La determinación de la posible asociación entre dos variables cualitativas se realizó mediante la prueba del χ^2 .

En todos los casos se tomó como nivel aceptado de significación el correspondiente a un error Alfa (p) menor de 0,05.

Se analizó igualmente el coeficiente de correlación para cada par de variables cuantitativas elegidas mediante la obtención de matrices de correlación dos a dos. A partir de los coeficientes significativos, se pasó a determinar las ecuaciones de regresión más ajustadas a cada par de variables, presentando en cada caso, el ajuste que lograra mejor coeficiente de correlación.

Los cálculos estadísticos para todas estas pruebas fueron realizados utilizando el paquete bioestadístico **SIGMA®** (Horus Hardware, Madrid, España) en un ordenador personal.

IV. RESULTADOS

IV.1. HOMOGENEIDAD DE LA POBLACION

Se incluyeron en este estudio a 404 personas (263 hombres y 141 mujeres) (Figura 3), con edades comprendidas entre 1 y 90 años ($42,80 \pm 0,98$). El grupo de pacientes tuberculosos y el grupo control fueron comparados sobre la base de edad, sexo y tabaquismo, reproduciendo los mismos parámetros etarios, sexuales y de hábitos tóxicos que los encontrados en estudios epidemiológicos previos en nuestra provincia¹².

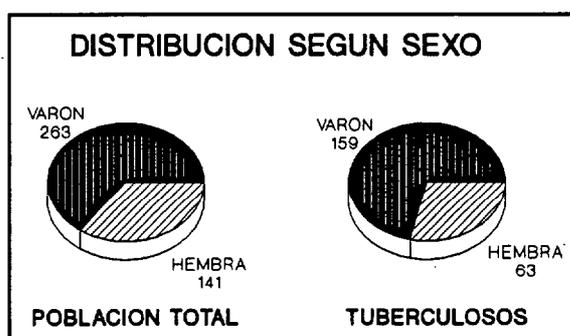


Figura 3. Distribución por sexo de la población estudiada.

Se ha encontrado una relación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el hábito tabáquico y la existencia de TB, a pesar de estar incluidos en el grupo control 30 pacientes con carcinoma broncogénico y otras enfermedades asociadas clásicamente al tabaquismo (Figura 4).

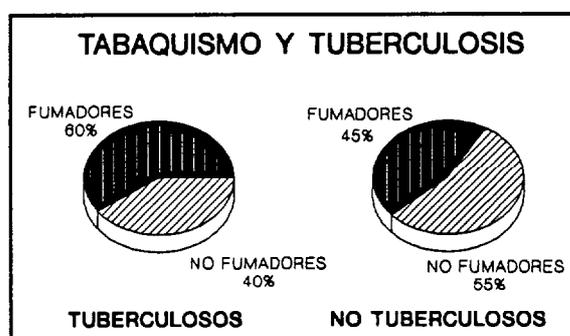


Figura 4. Asociación entre TB y tabaquismo.

RESULTADOS

Además, cuando se analizaron los niveles de IgG específica entre los pacientes tuberculosos, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en función de su grado de tabaquismo, no pudiendo relacionar, como en otras afecciones²⁴², alteraciones de la respuesta inmune humoral asociada al tabaco y, por tanto, alteraciones en el resultado del test.

IV.2. ESTUDIO DEL ANTIGENO 60. ANALISIS GENERAL

Como se puede apreciar en la figura 5, la m global obtenida en el grupo de los 222 pacientes con TB ($493,64 \pm 48,70$ UE), es notablemente superior a la encontrada en los 182 controles ($142,57 \pm 11,73$ UE), diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$).

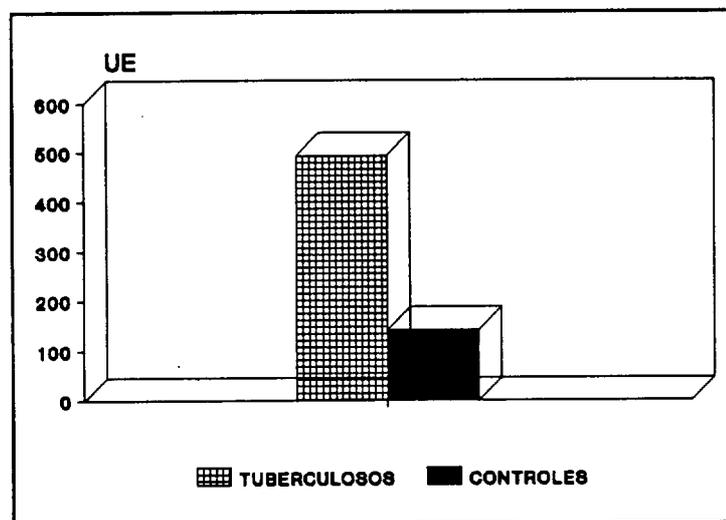


Figura 5. Comparación de m de IgG específica anti-Ag 60 en tuberculosos y controles.

Esta significación se mantenía cuando se comparaba el grupo de tuberculosos con cada uno de los subgrupos control por separado, salvo en el caso de las TBRs, que presentó un nivel de significación menor, aunque manteniendo una $p < 0,05$, y los pacientes portadores de lepra, con quienes no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 6).

RESULTADOS

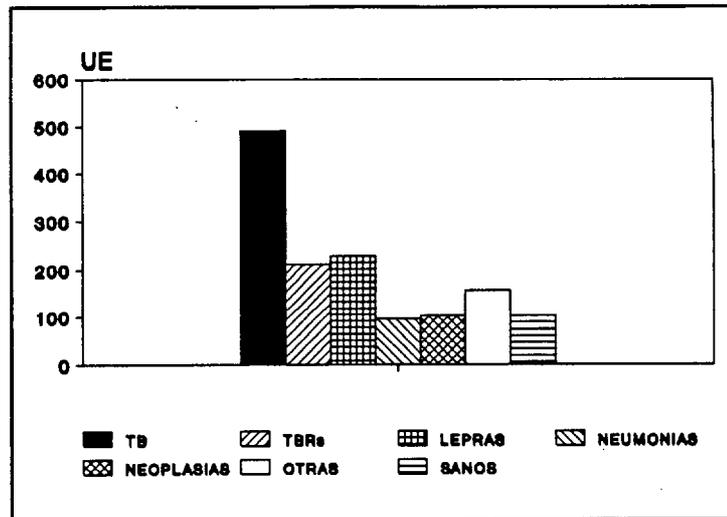


Figura 6. Comparación de la *m* de IgG específica anti-Ag 60 obtenida en las TB respecto a distintos controles.

IV.3. PACIENTES TUBERCULOSOS. ESTUDIO CON ANTIGENO 60

IV.3.1. TUBERCULOSIS PULMONAR

Al separar las TB activas en pulmonares y extrapulmonares, se observó que las primeras (164 pacientes) tenían un nivel medio de sensibilización frente al Ag 60 de $562,76 \pm 60,99$ UE, lo que supone un aumento de la diferencia respecto al nivel de los controles considerados en su conjunto ($p < 0.001$). Además, cuando se comparó este grupo de pacientes con cada uno de los subgrupos controles por separado, se encontró una diferencia estadísticamente significativa con todos ellos, incluidos los tuberculosos residuales ($p < 0,01$) y los leprosos ($p < 0,05$). (Figura 7).

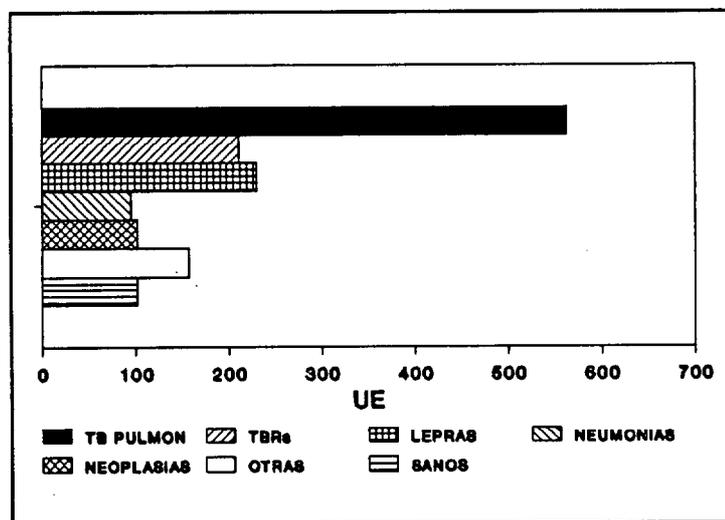


Figura 7. Comparación entre los niveles de Acs específicos frente al Ag 60 obtenidos en tuberculosos y distintos controles.

IV.3.1.1. Relación con la baciloscopia

Las 104 TB pulmonares con baciloscopia positiva presentaban un valor medio de IgG específica frente al Ag 60 de $697,48 \pm 87,45$ UE, nivel muy superior al que se encontró en aquellas con la tinción de ZN en el esputo negativa ($314,59 \pm 50,37$ UE) ($p < 0,01$). Sin embargo, incluso los pacientes con frotis directo de esputo negativo, tenían diferencias significativas respecto al grupo control considerado en su totalidad ($p < 0,001$) (Tabla I). Esta significación desaparecía cuando se comparaban, por separado, los pacientes con baciloscopia negativa y aquellos con TBR y lepra. El grupo de pacientes con baciloscopia positiva sí presentaba un nivel de significación estadístico importante respecto a estos dos subgrupos ($p < 0,001$ y $p < 0,01$, respectivamente) y, por supuesto, respecto al total de los controles ($p < 0,001$).

TABLA I. MEDIA DE IgG ESPECIFICA ANTI-AG 60 SEGUN BACILOSCOPIA

	MEDIA \pm Sm	p
BACILOSCOPIA +	697,48 \pm 87,45	<0,001
BACILOSCOPIA -	314,59 \pm 50,37	<0,001
CONTROLES	142,57 \pm 11,73	

Los valores de p hacen referencia a la comparación de m con respecto al grupo control.

IV.3.1.2. Relación con la agresividad del método diagnóstico

Al analizar la agresividad en el diagnóstico de las TB pulmonares, se encontró que la media de IgG específica frente a Ag 60 de los 137 pacientes que fueron diagnosticados mediante análisis del esputo ($592,47 \pm 69,42$ UE), fue ligeramente superior a la observada en los 27 enfermos que requirieron una exploración endoscópica para su diagnóstico ($420,57 \pm 117,57$ UE), sin que esta diferencia fuera significativa (Figura 8).

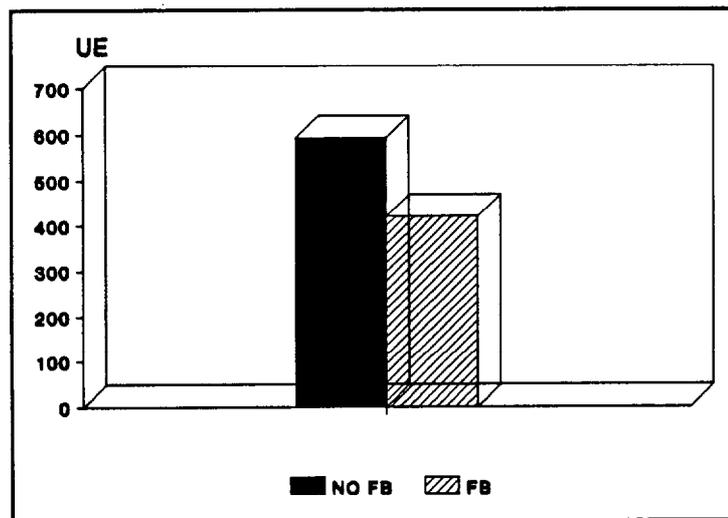


Figura 8. Comparación de m de IgG anti-Ag 60 en tuberculosos según hubieran precisado o no fibrobroncoscopia (FB).

Sí lo fué, por el contrario, la diferencia entre estos dos subgrupos y el total de los controles ($p < 0,001$ para ambos).

IV.3.1.3. Relación con infección por el VIH

A pesar de que la media de IgG específica frente al Ag 60 en los 149 tuberculosos no infectados por el VIH ($584,47 \pm 69,42$ UE), era netamente superior a la que presentaban los 15 infectados por el virus ($350 \pm 69,37$ UE), entre ambas no existió significación estadística. Sí se encontró, sin embargo, entre ambos grupos de tuberculosos y el grupo control ($p < 0,001$ para ambos). Cuando se analizó el grupo de pacientes con SIDA establecido, se observó una marcada diferencia entre los niveles de IgG específica de los pacientes con TB con respecto a los no tuberculosos, con medias de $362,51 \pm 98,13$ UE y $65,8 \pm 4,63$ UE respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 9).

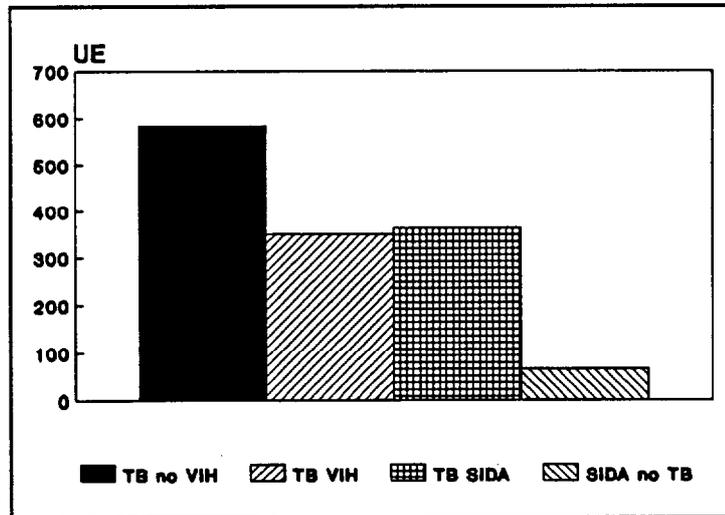


Figura 9. Relación entre los niveles de IgG anti-Ag 60 y la infección por el VIH.

IV.3.2 TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR

No resultó estadísticamente significativa la diferencia entre las medias de IgG específica de los 58 pacientes con TB extrapulmonar ($286,26 \pm 60,13$ UE) y el total de los controles ($142,57 \pm 11,73$ UE), aunque sí se logró un nivel de significación estadística ($p < 0,01$) cuando del grupo control se excluyeron las TBRs y las lepras (Figura 10).

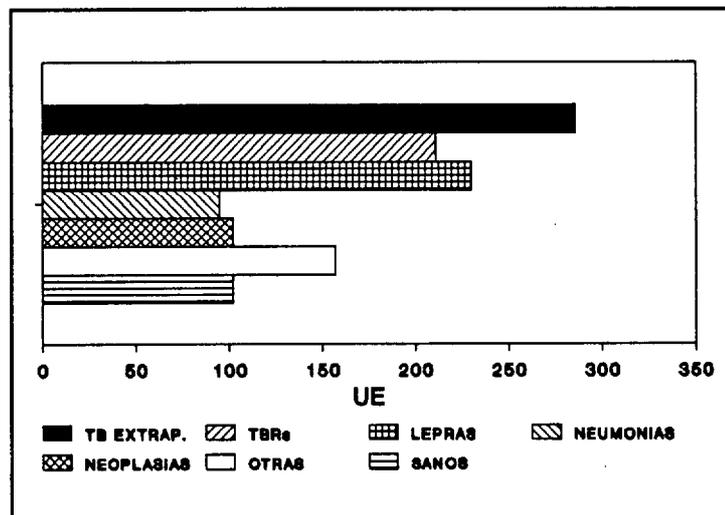


Figura 10. Comparación de *m* de IgG anti-Ag 60 en TB extrapulmonar y distintos controles.

Respecto a las distintas localizaciones de las TB extrapulmonares incluidas en el estudio, el mayor nivel medio de IgG frente al Ag 60 fué observado en los 28 pacientes con TB pleural ($459,83 \pm 133,56$ UE), seguido por los 15 enfermos con TB linfática ($273,87 \pm 118,9$ UE). Todas las *m* de IgG específica, en los distintos grupos de TB extrapulmonar, eran superiores a la media del grupo control. Sin embargo, sólo la del grupo de TB pleural tenía significación estadística ($p < 0,05$) (Tabla II).

RESULTADOS

TABLA II. NIVELES DE IgG ESPECIFICA FRENTE A AG 60 EN TB EXTRAPULMONARES.

	MEDIA \pm Sm	p**
TB PLEURAL	459.89 \pm 133.56	< 0.05
TB LINFATICA	273.87 \pm 118.90	NS
TB OSEA	176.71 \pm 43.54	NS
TB RENAL	172.50 \pm 77.97	NS
OTRAS *	409.55 \pm 186.30	NS
CONTROLES	142.67 \pm 11.73	

★ Dos TB meníngeas, 1 TB laríngea, 1 TB de oído medio, 1 TB peritoneal y 1 TB prostática.

★★ Comparación con el grupo control.

IV.4. ESTUDIO DEL ANTIGENO 60. ANALISIS DE LOS CONTROLES

Cuando se estudiaron por separado cada uno de los subgrupos que constituyen el conjunto de los sujetos control, se pudo apreciar que sólo los pacientes afectos de lepra tenían una *m* de sensibilización frente al Ag 60 estadísticamente más elevada ($p < 0,001$) que el resto de los controles, si de éstos se excluían los tuberculosos residuales. Este último subgrupo, tenía una media de IgG específica más elevada ($211,55 \pm 47,08$ UE) que el resto de los controles -exceptuando la lepra- ($111,34 \pm 9,89$ UE), pero la diferencia no resultó estadísticamente significativa.

La diferencia encontrada entre los sujetos sanos tuberculín positivos ($102 \pm 16,17$ UE) y los negativos (85 ± 55 UE) no fue significativa (Tabla III).

TABLA III. NIVELES DE IgG ESPECIFICA FRENTE AG 60 EN DISTINTOS GRUPOS CONTROL

	MEDIA \pm Sm
CONTROLES	142,57 \pm 11,73
TBR	211,55 \pm 47,08
LEPRA	230 \pm 38,77
NEUMONIAS LL.SS.	95,21 \pm 16,92
CARCINOMA BRONCOGENICO	102,30 \pm 10,38
OTRAS NEUMOPATIAS	157,50 \pm 44,55
SIDA	65,80 \pm 4,63
ENFERMEDAD DE CROHN	94,70 \pm 15,70
SANOS PPD+	102 \pm 16,17
SANOS PPD-	85 \pm 55

IV.5. RENTABILIDAD DIAGNOSTICA DEL ANTIGENO 60

Se estableció el punto de corte para nuestra población en 240 UE. Este correspondía a la m de IgG específica frente a Ag 60 obtenida en el subgrupo control formado por sujetos sanos, más 2σ . Con este nivel de discriminación se conseguía, además, la mejor relación sensibilidad/especificidad para el conjunto de los sujetos estudiados.

IV.5.1. SENSIBILIDAD DEL TEST

La sensibilidad global del test fue del 55%, siendo notablemente superior en los 164 pacientes con TB pulmonar (59,14%), que para los 58 enfermos con formas extrapulmonares (43%) (Tabla IV).

Dentro del grupo de las TB pulmonares, la sensibilidad de la prueba fue muy superior en los casos que presentaban frotis directo positivo (67,3%) con respecto a los que lo tenían negativo (45%).

No encontramos diferencias en la sensibilidad del test cuando se analizaron las TB pulmonares según el grado de agresividad de la técnica empleada. Fue del 59,25% para los pacientes que precisaron la realización de una fibrobroncoscopia para establecer un diagnóstico de certeza, y del 59,12% para los diagnosticados por el análisis de esputo. Similar sensibilidad se encontró en pacientes con TB pulmonar infectados por el VIH (60%) y el resto de las TB pulmonares (59%).

**TABLA IV. SENSIBILIDAD DEL TEST SEROLOGICO
CON AG 60**

SENSIBILIDAD GLOBAL	0.550
TB PULMONARES	0.591
ZN ESPUTO +	0.673
ZN ESPUTO -	0.450
CON FB	0.592
SIN FB	0.591
VIH +	0.600
VIH -	0.590
TB EXTRAPULMONARES	0.430
TB PLEURAL	0.535
TB LINFATICA	0.200
TB OSEA	0.400
TB RENAL	0.250
OTRAS +	0.666

★ Mencionadas en la Tabla II y analizadas conjuntamente.

Dentro de las TB extrapulmonares se observaron marcadas diferencias dentro de los distintos subgrupos. Así, mientras para la TB linfática se obtuvo una sensibilidad del 20%, con la TB pleural se alcanzó un 53,57%.

IV.5.2. ESPECIFICIDAD DEL TEST

La especificidad total del estudio fue del 90%. Este relativamente bajo nivel de la especificidad estuvo determinado, fundamentalmente, por los subgrupos de tuberculosos inactivos residuales y los leprosos. En el primero

RESULTADOS

de ellos se obtuvieron 7 casos falsos positivos de los 20 pacientes estudiados (especificidad del 65%), mientras que de los 22 leprosos que formaban el segundo subgrupo, 6 dieron un resultado falsamente positivo (especificidad del 72,2%). Si, dadas sus peculiaridades clínicas, estos 42 pacientes fueran excluidos del grupo de sujetos control, sólo se encontrarían 5 falsos positivos entre los 140 restantes (2 pacientes con neumonías de lóbulos superiores, 2 casos de bronquiectasias bilaterales y 1 caso de artritis reumatoide con afección pulmonar intersticial), lo que supondría una especificidad del 96,35% (Tabla V).

TABLA V. ESPECIFICIDAD DEL TEST SEROLOGICO CON AG 60.

ESPECIFICIDAD GLOBAL	0.900	
TBR	0.650	
LEPRA	0.727	
NEUMONIAS LL.SS	0.935	} 0.963
CA. BRONCOGENICO	1.000	
OTRAS NEUMOPATIAS	0.810	
DERRAMES PLEURALES	1.000	
SIDA	1.000	
ENF. DE CROHN	1.000	
SANOS	1.000	

Esta especificidad fue del 100% para el grupo de los 30 carcinomas broncogénicos, para los 7 pacientes con SIDA sin TB, en los 3 casos estudiados de enfermedad de Crohn, en los 33 enfermos con derrame pleural

RESULTADOS

de etiología no tuberculosa y para los 20 sujetos sanos, independientemente de su estado tuberculínico. Descendió al 93,54% en el grupo de las 31 neumonías de lóbulos superiores, similares radiográficamente a una TB.

IV.5.3. VALORES PREDICTIVOS Y EXACTITUD DEL TEST

Considerado en su conjunto, el test presentó una exactitud del 71,28%, un valor predictivo positivo del 87,14% y un valor predictivo negativo del 62,12%. El VPP alcanzó el 96% cuando del grupo control se excluyeron las TBRs y las lepras, y el VPN llegó hasta el 71% cuando sólo se consideraron las TB pulmonares.

IV.6. EMPLEO DEL ANTIGENO 60 EN LA TUBERCULOSIS PLEURAL

En la tabla VI se muestra la sensibilidad y especificidad de los métodos diagnósticos utilizados en los pacientes del estudio.

TABLA VI. DIAGNOSTICO DE TB PLEURAL. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LOS DIFERENTES METODOS DIAGNOSTICOS EMPLEADOS.

	S	E
ZN LIQUIDO PLEURAL	0.000	1.000
LJ LIQUIDO PLEURAL	0.277	1.000
ZN BIOPSIA PLEURAL	0.550	*1.000
LJ BIOPSIA PLEURAL	0.444	*1.000
ESTUDIO HISTOLOGICO	0.777	*1.000
ADA LIQUIDO PLEURAL	1.000	0.934
RELACION LISOZIMA LIQUIDO/SUERO	0.944	0.909
TEST SEROLOGICO AG 60	0.535	1.000
TEST AG 60 LIQUIDO PLEURAL	0.500	1.000

★ Estimada razonablemente, puesto que no se hizo biopsia a todos los sujetos estudiados.

Se aisló el *M. tuberculosis* en líquido pleural y/o biopsia pleural, en 14 pacientes (50%). En los otros 14 pacientes con TB pleural, el diagnóstico se estableció por criterios histológicos.

IV.6.1. ANALISIS DEL LIQUIDO PLEURAL

En la figura 11 se muestran los valores de IgG específica frente a Ag 60 en líquido pleural según el diagnóstico final. El valor del punto de corte en líquido pleural (150 UE) se estableció siguiendo los mismos criterios que en suero, aunque, naturalmente, los controles no eran sujetos sanos.

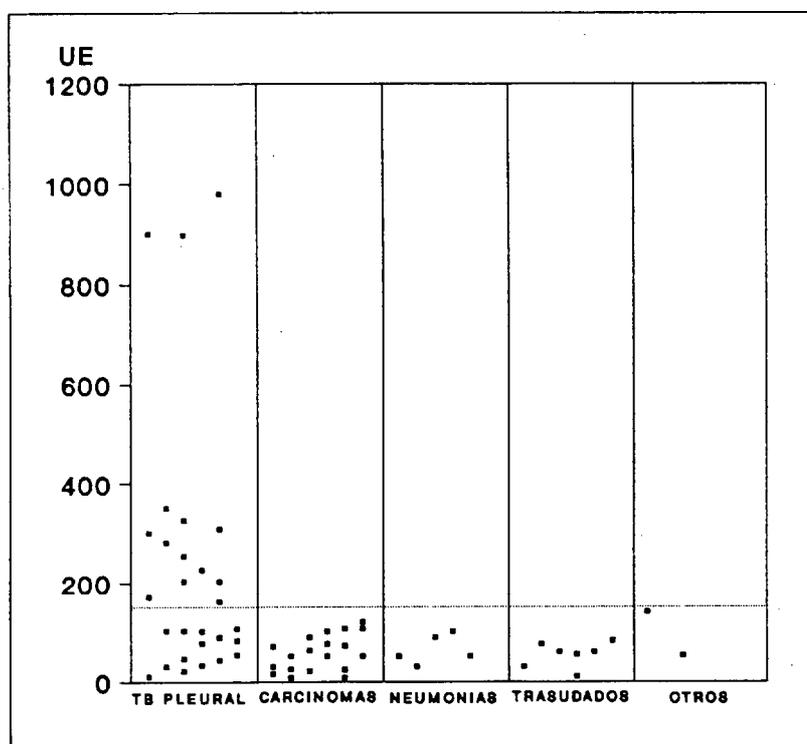


Figura 11. Niveles de IgG anti-Ag 60 en líquido pleural según el diagnóstico final.

De los 28 pacientes con derrame pleural tuberculoso, 14 tenían títulos superiores a 140 UE, que fué el nivel más alto de Acs encontrado en líquido pleural no tuberculoso. Por tanto, usando como valor del punto de corte 150 UE, la sensibilidad del test para identificar pacientes con TB pleural fué del 50% y su especificidad del 100% (Tabla VI). No se objetivaron diferencias

RESULTADOS

significativas entre los distintos grupos de pacientes control.

IV.6.2. ANALISIS SERICO

Al analizar la presencia de Acs específicos de la clase IgG dirigidos frente al Ag 60 en los sueros de los pacientes con TB pleural, se encontró que 15 de ellos presentaban un nivel superior a 240 UE, que fue el corte establecido para considerar un test positivo.

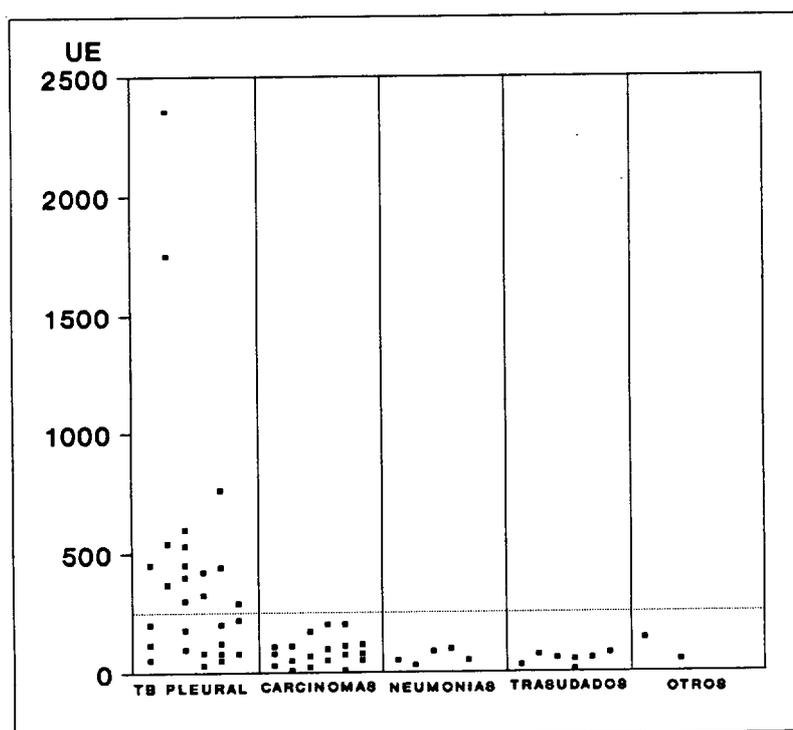


Figura 12. Niveles de IgG anti-Ag 60 en suero según el diagnóstico final.

Esto supone una sensibilidad, como ya quedó señalado, del 53,57% y una especificidad del 100% (Tabla VI). Tampoco en suero se observaron

diferencias significativas entre los distintos grupos control.

IV.6.3. ANALISIS CONJUNTO

De los 14 pacientes con resultado positivo en líquido pleural, todos ellos tenían un valor en suero por encima del punto de corte establecido. En los pacientes tuberculosos los niveles de IgG específica eran mayores en suero que en líquido pleural en todos los casos. La *m* de Acs en estos enfermos, tanto en suero como en líquido pleural, era significativamente mayor que los valores medios correspondientes del grupo control. En los pacientes tuberculosos estos valores eran de $459,83 \pm 133,56$ UE en suero y $273,61 \pm 72,58$ en líquido pleural, y en los pacientes del grupo control $107,43 \pm 8,35$ UE y $42,6 \pm 4,93$ UE, respectivamente. Esto supone unos niveles de significación de $p < 0,01$ y $p < 0,001$, cuando se comparan sueros y líquidos pleurales de uno y otro grupo.

IV.6.4. RELACION ENTRE LOS NIVELES DE IGG ESPECIFICA EN SUERO Y LIQUIDO PLEURAL

Con el objeto de estudiar la relación existente entre los niveles de IgG específica en suero y líquido pleural, se estableció una correlación entre las serounidades obtenidas en ambas muestras. A partir de los coeficientes de correlación significativos, se determinaron las ecuaciones de regresión de

RESULTADOS

mejor ajuste, considerando a las unidades séricas como variable predictiva.

Evaluando a los controles y a los tuberculosos en su conjunto, el análisis proporcionó la siguiente ecuación de regresión de primer orden: $y = 0,64854 x - 23,4643$ ($r=0,97$). Una ecuación esencialmente idéntica ($y = 0,65506 x - 28,9038$; $r=0,97$) fue la que se obtuvo cuando se evaluaron los pacientes con TB exclusivamente (Figura 13).

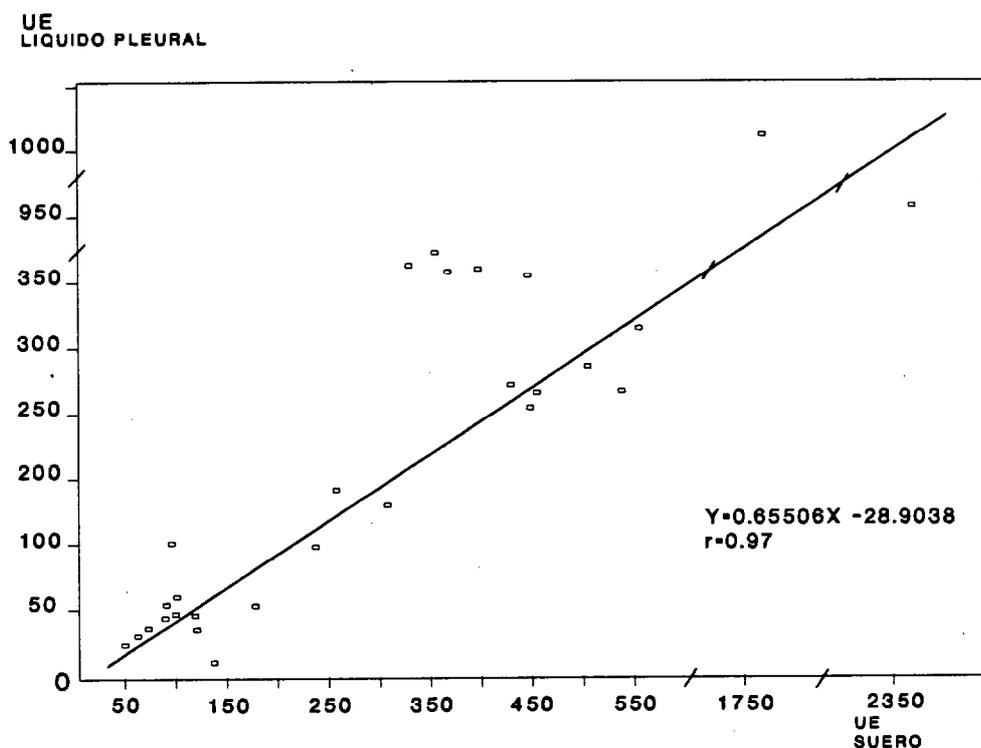


Figura 13. Regresión lineal entre IgG específica en suero y líquido pleural en pacientes con TB.

Sin embargo, la correlación entre Acs séricos y en líquido pleural fue más baja ($r=0,71$), siguiendo la forma cualitativa de una curva de tipo potencial ($y = 0,18443 + x^{1,139}$) y manteniendo la significación estadística.

IV.7. SEGUIMIENTO DE LA RESPUESTA IGG ESPECIFICA A ANTIGENO 60

La m y el S_m de las serounidades de IgG anti-Ag 60 obtenidas en cada una de las extracciones efectuadas a los 72 pacientes tuberculosos que participaron en el estudio de seguimiento, se detallan en la tabla VII.

TABLA VII. EVOLUCION DE LOS Acs IgG ANTI AG 60 EN PACIENTES TUBERCULOSOS.

	TB (n=72)	TB PUL. (n=51)	TB EX. (n=21)
INICIAL	486 ± 80.5	555.2 ± 102.9	260.2 ± 81.9
2º MES	707.7 ± 171.9	820.1 ± 219.5	350.1 ± 134.7
4º MES	620.4 ± 121.5	667.2 ± 139.3	364.3 ± 208.7
6º MES	507.3 ± 99.5	638.6 ± 134.8	247.1 ± 75.7
12º MES	545.5 ± 175.9	595 ± 192.2	256.2 ± 159.3
18º MES	308.6 ± 54.9	350.1 ± 141.9	237.8 ± 95.3
24º MES	255.1 ± 101.5	270.5 ± 145.6	205.3 ± 153.5

Datos expresados en $m \pm S_m$.

Se puede apreciar que la m de los 51 pacientes afectados de TB pulmonar es notablemente superior a la de los 21 enfermos que padecían TB extrapulmonar, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellas, al inicio del tratamiento, y a lo largo del primer año ($p < 0,001$). Las determinaciones que se efectuaron a los 18 y 24 meses no presentaban diferencias significativas entre los tuberculosos pulmonares y extrapulmonares.

Al analizar la evolución de las m de las serounidades de los 72

RESULTADOS

pacientes, se observó que, en el segundo mes de tratamiento, se produce un incremento importante de los niveles de Acs específicos, encontrándose, en este momento, los títulos más elevados. Desde este cénit, se asiste a una lenta disminución de estos niveles, a lo largo de todo el período evolutivo analizado, pero sin que los títulos de Acs se situen por debajo del nivel inicial hasta que no han transcurrido 18 meses desde el comienzo de la terapéutica. Es importante destacar cómo, a pesar de este descenso, los niveles de IgG anti-Ag 60 obtenidos a los dos años, siguen por encima de las 240 UE, calculadas como umbral de positividad para nuestra población de Gran Canaria²¹⁹.

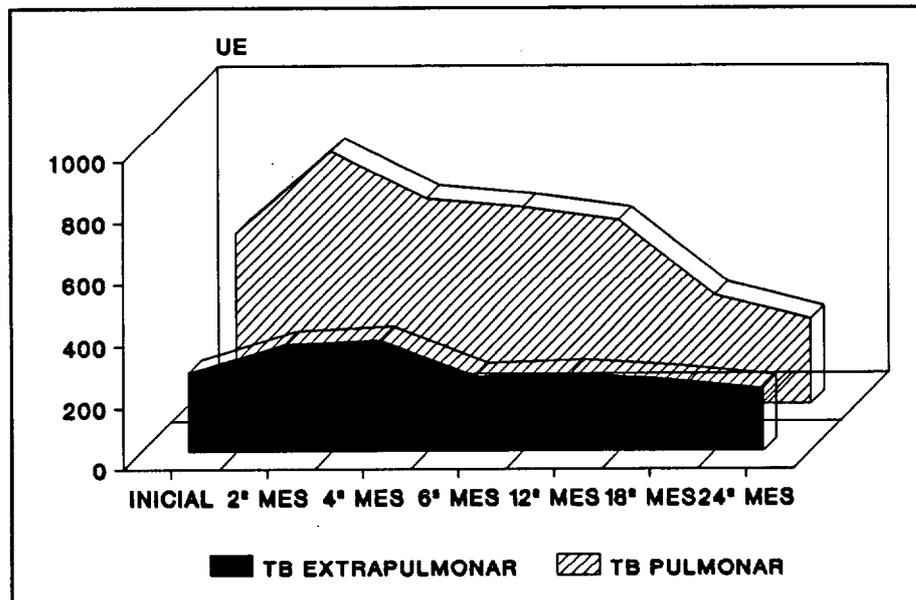


Figura 14. Evolución de las m (UE) de IgG anti-Ag 60 desde el inicio del tratamiento, en tuberculosos.

RESULTADOS

Al analizar separadamente los enfermos con TB pulmonar y extrapulmonar, ocurre algo similar a lo expuesto previamente aunque, en estos últimos, los niveles se igualan a los iniciales a los 12 meses, y el valor medio obtenido a los 18 meses ya se encuentra ligeramente por debajo del nivel de positividad del test.

Con el corte de positividad, ya mencionado, de 240 UE, se valoró el número de positivos obtenidos en cada una de las fases evolutivas testadas. Estos resultados, detallados en totales, TB pulmonares y extrapulmonares, se muestran en la tabla VIII.

TABLA VIII. PACIENTES TUBERCULOSOS CON TEST SEROLOGICO DE AG 60 POSITIVO. RELACION CON EL MOMENTO EVOLUTIVO DE SU ENFERMEDAD.

	TB (n=72)	TB PUL. (n=51)	TB EX. (n=21)
INICIAL	38 (52.7)	33 (64.7)	5 (23.8)
2ª MES	51 (70.8)	44 (86.3)	7 (33.3)
4ª MES	50 (69.4)	44 (86.3)	6 (28.6)
6ª MES	46 (63.9)	40 (78.4)	6 (28.6)
12ª MES	44 (61.1)	39 (76.5)	5 (23.8)
18ª MES	29 (40.3)	26 (51)	3 (14.3)
24ª MES	24 (33.3)	22 (43.1)	2 (9.5)

Los valores entre paréntesis indican el porcentaje respecto al número (n) de pacientes por grupo.

Treinta y ocho de los 72 enfermos tuvieron un test positivo en la extracción inicial, lo que supondría una sensibilidad del 52,7%, aunque ésta era significativamente mayor en las TB pulmonares (64,7%), que en las extrapulmonares (23,8%). Sin embargo, como se puede apreciar en la tabla

RESULTADOS

VIII, la mayor sensibilidad se obtenía en el 2º mes de tratamiento, con muy escasa diferencia a la obtenida en el 4º mes. Esta sensibilidad en este período del tratamiento era, en las TB pulmonares, del 86,27%. Es preciso señalar que, al año de seguimiento, -seis meses después de haber finalizado el tratamiento y haber considerado curada a la enfermedad-, el 61,1% del total de enfermos, y el 76,5% de los afectados de TB pulmonar, mantenían su test serológico positivo. Estos valores positivos, aunque disminuían de forma progresiva, continuaban siendo muy elevados a los dos años, con un 33,3% de los enfermos totales y un 43,13% de los que padecían TB pulmonar, con títulos por encima del valor umbral.

IV.8. ESTUDIO DEL ANTIGENO 6

En un grupo de 91 pacientes se estudió la presencia de IgG e IgM específicas frente al Ag 6. Estos pacientes se distribuyeron en 75 TB y 16 controles, con los subgrupos que se indican en la tabla IX.

TABLA IX. MEDIAS (DO) DE IgG E IgM ANTI AG 6 EN TUBERCULOSOS Y CONTROLES.

	MEDIA \pm Sm IgG	MEDIA \pm Sm IgM
TB (n=75)	0.626 \pm 0.037	0.602 \pm 0.026
TB PULMONAR (n=55)	0.653 \pm 0.048	0.605 \pm 0.034
ZN ESPUTO + (n=32)	0.680 \pm 0.063	0.565 \pm 0.051
ZN ESPUTO - (n=23)	0.615 \pm 0.075	0.662 \pm 0.038
TB EXTRAPUL (n=20)	0.560 \pm 0.037	0.594 \pm 0.033
CONTROLES (n=16)	0.476 \pm 0.034	0.569 \pm 0.048

En una segunda fase, se evaluó la presencia de IgG específica frente al mencionado Ag, en 51 pacientes con TBR (20 pertenecientes al grupo control, ya mencionado, y el resto formado por pacientes que se incorporaron a esta situación a lo largo del seguimiento). Estos se distribuyeron según los años de evolución en tres grupos: Menos de un año (n = 17), entre uno y cinco años (n = 14) y con más de cinco años de evolución (n = 20).

IV.8.1. MEDICIONES DE IGG ESPECIFICA

La $m \pm S_m$ de Acs IgG frente a Ag 6 en pacientes con TB, expresados en DO, fué de $0,626 \pm 0,037$ DO, significativamente mayor ($p < 0,01$) que el valor obtenido en el grupo control ($0,476 \pm 0,034$ DO). Se obtuvo una diferencia casi significativa ($p < 0,1$) cuando se compararon las m del grupo de TB pulmonar ($0,653 \pm 0,048$ DO) respecto al grupo de TB extrapulmonares ($0,550 \pm 0,037$ DO) (Figura 15).

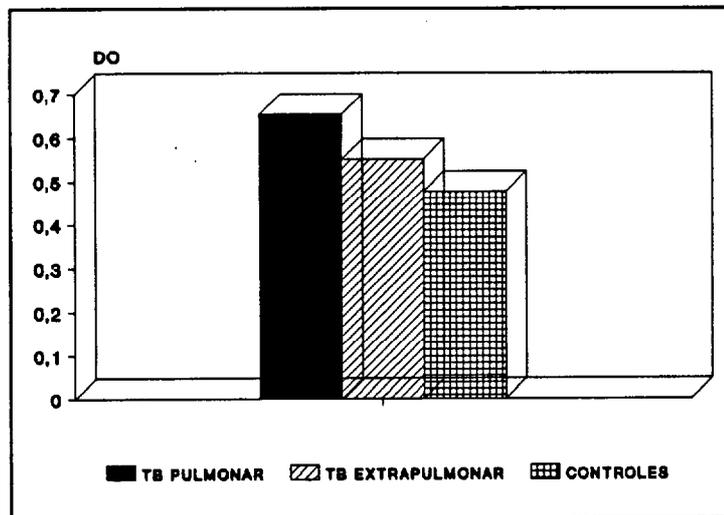


Figura 15. Medias de IgG frente a Ag 6 en distintas poblaciones.

Estableciéndose el punto de corte en 0,700 DO, según se describió anteriormente, la especificidad obtenida fue del 93,75%. Este nivel alcanzaba el 100% si se excluían las lepras del grupo control. La sensibilidad, sin embargo, era del 28% en el análisis general. Este valor oscilaba entre el 15% en las TB extrapulmonares y el 37,5% en las TB pulmonares con baciloscopia positiva. Para la TB pulmonar en su conjunto, la sensibilidad fue del 32,7%, y para aquellos pacientes con baciloscopia negativa, sólo del 23%.

IV.8.2. MEDICIONES DE IGM ESPECIFICA

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre tuberculosos y no tuberculosos, aún excluyendo los pacientes leprosos del grupo control ($p < 0,1$). Sin embargo, cuando comparamos las m de los pacientes con TB pulmonar y baciloscopia negativa ($0,662 \pm 0,038$ DO) respecto a los no tuberculosos (excluyendo los leprosos) ($0,522 \pm 0,034$ DO), la diferencia resulta estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Con idéntico punto de corte ($0,700$ DO) encontramos una sensibilidad global del test para esta Ig del 36%, con especificidad del 81,25%, que se incrementa hasta el 93,75% si excluimos las lepras del grupo control.

Es interesante señalar, la sensibilidad alcanzada por la IgM específica frente al Ag 6 entre las TB pulmonares con baciloscopia negativa, que fué del 47,8%, descendiendo notablemente (hasta un 31,25%) en los pacientes bacilíferos (Figura 16).

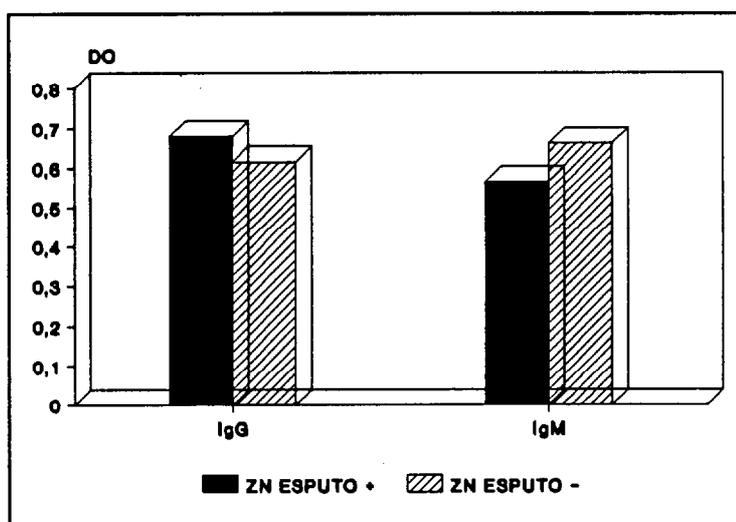


Figura 16. Comparación de m de IgG e IgM anti Ag 6 según resultado de baciloscopia en esputo.

IV.8.3. ANALISIS CONJUNTO DE IGG E IGM

Combinando los resultados obtenidos con ambas Igs se alcanza una sensibilidad global del 52%, con especificidad del 81,25% (hasta un 93,75% si excluimos las lepras) y con VPP de 92,8% y 97,5%, en uno y otro caso respectivamente.

La sensibilidad para la TB pulmonar fue del 54,5%, oscilando entre el 56,5% en los casos de baciloscopia negativa y el 53,1% en los casos de tinción directa positiva. La sensibilidad para la TB extrapulmonar fue del 35% (Tabla X).

TABLA X. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL TEST SEROLOGICO CON AG 6 UTILIZANDO IgG E IgM

	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
ANALISIS GLOBAL	0.520	0.937
TB PULMONAR (n=66)	0.545	
ZN ESPUTO + (n=32)	0.565	
ZN ESPUTO - (n=23)	0.531	
TB EXTRAPUL (n=20)	0.350	

Para el cálculo de la especificidad se excluyeron las lepras del grupo control.

IV.8.4. COMPORTAMIENTO EN LA TBR

IV.8.4.1. IgG frente a Antígeno 6

Las TBRs, una vez demostrada su inactividad clínica y bacteriológica, fueron divididas en tres grupos según su tiempo de evolución. Se encontró un valor medio de IgG frente a Ag 6 de $0,706 \pm 0,119$ DO; $1,004 \pm 0,115$ DO y $1,100 \pm 0,076$ DO, para los grupos de TBR de menos de un año de evolución, de entre uno y cinco años de evolución y de más de cinco años (m de $25,94 \pm 3,44$ años; rango de 6 a 50 años), respectivamente. La diferencia entre el primero y último de los grupos resultó estadísticamente significativa con $p < 0,05$.

Cuando se compararon los niveles de IgG anti-Ag 6 y la existencia o no de lesiones radiológicamente significativas (más de 2 cm^2 en la radiografía de tórax simple), se obtuvo una relación estadísticamente significativa ($p < 0,001$) con niveles de $1,144 \pm 0,082$ DO y $0,803 \pm 0,073$ DO, respectivamente.

En términos de especificidad, -usando un punto de corte de $0,700$ DO-, ésta cae desde un $53,8\%$ en el grupo de TBR de un año de evolución, hasta un $8,3\%$ y $15,3\%$ en los de entre uno y cinco y más de cinco años respectivamente.

IV.8.4.2. Comparación con antígeno 60

El comportamiento de la IgG frente al Ag 60 es llamativamente diferente

al comentado respecto al Ag 6 (Figura 17).

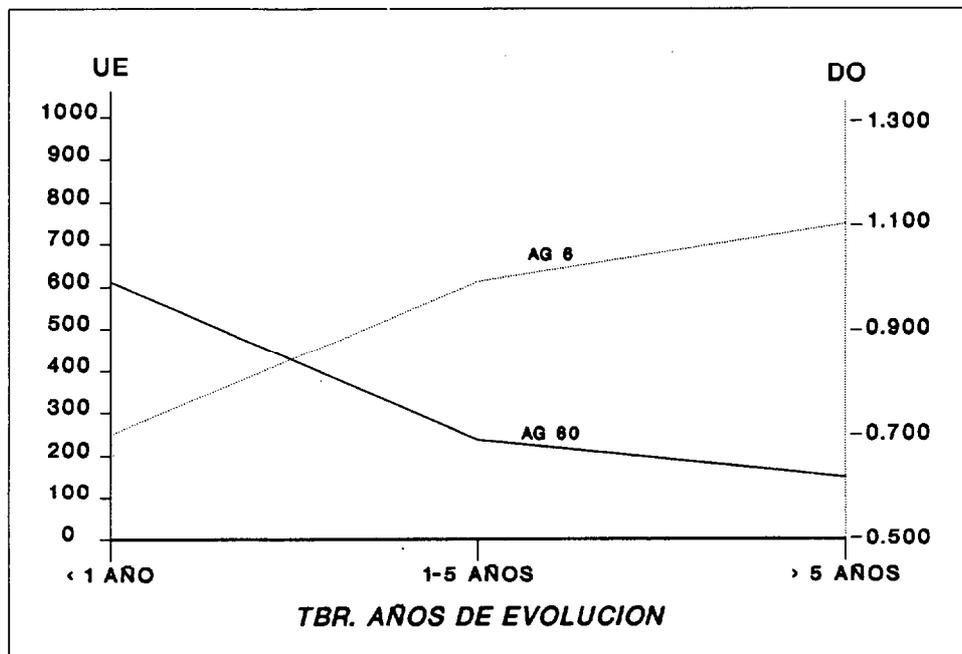


Figura 17. Comportamiento de la IgG frente a Ag 6 y Ag 60 en TBR.

En el grupo de pacientes estudiados, lo que se observa es una disminución paulatina de los niveles de IgG específica frente a este Ag, a medida que consideramos grupos de mayor tiempo de evolución. Los valores, expresados en UE como ya se mencionó, fueron de $613,75 \pm 201,30$ para los casos de menos de un año de evolución, de $241,87 \pm 69,28$ para aquellos que se encontraban entre uno y cinco años y de $159,16 \pm 32,26$ para los de más de cinco años de evolución. Aunque la comparación de grupos no resulta estadísticamente significativa, la tendencia observada es clara, e inversa a la objetivada para el Ag 6. Tampoco se encontró una relación significativa entre los niveles de IgG específica y la intensidad de las lesiones radiológicas.

RESULTADOS

En términos de rentabilidad diagnóstica, manteniendo el punto de corte en 240 UE, se obtiene una proporción de falsos positivos decreciente a medida que transcurre más tiempo de evolución. Estos falsos positivos serían de 58,3%, 37,5% y 16,6%, respectivamente.

IV.8.5. IGG FRENTE A ANTIGENO 6 EN LEPROSOS

Aunque brevemente, es importante señalar que 15 de los 22 leprosos estudiados (68,18%) presentaban niveles de IgG iguales o superiores a 0,700 DO. Además, la media de DO en estos sujetos era significativamente mayor que la encontrada en los pacientes tuberculosos considerados en su conjunto. Esta diferencia no se encontró cuando se estudió IgM específica.

V. DISCUSION

V.1. EVALUACION GENERAL DE LAS TECNICAS INMUNOENZIMATICAS EN EL DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS.

V.1.1. ASPECTOS GENERALES.

La TB continúa presentando en la actualidad importantes problemas diagnósticos debidos, fundamentalmente, al lento crecimiento del *M. tuberculosis* en los medios de cultivo y a la dificultad que conlleva la obtención de muestras válidas para estudio en pacientes con enfermedad limitada, en aquellos que presentan localización extrapulmonar de la misma y en la edad pediátrica. En estos grupos de pacientes, con frecuencia, se tiene que recurrir a técnicas agresivas para llegar a un diagnóstico de certeza.

Al aplicar nuevas técnicas al diagnóstico de la TB, como con cualquier otra enfermedad, es preciso establecer un patrón de referencia, esto es, un patrón independiente respecto al cual podamos evaluar la nueva técnica diagnóstica. En la TB, este patrón de referencia es, habitualmente, la baciloscopia o el cultivo de esputo. Es preciso señalar, no obstante, que este patrón introduce un prejuicio contra métodos indirectos que reconocen y dependen de las reacciones del huésped. Conviene recordar por ello, siempre que se quiera comparar nuevos métodos diagnósticos con los tradicionales exámenes de esputo, cuál es la rentabilidad de la baciloscopia directa. La baciloscopia directa tiene una sensibilidad en torno al 40%, estando su especificidad alrededor del 99,8%. Así pues, a cualquier nueva prueba

diagnóstica se le deberá exigir un sensibilidad y especificidad semejante. Este último parámetro tiene especial importancia, ya que la utilidad diagnóstica de una técnica depende fundamentalmente de su especificidad, sobretodo cuando el número de enfermos, en el conjunto de la población estudiada, es pequeño. El problema que puede ocasionar un falso negativo es mínimo, porque el médico va a continuar buscando un diagnóstico de certeza con otros métodos. Un resultado falso positivo, sin embargo, puede causar mucho daño ya que puede resultar en errores de tratamiento y, más aún, en el cese de la investigación diagnóstica.

Existen dos formas distintas de abordaje del diagnóstico de una enfermedad infecciosa, ambas con base inmunológica. Por un lado se pueden examinar los productos del organismo patógeno, los Acs de las micobacterias en nuestro caso utilizando enzimoimmunoensayos, o bien se puede intentar determinar la reacción del huésped, es decir la producción de Acs específicos a estos productos.

V.1.2. DETECCION DE ANTIGENOS MICOBACTERIANOS POR ENZIMOINMUNOENSAYO.

Para la mayoría de enfermedades transmisibles se han desarrollado pruebas diagnósticas utilizando el reconocimiento de los Acs por ELISA. En el caso de la TB, surgieron ya desde un principio varios problemas técnicos y por ello, el progreso ha sido lento.

DISCUSION

El primer trabajo sobre la detección de Ags en la TB fue realizado en Mexico por Sada et al⁷² en LCR, obteniendo 9 resultados positivos en 12 pacientes con meningitis tuberculosa y sólo un resultado positivo en 20 pacientes control. Otros investigadores^{72,74} también obtuvieron buenos resultados, aunque con algunos resultados falsos positivos.

Se han realizado pocos estudios sobre el reconocimiento de Ags en el esputo. El procesamiento de esta muestra plantea diversos problemas técnicos porque el esputo es un gel no homogéneo y, por lo tanto, resulta muy difícil lograr que el Ag sea accesible al Ac. Strauss²³², utilizando un RIA, encontró 12 resultados positivos en 12 pacientes y ningún falso positivo en los 9 controles. Yáñez⁷⁹, utilizando un ELISA de inhibición, encontró 19 resultados positivos en 33 pacientes con TB y 3 en sus 35 controles.

Dada la dificultad de trabajar con muestras de esputo, algunos autores como Raja y Baughman¹²⁶, aplicaron un ELISA de inhibición para examinar líquidos de lavado broncoalveolar, utilizando placas cubiertas con filtrados crudos de cultivos de *M. tuberculosis*. Obtuvieron 4 resultados fuertemente positivos en 9 pacientes con TB, pero también encontraron algunos positivos entre los controles. Utilizando un ensayo idéntico, pero con Ag 5²³³, los resultados fueron más específicos, aunque a costa de perder sensibilidad.

En el laboratorio del Dr. Daniel, en Cleveland, se hizo un interesante estudio con cultivo de esputos²³³. Estos cultivos se examinaron para determinar la presencia de Ag, mediante ELISA de inhibición, a las dos

DISCUSION

semanas de cultivo. Seis cultivos de esputo de pacientes con TB resultaron positivos por ELISA. En 13 pacientes control, ningún cultivo dió un resultado positivo. El principal inconveniente de este método es que demora el diagnóstico 2 semanas y no viene a ser sino una forma de cultivo rápido que no necesita radioisótopos.

V.1.3. RESPUESTA INMUNITARIA CELULAR: INTRADERMORREACCION TUBERCULINICA

Es bien conocido que la prueba tuberculínica es una manifestación de una reacción de hipersensibilidad retardada¹⁵⁵ a los Ags micobacterianos mediada por los linfocitos T. Esta prueba se utiliza, rutinariamente, para identificar aquellas personas infectadas por el *M. tuberculosis*.

Si se efectúan pruebas tuberculínicas en la población general se puede diferenciar, sin dificultad, a las personas infectadas de las no infectadas. Sin embargo y gracias a numerosas investigaciones se sabe que, en determinadas zonas del mundo, esta diferenciación no es tan sencilla pues se van a distinguir tres tipos de sujetos: las personas infectadas, las no infectadas y aquellas infectadas por micobacterias atípicas. Estas otras micobacterias comparten Ags similares a los del bacilo de Koch y son precisamente estos Ags los que van a plantear problemas de inespecificidad.

La solución a este problema consiste en aislar Ags que no sean

DISCUSION

compartidos entre varias micobacterias, es decir, preparar Ags específicos. Esto no es fácil y un ejemplo de ello es el Ag 5^{155,210}. Este Ag es una proteína del *M. tuberculosis* que ha sido purificada mediante inmunoabsorbentes¹⁵⁵. En estudios inmunolectroforéticos realizados con Acs de cabras, se le pudo identificar en las 10 cepas estudiadas del *M. tuberculosis* y del *M. bovis* y en ninguna de las otras 30 cepas estudiadas de otras doce especies micobacterianas²¹⁰.

El Ag 5 es un Ag potente para pruebas cutáneas. En estudios preliminares en animales, se ha encontrado que es diez veces más específico que la PPD en la prueba cutánea tuberculínica. Para evaluar la utilidad clínica y epidemiológica del Ag 5 en humanos, se han efectuado estudios en el noreste de Argentina donde existe una zona tropical en la que se producen muchas reacciones cutáneas inespecíficas al PPD. Daniel et al²⁴⁴ utilizaron ambos Ags, PPD y Ag 5 en tests cutáneos encontrando un porcentaje similar de reacciones inespecíficas con los dos Ags, a pesar de ser el Ag 5 un Ag purificado y de que existía evidencia preliminar de su especificidad.

V.1.4. RESPUESTA INMUNITARIA HUMORAL: SEROLOGIA DE LA TUBERCULOSIS.

Los linfocitos B son las células encargadas de la producción de Acs. Aunque se sabe que los Acs no juegan un papel prioritario en la patogenia de la TB, pueden detectarse y cuantificarse Acs específicos en el suero de

DISCUSION

pacientes tuberculosos. La cuestión es, ¿se podrían utilizar en el diagnóstico de la TB?

El primer estudio sobre serodiagnóstico en la TB fue el realizado por Arloing en 1.898, tan solo 16 años después del descubrimiento del bacilo por Roberto Koch⁵⁸. Arloing empleó una prueba de aglutinación y, aunque sus resultados no fueron malos, hubo un 11% de falsos positivos en los sujetos controles. La era moderna en este campo se inició con el trabajo de Nassau⁶⁰ que empleó un ELISA con un 8% de falsos positivos. Se deduce, pues, que hay otro aspecto en la especificidad que no depende del Ag sino de la exactitud de la prueba.

Algunos autores han trabajado con diferentes Ags utilizando técnicas de ELISA. Balestrino⁸³ ha empleado PPD y Ag 5 en pacientes tuberculosos y en sujetos control, obteniendo resultados mucho mejores con este último. Estos mismos resultados, posteriormente, se han confirmado en Cleveland, China, Bolivia y Buenos Aires. Desgraciadamente, la preparación del Ag 5 es muy compleja y, además, presenta una gran inestabilidad una vez preparado. Por estas razones, se hace necesario buscar otros Ags u otros métodos para ser aplicados en el ELISA.

V.1.5. OTRAS TECNICAS INMUNOENZIMATICAS.

En Inglaterra, Ivany y Bothamley et al^{245,246} utilizaron Acs monoclonales frente a Ags específicos. Mediante ensayos (RIA o ELISA) de inhibición, estos autores examinaron la reactividad de los sueros frente a esos Ags purificados. Aunque un poco más complejas, estas pruebas de inhibición proporcionan una alternativa a la purificación del Ag.

En la actualidad se piensa que la técnica ELISA con diferentes Ags y distintos procedimientos, se podría aplicar al diagnóstico de la TB pulmonar. Sin embargo, se siguen manteniendo una serie de interrogantes. ¿Cual es el valor del ELISA en la TB leve con baciloscopia negativa?. En un trabajo recientemente publicado²⁴⁷, la sensibilidad obtenida fue baja, lo que hace necesario más investigaciones en este campo. Y, ¿cual es su valor en la TB extrapulmonar?. Si nos basamos en datos preliminares es útil³⁷, aunque existen discrepancias entre los resultados obtenidos en niños tuberculosos y en pacientes con SIDA. ¿Cuál es la utilidad de la técnica en otros líquidos biológicos diferentes del suero?. ¿Podría utilizarse como parámetro de seguimiento o respuesta al tratamiento?. La serología de la TB es un campo lleno de preguntas reclamando investigaciones y respuestas.

V.2. EVALUACION GENERAL DE LOS RESULTADOS SEROLOGICOS CON EL ANTIGENO 60.

Al analizar de forma general nuestros resultados, podemos apreciar que los títulos de Acs obtenidos guardan una estrecha relación con la población bacilar de los distintos pacientes estudiados. Así observamos que, en la TB pulmonar, se encontraron niveles de IgG específica estadísticamente más elevados que en la TB extrapulmonar; y dentro de aquellas, entre las que presentaban baciloscopia positiva.

La relación de los títulos de Acs con el grado avanzado de la enfermedad ha sido referida por otros autores^{86,88,187}, aunque en algunos trabajos^{45,87} no se ha podido demostrar este aspecto e, incluso Daniel et al⁴⁵, en un estudio efectuado en Bolivia, encontraron que la rentabilidad de la técnica ELISA que ellos empleaban no disminuía en los pacientes con frotis directo negativo.

Por otra parte, en nuestro estudio hemos podido establecer una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de Acs específicos en los pacientes tuberculosos con radiografía de tórax cavitada ($773,17 \pm 104,52$ UE), respecto a los tuberculosos sin esta característica radiológica ($338,17 \pm 33,51$ UE) ($p < 0,01$). La diferencia encontrada entre estos dos tipos de TB presumiblemente sea debida, no sólo al diferente número de bacilos presentes en ambos grupos, sino también al hecho bien conocido de que las respuestas secundarias a Acs duran más que las respuestas

DISCUSION

inmunológicas primarias; por tanto, las posibilidades de obtener un test serológico positivo en el primer grupo de pacientes son más altas que en el segundo. Así pues, como corolario de este análisis podríamos deducir que cuanto más alta sea la relación TB activa postprimaria/primaria entre los casos estudiados con el test, más bajo será el número de falsos positivos encontrados.

El resultado de la baciloscopia y la localización extrapulmonar de la enfermedad, por tanto, han influido en nuestros resultados. Además, estos dos grupos de pacientes son uno de los más interesantes desde el punto de vista clínico, a la hora de evaluar la rentabilidad del test. No hay que olvidar que el grupo de enfermos con TB pulmonar y baciloscopia positiva, aunque con los títulos más elevados de Acs específicos, habrían sido diagnosticados utilizando una técnica sencilla, rápida y barata como es el frotis directo del esputo. Sin embargo, el grupo de pacientes con TB pulmonar y baciloscopia negativa, aunque con títulos más bajos, presentaban niveles de IgG específica estadísticamente más elevados que los controles. Además, con esta técnica se habrían logrado diagnosticar casi la mitad (45%) de los casos con frotis directo negativo.

Algo similar ocurría con las TB extrapulmonares ya que, aunque la media de los niveles de Acs específicos no era significativamente más alta que los controles en general, sí lo era cuando de estos se excluían los tuberculosos pulmonares residuales y los leprosos, dos patologías que clínicamente no se confunden con la TB extrapulmonar. Además, con este test se habría llegado

DISCUSION

al diagnóstico en una tercera parte de los enfermos (43%), pudiéndose evitar técnicas agresivas en gran parte de ellos.

V.3. ANALISIS DE LA RENTABILIDAD DIAGNOSTICA DE LA DETECCION DE IGG ESPECIFICA FRENTE A AG 60 EN SUERO

V.3.1. SENSIBILIDAD DE LA TECNICA

La mejor sensibilidad de la técnica se encontró en la población de tuberculosos pulmonares con baciloscopia positiva (67,3%), descendiendo notablemente en aquellos que presentaban baciloscopia negativa (45%) y en las localizaciones extrapulmonares de la enfermedad (43%).

La sensibilidad global obtenida en este trabajo ha sido inferior a la comunicada por otros autores^{84,87,158} y similar, e incluso superior a la referida por otros^{83,88,90}. Es probable que en estos resultados haya influido el elevado número de TB pleurales con frotis directo de esputo negativo y de TB extrapulmonares incluidas en el estudio, hecho que ya hemos podido constatar en experiencias previas²¹⁹ en las que hemos comprobado una marcada disminución de la sensibilidad al aumentar estos dos grupos de pacientes. Los autores que han estudiado TB con baciloscopias negativas, comunican sistemáticamente cifras bajas de sensibilidad de la técnica. Así, Charpin et al²⁴⁸ investigando la presencia de IgG específica frente a Ag 60 en el suero de este tipo de tuberculosos, ha comunicado una sensibilidad del 48% y Chan et al²⁴⁷ entre el 16 y el 22%, utilizando cuatro tipos de Ags en su estudio. Sin embargo, aunque el grupo de TB extrapulmonares ha sido poco estudiado, algunos autores^{158,113,213} han referido buenos resultados, a pesar de ser una

forma de TB poco bacilífera.

Otro aspecto importante de la rentabilidad de la técnica que se quiso valorar fue la capacidad que ésta tendría de evitar la realización de fibrobroncoscopia en pacientes con TB pulmonar en los que la baciloscopia inicial de esputo era negativa. Nuestros resultados sugieren para esta técnica una rentabilidad similar a la del esputo. Es decir, el 59,25% de los pacientes con TB pulmonar a los que se les practicó una fibrobroncoscopia con intenciones diagnósticas, hubieran podido ser diagnosticados por serología sin necesidad de recurrir a exploraciones más agresivas. Además, es importante señalar como de estos 27 enfermos, sólo en 8 la baciloscopia del broncoaspirado resultó diagnóstica, lo que supone una sensibilidad del 29,62%, casi la mitad de la obtenida con técnicas serológicas.

V.3.2. ESPECIFICAD DE LA TECNICA

En publicaciones previas^{218,219}, hemos mostrado nuestra preocupación por realizar una buena selección de los grupos control para que la técnica empleada pueda ser evaluada correctamente. Es sorprendente observar, como en muchos de los trabajos que han servido de referencia tradicional en este campo, los controles los forman grupos de sujetos sanos y muy escaso número de enfermos neumológicos^{60,86,87,203}.

El clínico suele tener pocos problemas para diferenciar entre una

DISCUSION

persona sana y un enfermo tuberculoso, pero no es raro, sin embargo, tener dificultades para asegurar si unas lesiones radiográficas sugestivas de TBR tienen actividad o no; o poder diferenciar entre una TB y una micobacteriosis pulmonar. Por este motivo, en nuestra población estudiada se han incluido, entre los controles, un buen número de enfermos con patologías que se pueden confundir con la TB, incluidas las neumonías inespecíficas de los lóbulos pulmonares superiores. Por otra parte, al no disponer de enfermos con micobacteriosis pulmonar, se incluyó un amplio grupo de leprosos, enfermedad producida por una micobacteria que posee el Ag 60.

Como se ha visto, entre los grupos control, los mayores niveles de Acs específicos los hemos encontrado en estos dos tipos de pacientes, que han sido la causa de que la especificidad global del test en este estudio haya sido relativamente baja (90%). Otros autores que han incluido entre sus controles tuberculosis inactivas^{158,149,153}, otras micobacteriosis^{84,91,153}, y pacientes con lepra^{91,133}, también han encontrado títulos de Acs específicos elevados y un número importante de falsos positivos entre ellos. Estos hechos apoyan la necesidad de incluir este tipo de pacientes entre los grupos control, para una correcta valoración de la utilidad clínica de la técnica diagnóstica, ya que la inespecificidad en ellos adquiere una mayor importancia por la similitud de los cuadros clínicos.

Por otra parte es importante reseñar que la inespecificidad observada entre las TBRs no va a poder obviarse aunque se llegara a aislar un Ag completamente específico de la *M. tuberculosis*. Este problema sólo podrá

DISCUSION

resolverse cuando conozcamos en profundidad la respuesta inmune humoral de la TB y podamos delimitar cuanto tiempo debe transcurrir para la negativización de una prueba serológica en pacientes clínicamente estabilizados con o sin tratamiento médico. Quizás, como han comunicado recientemente Charpin et al²⁴⁸, la detección de IgM pueda jugar un papel importante, al ser esta Ig la que más precozmente se eleva ante un estímulo infeccioso, para desaparecer a las pocas semanas, coincidiendo con un incremento y mayor persistencia de IgG⁶⁵.

A pesar de que en algunos trabajos^{82,84,153}, se ha comunicado un mayor número de falsos positivos entre los sujetos sanos con intradermorreacción tuberculínica positiva, en este estudio y, al igual que la gran mayoría de los autores que han utilizado la técnica ELISA^{88,87,116}, no se han observado diferencias significativas entre los sanos tuberculín positivos y los negativos.

También se ha comprobado, en todos los pacientes con SIDA incluidos en el estudio, la ausencia de falsos positivos. Dada la enorme importancia de la TB en estos pacientes, muchas veces difícil de diagnosticar por sus manifestaciones clínico-radiológicas atípicas, esta técnica diagnóstica puede ser prometedora.

V.3.3. VALOR PREDICTIVO POSITIVO

Desde el punto de vista clínico, para una correcta evaluación de la

DISCUSION

rentabilidad diagnóstica de la técnica la sensibilidad, especificidad y valores predictivos han de valorarse en una población determinada: Un grupo preseleccionado con síntomas o signos radiológicos de TB; o sujetos con sospecha de TB debido a un contacto reciente con un tuberculoso; o por su pertenencia a grupos de alto riesgo.

La fiabilidad de una predicción positiva en un test de serodiagnóstico es esencial desde el punto de vista clínico, puesto que una determinada actitud (instauración de un tratamiento o abandono de la investigación diagnóstica) puede derivarse de un resultado positivo del test³⁷. Esta fiabilidad de la predicción positiva, esencial para la toma de decisiones, se relaciona con la sensibilidad y la especificidad del test, pero también, con la prevalencia de la enfermedad en el grupo de sujetos potencialmente evaluables por la prueba. En una situación de baja prevalencia, una alta especificidad es importante puesto que resultados falsos positivos entre muchas personas sin enfermedad pueden fácilmente superar los resultados verdaderos positivos en personas con la enfermedad⁸⁸.

Según los cálculos realizados en nuestra Sección en los últimos tres años, en el grupo de sujetos candidatos a ser evaluados por técnicas serológicas, la prevalencia de TB sería de 0,67. La Tabla de contingencia para nuestro grupo de pacientes sería la que se muestra en la Tabla XI. Dada nuestra sensibilidad (55%) y especificidad (90%) globales, el valor predictivo del test (porcentaje de verdaderos positivos entre todos los positivos) sería del 92%.

DISCUSION

TABLA XI. TABLA DE CONTINGENCIA PARA UNA PREVALENCIA DE TB DE 0.67.

<i>Test</i>	<i>Enfermedad</i>		<i>Total</i>
	<i>+</i>	<i>-</i>	
<i>+</i>	369	33	402
<i>-</i>	301	297	598
<i>Total</i>	670	330	1000

Sensibilidad 55%
Especificidad 90%

Es evidente que el Ag 60, con un valor discriminativo de 240 UE, presenta un VPP para un ELISA aislado no ideal, pero si clínicamente útil, cuando se realiza en un grupo de pacientes preseleccionados por criterios clínico-radiológicos o epidemiológicos.

V.4. VALORACION DE LA TECNICA EN LIQUIDO PLEURAL

V.4.1. CONSIDERACIONES GENERALES

La TB pleural es, a menudo, difícil de diagnosticar debido a su paucibacilaridad. La identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes en la tinción directa de líquido pleural se estima que puede suceder en el 10% de los casos de TB pleural⁵⁰ e incluso en porcentajes más bajos, como sucedió en nuestra población. Los cultivos de líquido pleural son positivos en el 25-75%⁵⁰ de los enfermos, pero suponen un gran retraso en el diagnóstico.

Las muestras histológicas de pleura parietal pueden mostrar bacilos o la presencia de granulomas caesificantes que sugieren el diagnóstico de TB, pero requiere la realización de una técnica agresiva no exenta de complicaciones. El frotis directo de los especímenes de biopsia pleural muestran bacilos ácido-alcohol resistentes entre el 14% y el 34%²⁴⁹⁻²⁵¹, siendo positivo sólo en un paciente en nuestra serie (4%). En el 78,5% de nuestros casos, el diagnóstico se estableció en base a los hallazgos histológicos en las muestras de pleura parietal. Este porcentaje es similar al comunicado por otros autores^{249,251-255}. Sin embargo, no hemos de olvidar que el diagnóstico definitivo depende de la identificación en el cultivo del *M. tuberculosis* en el líquido pleural o en la biopsia pleural.

V.4.2. RENTABILIDAD DEL TEST EN LA TUBERCULOSIS PLEURAL

En la actualidad, se han publicado muy pocos trabajos sobre la identificación de Acs antimicobacterianos en líquido pleural^{225-227,256} y nunca utilizando Ag 60. En contraste, algunos autores han demostrado la acumulación de linfocitos T en líquido pleural, estando disminuidos los linfocitos B y, por tanto, la capacidad para producir Igs^{224,256}.

Algunos autores²²⁹, además, han apuntado problemas técnicos para emplear un test ELISA en líquido pleural. A pesar de esto, nosotros hemos encontrado válido este test para el diagnóstico de la TB pleural, siendo su sensibilidad y especificidad más altas que las de las técnicas microbiológicas.

Hemos encontrado, como Van Vooren²²⁷ con Ag P-32, Murate²²⁵ con PPD y Levy²²⁶ con extractos proteicos crudos de *M. tuberculosis* y *M. avium*, niveles significativamente más altos de IgG anti A 60 en pacientes tuberculosos que en los controles, tanto en suero como en líquido pleural. Estos trabajos no refieren rentabilidad de la técnica en terminos de sensibilidad y especificidad, salvo el firmado por Murate et al²²⁵, en líquido pleural, mostrando valores de 22,6% y 94,9% respectivamente, porcentajes más bajos que los encontrados en este estudio.

V.4.3. RELACION ENTRE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS EN SUERO Y LIQUIDO PLEURAL

Se realizó análisis de regresión lineal de la relación existente entre los Acs anti-A60 en suero y líquido pleural y se pudo comprobar, como sugerían Levy et al²²⁶, una correlación muy estrecha entre ellos y que, con toda probabilidad, los niveles de IgG específica en líquido pleural son debidos a difusión pasiva y no a producción local. No había diferencias significativas en la inclinación de la regresión del suero respecto a líquido pleural, tanto en tuberculosos como en los controles. Esto apoya la hipótesis de la ausencia de producción local de IgG a pesar de que estudios recientes refuerzan la teoría de la «compartimentalización»^{50,51,223,225,226} y de los hallazgos de Van Vooren²²⁷, que encuentra que la proporción de Acs específicos de la clase IgA e IgG era más alta en líquido pleural que en suero en cuatro de cinco casos. En todo caso, la inmunidad humoral en la TB no parece jugar ningún papel en la patogénesis del derrame pleural de esta etiología.

Por otra parte, en vista de la sensibilidad y especificidad de la técnica que estudiamos, tanto en suero como en líquido pleural, y de la relación que hemos demostrado entre ambas, no hay evidencia de que la detección de Acs específicos en líquido pleural añada sensibilidad o especificidad diagnóstica a la realizada con serodiagnóstico.

V.5. INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS FALSOS POSITIVOS

En el seno de una población en la que el índice tuberculínico permanece alto, especialmente en sujetos de edades más avanzadas, como sucede en nuestro medio, una TB primaria o, fundamentalmente postprimaria, previa no diagnosticada podría mantener Acs circulantes; esto aparece en algunos casos de TB primaria curada y, de forma más evidente, en la TB postprimaria inactiva. Para individuos no tuberculosos con intradermorreacción tuberculínica negativa, esta interpretación supondría una evolución divergente de la respuesta inmune celular (negativa) y de la respuesta inmune humoral (ELISA positivo).

Por otra parte, la infección con micobacterias ambientales no patógenas o la colonización de la vía aérea por micobacterias potencialmente patógenas (*M. avium complex* o *M. fortuitum*, por ejemplo) es frecuente en sujetos con patología de la vía aérea y se está refiriendo cada vez mayor prevalencia en algunos países. Estas micobacterias comparten algunos Acs o epítomos con la *M. tuberculosis*, hecho que debe tenerse en consideración a la hora de interpretar los resultados falsos positivos.

V.6. INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS FALSOS NEGATIVOS

En infecciones tuberculosas importantes, la liberación de Ags micobacterianos puede conducir a la formación de inmunocomplejos, lo que resulta, finalmente, en una reducción de la actividad de los Acs específicos en el suero¹⁸⁴. Una enfermedad de larga evolución, el alcoholismo u otras circunstancias como el hábito tabáquico, que ya hemos referido como un significativo determinante de la respuesta inmune humoral en otras enfermedades respiratorias de base inmunológica²⁴², podrían ser los responsables de una respuesta humoral específica disminuida en algunos pacientes con enfermedad activa, especialmente antes de iniciar el tratamiento quimioterápico.

En esta serie no hemos podido demostrar la influencia del tabaco en la disminución de la respuesta inmunológica humoral, aunque las circunstancias epidemiológicas del tabaquismo respecto a la enfermedad tuberculosa podrían justificar estos hallazgos. Otros autores^{196,197} han observado un incremento del número de monocitos y linfocitos T supresores en la TB aguda, que podrían ser responsables de una actividad disminuida de los linfocitos B y, por tanto, de una disminución del nivel de Acs.

Otra explicación de la débil respuesta inmunológica humoral observada antes del tratamiento (baja sensibilidad) podría ser debida a que la porción lipídica de la membrana micobacteriana, aislaría la capa glicoproteica y por tanto, evitaría la estimulación del sistema inmune humoral. Naturalmente, el

DISCUSION

tiempo de evolución antes de realizar el test serológico y la severidad de la enfermedad, influirán en el resultado. Esto puede tener su importancia desde un punto de vista epidemiológico, ya que el momento en el que se practicará el test, no será el mismo en los países industrializados que en los países subdesarrollados. Por otra parte, también sabemos que los títulos de Acs son mayores cuando una infección primaria provoca manifestaciones clínicas, que cuando cursa de forma asintomática.

V.7. CINETICA DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL

V.7.1. ANALISIS DE RESULTADOS

A pesar de que se han realizado múltiples estudios sobre la respuesta inmunitaria humana durante la infección y enfermedad tuberculosa, no se ha llegado a definir claramente el papel que juega la producción de Acs en esta afección⁶⁵. Generalmente, los pacientes con enfermedad avanzada presentan hipergammaglobulinemia policlonal⁶⁵ y se ha descrito una relación por la cual el incremento en la actividad de los linfocitos B y en su capacidad de producir Acs, irá asociada a una menor actividad de los linfocitos T y, por tanto, con cierto grado de anergia⁶⁹. Por ello, al estado de la inmunidad humoral en la TB se le ha llegado a conceder una importancia pronóstica en esta enfermedad^{64,70}.

En nuestro estudio, utilizando una técnica ELISA, hemos cuantificado la IgG específica a lo largo del tratamiento quimioterápico y en un período posterior de seguimiento de 18 meses. Comprobamos que los títulos de Acs se incrementaban notablemente durante los primeros meses de tratamiento, alcanzando su mayor nivel en el segundo mes. Este incremento de la respuesta inmune humoral ha sido descrito por otros autores^{87,105,106,183-185}. Kaplan y Chase^{104,105}, utilizando un test de microinmunodifusión, encontraron que la sensibilidad de su prueba se incrementaba, desde un 46% inicial a un 60% a lo largo del tratamiento en los pacientes con TB adquirida

recientemente; y de un 66% a un 75% en los casos de recidiva de la enfermedad. Asimismo, estos autores refieren que los pacientes en los que no se detectaban Acs al inicio del tratamiento, requerían de 6 a 8 semanas para la seroconversión; mientras que los enfermos seropositivos, mostraban un incremento rápido de los títulos de Acs específicos con el inicio del tratamiento. Algo similar fue encontrado por Janicki et al¹¹⁵, aunque estos autores encontraban el cénit de la respuesta al tercer mes de tratamiento.

Efectivamente, parece probable que el nivel máximo de Acs se produzca alrededor del segundo-tercer mes de tratamiento^{87,105,106,115,183}, hallazgos superponibles a los encontrados en este estudio. Además, en nuestro trabajo, hemos encontrado que, al segundo mes de iniciado el tratamiento, 11 de los 18 pacientes con TB pulmonar y 2 de los 16 con TB extrapulmonar, positivizaron un test previamente negativo. La sensibilidad de la prueba pasó del 52,7% inicial al 70,8% al segundo mes, que llegó hasta el 86,3% cuando sólo se consideraron las TB extrapulmonares. Teniendo en cuenta estos datos y los comunicados por otros autores^{87,105,106,115,183}, la mayor rentabilidad en el diagnóstico serológico de la TB se obtendría entre el segundo y el tercer mes de tratamiento.

El conocimiento de esta cinética en la respuesta inmune humoral podría ser útil en situaciones especiales, no infrecuentes en la práctica diaria. Es el caso, por ejemplo, de pacientes con sospecha de TB y baciloscopia negativa, en los que nos vemos obligados a instaurar un tratamiento antituberculoso sin confirmación bacteriológica, a pesar, en muchos casos, de múltiples intentos

diagnósticos, incluso con procedimientos invasivos (vease Tabla XII).

TABLA XII. PROPORCION DE TODOS LOS CASOS DE TB ACTIVA CONFIRMADAS BACTERIOLOGICAMENTE EN DISTINTOS PAISES.

PAISES	TASAS (%)
<i>Norte América</i>	
EE.UU	87
CANADA	77
<i>Europa</i>	
HOLANDA	63
SUECIA	80
NORUEGA	60
URSS	50
POLONIA	68
DINAMARCA	85
<i>Asia</i>	
JAPON	28
COREA	27
SINGAPUR	50
MALASIA	63
VIETNAM	41
<i>Oceanía</i>	
ISLAS SOLOMON	30
NUEVA GUINEA	39
FIJI	57

En la mayoría de los países en vías de desarrollo uno de los principales métodos de diagnóstico de la TB es el examen microscópico del esputo obtenido de sujetos "sintomáticos". En esos países, la tasa de confirmación bacteriológica es alta, pero, obviamente, los casos en los que hay enfermedad activa con una población bacteriana más pequeña (aquellos cuyo diagnóstico se basa en el cultivo o en hallazgos clínico-radiológicos) nunca son diagnosticados. Tabla modificada de Grzybowski para el período 1976-1981.

V.7.2. INTERPRETACION TEORICA DE LOS RESULTADOS

Una de las explicaciones para entender este incremento de los títulos de Acs durante los primeros meses de tratamiento, podría ser la lisis masiva de micobacterias por la potente acción bactericida de los fármacos actuales y la liberación de material antigénico que estimularía la formación de Acs¹⁰⁵. En los pacientes en los que los títulos iniciales ya eran elevados, esta

liberación antigénica se habría producido por la lisis de las micobacterias ocasionada por las propias defensas del huésped, con liberación de Ags glicoproteicos y desencadenamiento de una respuesta inmune humoral^{105,257}. Otra explicación a estos títulos elevados sería la presencia de una gran población bacilar o bien una mayor evolución de la enfermedad.

V.7.3. PERSISTENCIA DE TITULOS ELEVADOS

Otro dato importante a señalar es la persistencia de títulos elevados de IgG anti-Ag 60 una vez curada la enfermedad. Este aspecto tiene un gran interés práctico porque va influir directamente sobre los resultados de los estudios serológicos de los pacientes con TB activa. Sin embargo, este punto ha sido escasamente analizado y con resultados dispares. Así, Koshino et al¹⁴⁹, encontraron que con el ELISA que ellos realizaban, obtenían valores positivos en 6 de los 7 casos con una inactividad de su TB inferior a seis meses y, tan solo en dos de los 12 casos con TB inactiva de más de seis meses de evolución. Por contra, Kalish et al¹⁵³ sólo encontraban la prueba claramente negativa en 3 de los 7 casos con TB tratada en los últimos 10 años y en 9 de los 13 que superaban este tiempo de curación.

En nuestro estudio, como se puede ver en la Tabla VIII, observamos que a los 12 y 18 meses de curada la enfermedad (decimoctavo y vigesimocuarto mes de seguimiento en nuestro protocolo), el 51% y 43,1% respectivamente, de los pacientes con TB pulmonar tenían títulos significativos de Acs

específicos. Estos porcentajes son elevados y deben ser tenidos muy en cuenta en los estudios serológicos de la TB, porque van a ser fuente muy importante de falsos positivos tal como hemos comprobado con el grupo de TBR de este trabajo y otros previos de nuestro grupo²¹⁹. Además, como queda reflejado en la figura 14, los valores medios de los títulos de Acs obtenidos a los dos años de seguimiento -18 meses después de haber finalizado con éxito el tratamiento-, continúan situándose por encima del nivel de positividad calculado para nuestra población²¹⁹.

Estas observaciones concuerdan con los hallazgos de Cocito et al¹⁶¹ sobre la cinética de la respuesta inmune en la rata. Estos autores tras inmunizar a la ratas con Ag 60 administrado por vía subcutánea comprobaron, a los tres meses, una respuesta primaria de Acs seguida por otra respuesta secundaria mucho más prolongada. Estos mismos datos se apoyan en observaciones aisladas en humanos, donde títulos de Acs frente a Ag 5 detectados por ELISA, permanecieron estables hasta 16 meses tras quimioterapia antituberculosa⁸⁶. Se han descrito disminuciones más lentas, de hasta al menos tres años, utilizando, como Ag, filtrados de cultivos de micobacterias¹⁸⁵.

En nuestro medio, donde son frecuentes las TBR no tratadas o insuficientemente tratadas, no es raro encontrar títulos elevados de Acs IgG específicos, lo que probablemente sea debido, no sólo a un recuerdo inmunológico de desaparición lenta, sino más bien a una persistencia del estímulo antigénico.

V.8. ANTIGENO 6

V.8.1. COMPORTAMIENTO EN LAS TUBERCULOSIS RESIDUALES

Hemos observado, en las TBR, una respuesta inmune humoral IgG mediada frente al Ag 6, muy diferente a la objetivada con Ag 60.

A pesar de que la TB está producida por un único microorganismo, éste, desde su ingreso en el huésped, se comporta como un germen polivalente, singularidad debida, muy probablemente, a que su metabolismo es dependiente de las variaciones tensionales de oxígeno y de las modificaciones del pH del órgano que infectan.

V.8.1.1. Hipótesis de la población persistente

Una hipótesis que explicaría, al menos parcialmente, el comportamiento observado de la IgG específica frente al Ag 6, sería que éste se expresara o fuera más potente en poblaciones bacilares de menor actividad metabólica.

El cuarto de los grupos bacilares descritos por Mitchison²⁵⁸ lo constituiría una población persistente o totalmente durmiente. Son gérmenes sin actividad metabólica por lo que no existe capacidad destructiva por parte de los fármacos. Es probable que tan solo los mecanismos de defensa

individuales sean capaces de ejercer algún control sobre ellos. Una teoría aceptable sería, pues, que el Ag 6 se expresara de forma más potente en esta población de gérmenes y que, a pesar de un tratamiento correcto, la respuesta inmune humoral persistiera elevada durante muchos años ante un estímulo antigénico mantenido.

¿Por qué el nivel de Acs específicos frente a este Ag son progresivamente más elevados?

V.8.1.2. Hipótesis de las formas ultrafinas

Otra hipótesis que podría explicar este hallazgo observado en nuestro estudio habría que buscarla en las llamadas formas ultrafinas. Desde principios de este siglo, se comenzó a sospechar la posibilidad de que el *M. tuberculosis* pudiera adoptar formas atípicas que le permitieran subsistir cuando las condiciones le eran completamente desfavorables.

En 1.910, Fontes²⁵⁹ sugirió la existencia de formas ultrafinas de este patógeno que serían capaces de atravesar los filtros bacterianos. Estas formas, a las que durante muchos años se les conoció con el nombre de gránulos de Much, han sido aceptadas por muchos autores y negadas por otros. Actualmente, a medida que los conocimientos sobre el *M. tuberculosis* aumentan, se hace cada vez más necesario acudir a esta teoría para explicar situaciones como la persistencia microbiana o determinadas recidivas en las

pautas actuales de tratamiento²⁶⁰.

Algunos autores han tratado de encontrar una analogía entre estas formas y las denominadas formas «L» de otros géneros de bacterias, que también atraviesan los filtros bacterianos. Sin embargo, parece que existen notables diferencias entre ambas, ya que las formas «L» se desarrollarían como un proceso de mutación bacteriano, mientras que las formas ultrafinas del bacilo tuberculoso constituyen una forma de adaptación de este microorganismo para ser capaz de multiplicarse en condiciones desfavorables.

Estas formas ultrafinas fueron documentadas en 1.966 con animales de experimentación que habían sido inoculados con *M. tuberculosis*. A estos animales se les trató con INH y PZ hasta que se consiguió la ausencia de gérmenes de los tejidos de forma estable, comprobándose cómo varios meses después de suspender el tratamiento, podían volver a aparecer los gérmenes tras la administración de corticoides²⁶¹. Recientemente, Khomenko²⁶² ha llevado a cabo un excelente trabajo en el que ha conseguido detectar directa e indirectamente estas formas ultrafinas del bacilo tuberculoso. Directamente mediante su visualización con el microscopio electrónico, e indirectamente por cultivo, en medio líquido semisintético y microscopía posterior del sedimento de éste, y por inoculación del material en animales de experimentación. El estudio se realizó sobre 130 enfermos tuberculosos, de los cuales 105 tenían lesiones cavitarias. Antes de comenzar el tratamiento se pudieron detectar formas típicas de *M. tuberculosis* en el 68% de los pacientes y formas ultrafinas en el 53%. Sin embargo, a lo largo del tratamiento (INH, RIF y

DISCUSION

Estreptomycin) disminuían progresivamente las formas bacilares típicas hasta prácticamente desaparecer a los seis meses. Mientras tanto, las formas ultrafinas se incrementaban notablemente, siendo este incremento mucho más notable en los pacientes que tenían TB cavitaria y, por lo tanto, una población bacilar típica antes de iniciar la terapéutica, hallazgo que también sería concordante con la hipótesis explicativa de nuestras observaciones. El incremento de las formas ultrafinas fué del 53% al inicio hasta el 82% en el tercer mes, persistiendo en el 83% en el sexto mes de tratamiento. En los pacientes con TB no cavitarias estos incrementos eran menores lo cual explicaría también la relación observada en nuestro estudio entre la severidad de la alteración radiológica residual y los niveles de IgG anti Ag 6.

Las características de estas formas ultrafinas son diferentes a las de las formas típicas del *M. tuberculosis*. Tienen un tamaño 20 veces inferior, poseen forma esférica o cocoide, no crecen en los medios de cultivo habituales y su composición proteica es reducida. Sin embargo, su inoculación en el animal de laboratorio es capaz de producir una inflamación granulomatosa característica y de inducir una respuesta inmunitaria manifestada por un incremento en los Acs frente a la tuberculina.

Es muy probable que estas formas estén implicadas en el fenómeno de «persistencia microbiana» tan típico de esta enfermedad (aunque no exclusivo de ella) y que se caracteriza por la capacidad del *M. tuberculosis* de estar alojado en los tejidos sin que necesariamente produzca enfermedad clínica²⁶³. Sería un comportamiento parecido al observado con el *M. leprae*²⁶⁴ y que

explicaría el hallazgo en nuestro estudio de niveles elevados de IgG anti Ag 6 en LL con varios años de inactividad.

V.8.2. RENTABILIDAD CONJUNTA EN LA TUBERCULOSIS RESIDUAL

Al estudiar el comportamiento del Ag 60 y del Ag 6 en la TBR, observamos importantes diferencias entre uno y otro. Mientras que los niveles de la IgG específica frente al Ag 60 disminuyen con el tiempo de evolución, los correspondientes al Ag 6 se incrementan. Sin querer sacar con ello conclusiones de aplicación rutinaria, sí podría decirse que frente al problema no infrecuente de dilucidar actividad bacteriológica ante unas lesiones radiológicas aparentemente residuales, unos niveles de IgG específica bajos frente a Ag 60 y elevados frente a Ag 6, harían improbable la presencia de enfermedad activa.

V.8.3. IGM ESPECIFICA FRENTE AL ANTIGENO 6

El diagnóstico de la TB, especialmente en sus estadios más precoces, es, a veces, difícil. Las características clínicas inespecíficas de la enfermedad y las proteiformes manifestaciones radiológicas contribuyen a esta dificultad. Respecto a estas últimas, los hallazgos radiológicos son atípicos en más del 30% de los pacientes con TB en países desarrollados²⁸⁵. Hasta que se forman cavidades, las baciloscopias de esputo suelen ser negativas, estimándose que

DISCUSION

la tinción directa es negativa entre el 30 y el 50% en estos mismos países^{6,266}.

Especulando con la posibilidad de que la detección de IgM específica, al ser ésta la primera en incrementarse ante un estímulo infeccioso, pudiera ayudar en el diagnóstico precoz de la TB, se procedió a su detección frente al Ag 6. Esta Ig demostró una aceptable especificidad frente al Ag 6, especialmente al eliminar de los casos control los pacientes leprosos, con los que difícilmente vamos a tener problemas de diagnóstico diferencial. Su sensibilidad fue del 36% superior al 28% objetivado con IgG, consiguiendo un 30% en las TB extrapulmonares. Quizá lo más llamativo sea el 47,8% observado en el grupo de pacientes con TB y baciloscopia negativa, que fué el grupo con el que demostró una mayor sensibilidad, reflejando presumiblemente, su eficacia en los estadíos más precoces de la enfermedad.

Esta rentabilidad podría ser mejorada empleando otros Ags con una probable mayor potencia en bacilos metabólicamente más activos²⁴⁸ o en países en que la consulta médica sea más precoz que en el nuestro y, por tanto, se detecten casos de un menor tiempo de evolución.

V.8.4. RENTABILIDAD DEL ANTIGENO 6 VERSUS ANTIGENO 60

La comparación de la rentabilidad de ambos Ags es difícil dado la metodología diferente utilizada. No obstante, el análisis conjunto de IgG e IgM

DISCUSION

frente a Ag 6 no mostró resultados significativamente mejores que los obtenidos en el más amplio estudio de IgG frente al Ag 60. Ambos Ags presentan una especificidad semejante para el diagnóstico de la TB, siendo los responsables de los falsos positivos los casos de lepra estudiados y de TBR.

Sin embargo si merece la pena reseñar la sensibilidad obtenida en casos de TB pulmonar con baciloscopia negativa. Utilizando ambas Igs frente al Ag 6 se obtuvo un 56,5% de sensibilidad, mientras que con la IgG frente al Ag 60 se consiguió una sensibilidad del 39% al analizar los mismos pacientes. Es un dato importante dado que es esta situación clínica en la que el diagnóstico serológico puede desempeñar un papel interesante.

VI. CONCLUSIONES

VI.1. CONCLUSIONES

- 1.- La técnica ELISA para el diagnóstico serológico de la TB es un método rápido, sencillo y barato que merece la pena desarrollar.
- 2.- Los niveles de IgG anti-Ag 60 guardan relación directa con la población bacilar.
- 3.- El test serológico presenta utilidad clínica fundamentalmente en:
 - TB pulmonar con ZN negativo.
 - TB extrapulmonar.
 - En casos de TB pulmonar con manifestaciones clínico-radiológicas atípicas, como sucede frecuentemente en el SIDA.
- 4.- Los niveles de IgG anti-Ag 60 en líquido pleural son debidos a difusión pasiva y no a producción local.
- 5.- La determinación en líquido pleural de Acs específicos frente al Ag 60, no incrementa ni la sensibilidad ni la especificidad obtenida con el test serológico.
- 6.- En la TB pleural, el test ELISA con IgG anti-Ag 60, tanto en suero como en líquido pleural, tiene una notable mejor rentabilidad que las técnicas microbiológicas convencionales en líquido pleural.

CONCLUSIONES

7.- Los títulos de Acs específicos frente al Ag 60 alcanzan su nivel máximo en torno a los dos meses del diagnóstico y caen lentamente tras la curación. En casi la mitad de los casos de TB pulmonar, el test permanece positivo a los dos años de seguimiento.

8.- El test ELISA con IgG anti-Ag 60 es inapropiado para distinguir entre TB activa y TB inactiva residual.

9.- El Ag 6 no presenta mayor rentabilidad diagnóstica que el Ag 60.

10.- En las TBRs, cuando consideramos grupos de diferente tiempo de evolución, se comprueba un comportamiento distinto del Ag 60 y del Ag 6, disminuyendo la IgG frente al primero y aumentando frente al segundo, a medida que contemplamos períodos de tiempo más avanzados.

VII. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. **Comstock GW.** Epidemiology of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1.982; 125 (Parte 2): 8-15.
2. **March Ayuela.** Problemática actual de la Tuberculosis. Una revisión epidemiológica. *Arch Bronconeumol* 1.980; 16: 29-34.
3. **Generalitat de Catalunya.** Department de Sanitat i Seguretat Social. Epidemiología de la tuberculosis. Informe: La Tuberculosis en Cataluña. Generalitat de Catalunya 1.983; 33.
4. **Generalitat de Catalunya.** Department de Sanitat i Seguretat Social. Epidemiología de la tuberculosis. Informe: La Tuberculosis en Cataluña. Generalitat de Catalunya 1.983; 35-41.
5. **Shimao T.** Tuberculosis: Epidemiología y programas de control. *Bull Int Union Tuberc* 1.982; 62 (3): 143-5.
6. **Styblo K, Rouillon A.** Estimated global incidence of smear positive pulmonary tuberculosis. Unreliability of officially reported figures on tuberculosis. *Bull Int Union Tuberc* 1.981; 56: 118-125.
7. **OMS.** Lucha antituberculosa. Informe de un grupo mixto de estudio UICT/OMS. Serie de Informes Técnicos 1.982; 671.
8. **Murray CJL, Styblo K, Rouillon A.** Tuberculosis in developing countries:

BIBLIOGRAFIA

- burden, intervention and cost. Bull Int Union Tuberc 1.990; 65: 1-20.
9. Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. Tubercle 1.991; 72: 1-6.
 10. Bulla A. Worldwide review of officially reported tuberculosis morbidity and mortality (1967-1971-1977). Bull Int Union Tuberc 1.981; 56: 111-7.
 11. Tala E. Five years trend of tuberculosis in Europe-IUATLD Europe Region and who study. Am Rev Respir Dis 1.990; 141 (Supl): A254.
 12. Caminero JA, Díaz F, Rodríguez de Castro F et al. Epidemiología de la enfermedad tuberculosa en la isla de Gran Canaria. Med Clin 1.991; 97: 8-13.
 13. Vidal R, Ruiz J. ¿Aumenta la tuberculosis en España?. Med Clin 1.986; 86: 845-7.
 14. Caylá JA, Jansa JM, Batalla J, Díez A, Parellada N, García A. Tuberculosis en Barcelona. Analisis de los 899 casos notificados en 1.986. Med Clin 1.988; 90: 611-6.
 15. Caylá JA. Situacion actual de la tuberculosis en España y en Barcelona. Nuevos problemas en el control de una vieja enfermedad. II Jornadas

BIBLIOGRAFIA

- de Actualización en Tuberculosis Pulmonar y I Reunión del Grupo TIR de la SEPAR. Libro de Resúmenes y Comunicaciones. Valencia 1.989.
16. Miret P, Carrillo E, González P, López JL, Martín A, Pina JM. Programme against tuberculosis in an area of 5.153 kilometres and 1.100.000 inhabitants, in Cataluña (Spain). Am Rev Respir Dis 1.990; 141 (Supl): A453.
 17. Grupo de Trabajo TIR. Epidemiología de la tuberculosis en España. Resultado de las encuestas realizadas por el Grupo TIR en 1.988. Arch Bronconeumol 1.991; 27: 202-9.
 18. Taberner JL, Juvanet J, García A. La infección y la morbilidad tuberculosa en Barcelona. Gas San 1.982; 1: 9-14.
 19. Generalitat de Catalunya. Department de Sanitat i Seguretat Social. Epidemiologia de la tuberculosis. Informe: La tuberculosis en Cataluña. Generalitat de Catalunya 1.983; 47-86.
 20. March P. La evolución de la tuberculosis en Barcelona: 60 años de observación, 1.921-1.981. Rev Enferm Torax 1.982; 121: 53-88.
 21. March P. El declive de la infección tuberculosa en España. Rev Clin Esp 1.985; 176: 70-1.

BIBLIOGRAFIA

22. **March P.** La evolución de la tuberculosis en España: situación actual. Dificultades y errores epidemiológicos. Arch Bronconeumol 1.987; 23: 181-91.
23. **Styblo K, Sutherland K.** Indices epidemiologiques en vue de la planification de la surveillance et de l'évaluation des programmes antituberculeux. Bull Int Union Tuberc 1.974; 49: 74.
24. **Rieder HL, Cauther GM, Kelly GD et al.** Tuberculosis in the United States. JAMA 1.989; 262: 385-9.
25. **Centers for Disease Control.** Cumulative 52nd week ending. MMWR 1.989; 37: 797.
26. **Cuesta V, Bazerque E, Rodríguez J.** Registration of tuberculosis in Latinamerica. 1.990 World Conference on Lung Health. Am Rev Respir Dis 1.990; 141 (Supl): A257.
27. **Garros J, Iturriaga A, García E.** Estudio de 1.096 casos de tuberculosis pulmonar en Vizcaya. Años 1.982-1.987. Arch Bronconeumol 1.990; 26: 199-203.
28. **Pina JM, Bravo H, Espinar A, Miret P.** Estudio comparativo de dos grupos de enfermos tuberculosos ingresados en 1.966 y en 1.976. Arch Bronconeumol 1.979; 15: 151-4.

BIBLIOGRAFIA

29. **Salinas C, España P, Oribe M, Aguirrenomoscora JI, Capelastegui A.** Integración de un plan de control de tuberculosis en el Sistema General de Salud. Arch Bronconeumol 1.990; 26 (Supl 1): 44-5.
30. **Center for Diseases Control.** Tuberculosis in the United States. DHEW Publication No (CDC) 76-8322. Atlanta: Center for Disease Control 1.976: 37.
31. **Bloch A.** Tuberculosis case rates (per 100.000 population) United States, 1.984. En: Comstock GW, ed. Tuberculosis: a bridge to chronic disease epidemiology. Am J Epidemiol 1.986; 124: 1-16.
32. **Alcaide J, Alet MN, Taberner JL, Garrido P, Salleras L.** Epidemiología de la tuberculosis en Cataluña: 1.982-1.989. Med Clin 1.990; 95: 529-34.
33. **Center for Disease Control.** Tuberculosis in the United States 1.978. HHS Publication No (CDC) 80-8322. Atlanta: Center for Disease Control 1.980: 3.
34. **National Tuberculosis Institute Bangalore.** Tuberculosis in a rural population of South India: A five-year epidemiological study. Bull WHO 1.974; 51: 473-88.
35. **Styblo K.** Epidemiology of Tuberculosis. VEB Gustav Fischer Verlag Jena. 1.984.

BIBLIOGRAFIA

36. Daniel TM, Debanne SM. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by Enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis* 1.987; 135: 1.137-51.
37. Pérez M. Situación actual de la lepra en España. II Reunión Nacional del Grupo Español de Micobacteriología. Barcelona 1.989.
38. Davidson PT. Diseases caused by mycobacteria other than *Mycobacterium Tuberculosis*. En: Fishman AP, ed. *Pulmonary diseases and disorders*, 2ª Ed. USA: McGraw-Hill Book Company, 1.988: 1.863-8.
39. Casal Román M. Diagnóstico de las micobacteriosis. En: Bio-Sell SA, ed. *Microbiología clínica de las enfermedades por micobacterias (tuberculosis, lepra y micobacteriosis)*. Córdoba 1.990: 19-82.
40. Casal M, Clemente JM. Interés clínico del estudio comparativo de la sensibilidad de la técnica de Ziehl-Neelsen con una nueva técnica en tuberculosis. *Arch Bronconeumol* 1.990; 26: 192-4.
41. Kim TC, Blackman RS, Heatwole KM, Dim T, Rochester DF. Acid-fast bacilli in sputum smears of patients with pulmonary tuberculosis. Prevalence and significance of negative smears pretreatment and positive smears post-treatment. *Am Rev Respir Dis* 1.984; 129: 264-8.

BIBLIOGRAFIA

42. **Narain R, Subba Rao MS, Chandrasekhar P, Pyarelal J.** Microscopy positive and microscopy negative cases of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1.971; 103: 761-3.
43. **Strumpf IJ, Tsang AY, Sagre JW.** Reevaluation of sputum staining for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1.979; 119: 599-602.
44. **Zeiss CR, Kalish SB, Erlich et al.** IgG antibody to purified protein-derivative by enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1.984; 130: 845-8.
45. **Daniel TM, de Murillo GL, Sawyer JA et al.** Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1.986; 134: 662-5.
46. **Elmaz R, González T, Martin N, Arcalis L, Xercavins M.** Rendimiento de la baciloscopia: Resultados de 14 años. II Reunión Nacional del Grupo Español de Micobacteriología. Barcelona 1.989.
47. **Bailey GVJ, Savic D, Gothi GD, Naidu BV, Nair SS.** Potential yield of pulmonary tuberculosis cases by direct microscopy of sputum in a district of South India. *Bull Wld Hlth Org* 1.967; 37: 875-92.
48. **Dutt AK, Stead WW.** Short-course chemotherapy. The Arkansas

BIBLIOGRAFIA

- experience. *Chest* 1.981; 80: 724-7.
49. **Sahn SA.** The pleura. *Am Rev Respir Dis* 1.988; 138: 184-234.
50. **Light RW.** Tuberculous pleural effusions. En: Light RW, (ed). 2º Ed *Pleural diseases*, Philadelphia: Lea and Febiger, 1.990: 151-61.
51. **Casal M, Clemente MJ.** Interés en Microbiología clínica de una nueva técnica de microscopía para el diagnóstico de la tuberculosis. *Rev Esp Microbiol Clin* 1.989; 4: 183-5.
52. **Friedman LN, Filderman AE, D'Aquila TG, Reynolds HY.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of antigen in *Mycobacterium tuberculosis*. *Am Rev Respir Dis* 1.988; 137 (Supl); 23.
53. **Roberts GD, Goodman NL, Heifits L et al.** Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens. *J Clin Microbiol* 1.983; 18: 689-96.
54. **Damato JJ, Collins MT, Rothlauf MV, Mc Clatchy JK.** Detection of mycobacteria by radiometric and standard plate procedures. *J Clin Microbiol* 1.983; 17: 1.066-73.
55. **Casal Román M.** Tipificación de las micobacterias. En: Bio-Sell SA, ed.

BIBLIOGRAFIA

- Microbiología clínica de enfermedades por micobacterias (tuberculosis, lepra y micobacteriosis). Córdoba 1.990: 83-130.
56. **Arloing S.** Agglutination de bacille de la tuberculose vraie. Comptes Rendues de l'Academie de Sciences 1.898; 126: 1.398-14.00.
57. **Arloing S, Courment P.** Serum diagnosis of tuberculosis. Boston Med Surg J 1.904; 151: 617-23.
58. **Brown S, Petrof SA.** The Clinical value of complement fixation in pulmonary tuberculosis based on a study of 540 cases. Am Rev Tuberc 1.918; 2: 525-40.
59. **Engvall E, Perlmann P.** Enzyme-linked immunsorbent assay. ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-linked immunoglobulin in antigen-coated tubes. J Immunol 1.972; 109: 129-35.
60. **Nassau E, Parsons ER, Johnson GD.** The detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Tubercle 1.976; 57: 67-70.
61. **Terptra WJ.** Métodos basados en los ácidos nucleícos para la detección de micobacterias. Bull Int Union Tuberc 1.990; 65: 70-3.
62. **Good RC.** Serologic methods for diagnosing tuberculosis. Ann Intern

BIBLIOGRAFIA

Med 1.989; 110: 97-8.

63. **Stead WW, Bates J.** Tuberculosis. En: Harrison, ed. Medicina Interna. 5ª ed. México: McGraw-Hill. Ediciones la Prensa Médica Mexicana SA, 1.984: 1.056-71.
64. **Pittsfield Anti-Tuberculosis Association.** Prospects and priorities for elimination Supplement of future research in tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1.986; 134: 401-23.
65. **Edwards D and Kirkpatrick H.** The immunology of mycobacterial diseases. Am Rev Respir Dis 1.986; 134: 1.062-71.
66. **Grange JM.** The humoral immune response in tuberculosis: its nature, biological rate and diagnostic usefulness. Adv Tuberc Res 1.984; 21: 1-78.
67. **Turneer M, Van Vooren JP, Nyabenda J et al.** The humoral immune response after BCG vaccination in humann: Consequences for the serodiagnosis of tuberculosis. Eur Respir J 1.988; 1: 589-93.
68. **Skvor J, Tunka L, Kugukovova E.** Immunoprofile studies in patients with pulmonary tuberculosis. II. Correlations of levels of different classes of immunoglobulin and specific antibodies with the extent of tuberculosis. Scand J Respir Dis 1.979; 60: 168-71.

BIBLIOGRAFIA

69. **Lenzini L, Rottoli P, Rottoli L.** The spectrum of human tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 1.977; 27: 230-7.
70. **Sasano KT.** Further studies as the complement fixation test in tuberculosis. *Am Rev Tuberc* 1.924; 9: 136-43.
71. **Rodríguez JL.** Avances en inmunología de la lepra. II Reunión del Grupo Español de Micobacteriología. Barcelona 1.989.
72. **Sada E, Ruiz-Palacios GM, López-Vidal Y, Ponce de León S.** Detection of mycobacterial antigens in cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Lancet* 1.983, 2: 651-2.
73. **Bal V, Kamat RS, Kamat J, Kandoth P.** Enzyme-linked immunosorbent assay for mycobacterial antigens. *Indian J Med Res* 1.983; 78: 477-83.
74. **Kadival GV, Mazarelo TBMS, Chapasas SD.** Sensitivity and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay in the detection of antigen in tuberculous meningitis cerebrospinal fluids. *J Clin Microbiol* 1.986; 23: 901-4.
75. **Ramkisson A, Coovadia YM, Coovadia HM.** A competition ELISA for the detection of mycobacterial antigen in tuberculosis exudates. *Tubercle* 1.988; 69: 209-12.

BIBLIOGRAFIA

76. **Wu CH, Fassn MC, Lau YJ.** Detection of mycobacterial antigens in cerebrospinal fluid by enzyme-linked immunosorbent assay. *Tubercle* 1.989; 70: 37-43.
77. **Watt G, Zaraspe G, Bautista S, Laughlin LW.** Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by using an enzyme-linked immunosorbent assay to detect mycobacterial antigen and antibody in cerebrospinal fluid. *J Infect Dis* 1.988; 158: 681-6.
78. **Baig MME, Pettengell KE, Simjee AE, Sathar MA, Volter BJ.** Diagnosis of tuberculosis by detection of mycobacterial antigens in pleural effusion and ascites. *S Afr Med J* 1.986; 69: 101-3.
79. **Yanez MA, Coppola MP, Russo DA, Delaha E, Chaparas SD, Yeager H Jr.** Determination of mycobacterial antigens in sputum by enzyme immunassay. *J Clin Microbiol* 1.986; 23: 822-5.
80. **Daniel TM, Janicki BW.** Mycobacterial antigens: a review of their isolation, chemistry and immunological properties. *Microbiol Rev* 1.978; 42: 84-113.
81. **Grange JM, Gibson J, Nassau E, Kardjito T.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a study of antibodies Fc *Mycobacterium tuberculosis* in the IgG, IgA and IgM classes in tuberculosis, sarcoidosis and Crohn's disease. *Tubercle* 1.980; 61: 145-52.

BIBLIOGRAFIA

82. Kardjito T, Handoyo J, Grange JM. Diagnosis of active tuberculosis by immunological methods. 1. The effect of tuberculin reactivity and previous BCG vaccination on the antibody levels determined by ELISA. *Tubercle* 1.982; 63: 269-74.
83. Balestrino EA, Daniel TM, de Latini MDS, Latini OA, Ma Y, Scocozza JB. Serodiagnosis of pulmonary tuberculosis in Argentina by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of IgG antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 and tuberculin purified protein derivative. *Bull World Health Org* 1.984; 62: 755-61.
84. Benjamín RG, Daniel TM. Serodiagnosis of tuberculosis using the enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) of antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5. *Am Rev Respir Dis* 1.982; 126: 1.013-6.
85. Daza RM, Portero MF, Dámaso D, Mendoza MP. Determinación, en nuestro medio, del valor umbral de anticuerpos frente al antígeno 60 de micobacterias por un método ELISA. *Rev Esp Microbiol Clin* 1.988; 3: 651-4.
86. Daniel TM, Debanne SM, Vander Kuyp E. Enzyme-linked immunosorbent assay using *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 and PPD for the serodiagnosis of tuberculosis. *Chest* 1.985; 88: 388-92.

BIBLIOGRAFIA

87. **Kramvovitis E.** Detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane antigen by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Med Microbiol* 1.986; 21: 257-64.
88. **Ma Y, Wang YM, Daniel TM.** Enzyme-linked immunosorbent assay using *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 for the diagnosis fo pulmonary tuberculosis in China. *Am Rev Respir Dis* 1.986; 134: 1.237-75.
89. **Manrique A, Gómez-Garcés JL, Espinosa P, Jiménez MS.** Nivel de anticuerpos frente a Antígeno 60 en dos grupos de población sana. II Reunión Nacional del Grupo Español de Micobacteriología. PDR08. Barcelona 1.989.
90. **Jagannath C, Sengupta DN, Bahadur P.** Serology of tuberculosis. II. Measurement of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by a passive haemagglutination test in human tuberculosis. *Tubercle* 1.983; 64: 201-10.
91. **Reggiardo Z, Vázquez E.** Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and haemagglutination test using mycobacterial glycolipids. *J Clin Microbiol* 1.981; 13: 1.007-9.
92. **Hall WH, Manion RE.** Haemagglutinins and haemolysins for erythrocytes sensitized with tuberculin in pulmonary tuberculosis. *J Clin Invest* 1.951; 30: 1.542.

BIBLIOGRAFIA

93. **Favez G, Jequier S, Vulliomez P.** Demonstration and discrimination of distinct circulating antibodies during active tuberculosis in man. *Am Rev Respir Dis* 1.966; 94: 905.
94. **Middlebrook G, Dubos TJ.** Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli. *J Exp Med* 1.948; 88: 521.
95. **Reggiardo Z, Aber VR, Mitchison DA, Devi S.** Haemagglutination tests for tuberculosis with mycobacterial glycolipid antigens. *Am Rev Respir Dis* 1.981; 124: 21.
96. **Mitchison DA, Aber VR, Ahmad FJ, Allen BW, Devi S.** Evaluation of a serological test for tuberculosis. *Br Med J* 1.977; 1: 1.383-7.
97. **Nicholls AC.** A serodiagnostic test for tuberculosis. *J Clin Pathol* 1.975; 28: 850-3.
98. **Duboczy BO, White FC.** Further studies with the direct latex agglutination test in tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1.969; 100: 364.
99. **Cole RV, Lazarus AW, Hedrick HG.** Development and evaluation of a simple latex agglutination test for diagnosis of tuberculosis. *Appl Microbiol* 1.972; 24: 525-34.
100. **Sasaki A, Takahashi Y.** Activité serologique des phospholipides purifiés

BIBLIOGRAFIA

- de *Mycobacterium tuberculosis*. C R Soc Biol (Paris) 1.974; 168: 626-9.
101. Wallace R, Diana BB, Jessamine AG, Greenberg L. Circulating antibody response in BCG vaccination, tuberculous infection and sarcoidosis. Can Med Assoc J 1.967; 96: 585.
102. Fusillo MH, Weiss DL. Lack of circulating antibodies after BCG immunization as assayed by the globulin titration technique. Am Rev Tuberc 1.958; 78: 793.
103. Chapman JS. Mycobacterial and mycotic antibodies in sera of patients with sarcoidosis. Ann Intern Med 1.961; 55: 918.
104. Chapman JS, Baum J, Clark J, Speight M. Mycobacterial antibodies in immunoglobulins. IgA and IgM of patients with sarcoidosis. Am Rev Respir Dis 1.967; 95: 612.
105. Kaplan MH, Chase MW. Antibodies to mycobacteria in human tuberculosis. I. Development of antibodies before and after antimicrobial therapy. J Infect Dis 1.980, 142: 825-34.
106. Kaplan MH, Chase MW. Antibodies to mycobacteria in human tuberculosis. II. Response to nine defined mycobacterial antigens with evidence for an antibody common to tuberculosis and Lepromatous

BIBLIOGRAFIA

- Leprosy. *J Infect Dis* 1.980; 142: 835-42.
107. Parlett RC, Youmans GP. An evaluation of the specificity and sensitivity of a gel-double-diffusion test for tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1.959; 80: 153.
108. Zeiss CR. Serologic diagnosis of tuberculosis. *Clin Microbiol Newsletter* 1.986; 8: 112-3.
109. Froman S, Burge R, Gedebo M, Pickett JM. Serologic testing for tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1.968; 97: 201-5.
110. Bordet J, Gengou O. Les sensibilisatrices du bacille tuberculeux. *Acad Sci Paris* 1.903; 137: 351.
111. Pangborn HC, Mc Kinney JA. Purification of serologically active phosphoinositides of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Lipid Res* 1.966; 7: 627-38.
112. Kiran V, Shriniwas, Kumar R, Sharma A. Efficacy of three mycobacterial antigens in the serodiagnosis of tuberculosis. *Eur J Respir Dis* 1.985; 66: 187-95.
113. Chawla TC, Sharma A, Kiran V, Bhargava Shriniwas DK, Tandon BN. Serodiagnosis of intestinal tuberculosis by enzyme immunoassay and

BIBLIOGRAFIA

- soluble antigen fluorescent antibody test using a saline extracted antigen. *Tubercle* 1.986; 67: 55-60.
114. **Bardassa EJ Jr, McClatchy JK, Farr RS, Minden P.** Universal occurrence of antibodies to tubercle bacilli in sera from nontuberculous and tuberculous individuals. *Clin Exp Immunol* 1.973; 13: 65-77.
115. **Janicki BW, Goldstein RA, Aron SA.** Immuno-electrophoretic studies of the precipitating antibody response in tuberculosis (letter). *Am Rev Respir Dis* 1.971; 103: 894.
116. **Zeiss CR, Radin RC, Williams JE, Levitz D, Phair JP.** Detection of immunoglobulin G antibody to purified protein derivative in patients with tuberculosis by radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1.982; 15: 93-6.
117. **Cocito T, Vanlinden F.** Preparation and properties of antigen 60 from *Mycobacterium bovis BCG*. *Clin Exp Immunol* 1.986; 66: 262-72.
118. **Winters WD, Cox RA.** Serodiagnosis of tuberculosis by radioimmunoassay. *Am Rev Respir Dis* 1.981; 124: 582.
119. **Carr RI, Chakraborty AK, Brunda MJ et al.** Immune complexes and antibodies to BCG in sera from patients with Mycobacterial infections. *Clin Exp Immunol* 1.980; 39: 562-9.

BIBLIOGRAFIA

120. Chakinis C, Scollard D, Nelson K et al. Antibodies to *Mycobacterium leprae* detected by enzyme-linked (ELISA) and radio (RIA) immunoassay: comparison among families with leprosy patients. Acta Leprol (Geneve) 1.984; 2: 387-94.
121. Savigny D, Voller A. The comunication of ELISA data from laboratory to cliniciam. J Immunoassay 1.980; 1: 105-28.
122. Krambovitis E, Harris M, Hughes DTD. Improved serodiagnosis of tuberculosis using two assay test. J Clin Pathol 1.986; 39: 779-85.
123. Morris JA, Stevens AE, Stuart P, Little TWA. A pilot study to assess the usefulness of ELISA in detecting tuberculosis in badgers. Vet Rec 1.979; 104: 14.
124. Radin RC, Zeiss CR, Phair JP. Antibodies to purified protein derivate in different immunoglobulin classes in the diagnosis of tuberculosis in man. Int Arch Allergy Appl Immunol 1.983; 70: 25-9.
125. Bauhman RP, Raja A, Daniel TM. The detection of antigen and antibody to *Mycobacterium tuberculosis* in patients with active tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1.987; 135 (Supl): A132.
126. Raja A, Baughman RP, Daniel TM. The detection by immunoassay of antibody to mycobacterial antigens and mycobacterial antigens in

BIBLIOGRAFIA

- bronchoalveolar lavage fluid from patients with tuberculosis and control subjects. *Chest* 1.988; 94: 133-7.
127. Hunter SW, Fujiwara T, Brennan PJ. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *J Biol Chem* 1.982; 257: 1.572-8.
128. Cho SN, Yanagihara DL, Hunter SW, Gelber RH, Brennan PJ. Serological specificity of phenolic glycolipid J from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infect Immun* 1.983; 41: 1.077-83.
129. Cho SN, Fujiwara T, Hunter SW, Rea TH, Gelber RM, Brennan PJ. Use of an artificial antigen containing the 3,6-di-o-methyl-B-D-glucopyranosyl epitope for the serodiagnosis of leprosy. *J Infect Dis* 1.984; 150: 311-22.
130. Bach MA, Wallach D, Flageul B, Hoffenbach A, Cottenat F. Antibodies to Phenolic Glycolipid-1 and to whole *Mycobacterium leprae* in leprosy patients: Evolution during therapy. *Int J Lepr* 1.986; 54: 256-67.
131. Young DB, Buchanan TM. A serological test for leprosy with a glycolipid specific for *Mycobacterium leprae*. *Science* 1.983; 221: 1.057-9.

BIBLIOGRAFIA

132. Young DB, Dissanayake S, Miller RA, Khanolkar SR, Buchanan TM. Humans respond predominantly with IgM immunoglobulin to the species-specific glycolipid of *Mycobacterium leprae*. J Infect Dis 1.984; 149: 870-3.
133. Brett SJ, Draper P, Payne SN, Rees RJW. Serological activity of a characteristic phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* in sera from patients with leprosy and tuberculosis. Clin Exp Immunol 1.983; 52: 271-9.
134. Samuel NM, Adiga RB. Detection of antibodies in sera of leprosy patients and contacts by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Jpn J Leprosy 1.984; 53: 32-7.
135. Miller RA, Dissanayake S, Buchanan TM. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay using arabinomannan from *Mycobacterium smegmatis*: a potentially useful screening test for the diagnosis of incubating leprosy. Am J Trop Med Hyg 1.983; 32: 555-64.
136. Ridell M. Cross-reactivity between *Mycobacterium tuberculosis H38RV* and various Actinomycetes and related organisms. Tubercle 1.983; 64: 211-6.
137. Abou-Zeid C, Hasboe M, Sundsten B, Cocito C. Cross-reactivity of

BIBLIOGRAFIA

- antigens from the cytoplasm and cell walls of some corynebacteria and mycobacteria. *J Infect Dis* 1.985; 151: 170.
138. Gueur MC, Harboe M, Fontaine F, Delville J, Cocito C. Immunochemical properties of leprosy derived corynebacteria and comparison with reference mycobacteria. *Scand J Immunol* 1.983; 17: 497.
139. Roberts DB, Wright GL Jr, Affronti LF, Reich M. Characterization and comparison of mycobacterial antigens by two-dimensional immunoelectrophoresis. *Infect Immun* 1.972; 6: 564-73.
140. Wright GL Jr, Roberts DB. Two-dimensional immunoelectrophoresis of mycobacterial antigens comparison with a reference system. *Am Rev Respir Dis* 1.974; 109: 306-10.
141. Harboe M, Closs O, Deverill J. Production of monospecific ansera against antigenic components of *Mycobacterium bovis* BCG. *Scand J Immunol* 1.976; 5: 861-6.
142. Harboe M, Closs O, Svindahl K, Deverill J. Production and assay of antibodies against me antigenic component of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 1.977; 16: 662-72.
143. Closs O, Harboe M, Axelsen NH, Bunch-Christensen K, Mognuson M. The antigens of *Mycobacterium bovis* strain BCG, studied by crossed

BIBLIOGRAFIA

- immuno-electrophoresis: a reference system. *Scand J Immunol* 1.980; 12: 249-63.
144. Kronvall G, Bjune G, Stanford J, Menzel S, Samuel D. Mycobacterial antigens in antibody responses of leprosy patients. *Int J Lepr* 1.975; 43: 299-306.
145. Closs O, Harboe M, Vassum AM. Cross-reactions between mycobacteria. I. Crossed immuno-electrophoresis of soluble antigens of *Mycobacterium lepraemurium* and comparison with BCG. *Scand J Immunol* 1.975; 4 (Supl 2): 173-85.
146. Thorel MF. Utilization d'une méthode d'immunoélectrophorèse bidimensionnelle dans l'étude des antigènes de *Mycobacterium simiae* et *Mycobacterium habana*. *Ann Microbiol (Paris)* 1.976; 127 B: 41-5.
147. Harboe M, Closs O, Bjorvatn B, Kronvall G, Axelsen NH. Antibody response in rabbits to immunization with *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun* 1.977; 18: 792-805.
148. Closs O, Mshana RN, Harboe M. Antigenic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Scand J Immunol* 1.979; 9: 297-302.
149. Koshino T, Nishioka S, Fujimara M et al. ELISA for IgG antibody to purified protein derivative (PPD) of patients with pulmonary

BIBLIOGRAFIA

- tuberculosis. *Kekkaku* 1.984; 59: 621-4.
150. Grange JM, Gibson J, Balty A, Kardjito T. The specificity of the humoral immune response to soluble mycobacterial antigens in tuberculosis. *Tubercle* 1.980; 61: 153-7.
151. Granje JM, Kardjito T. Serological tests for tuberculosis: Can the problem of low specificity be overcome?. *Indian J Chest Dis* 1.982; 24: 108-17.
152. Harboe M. Antigen of PPD, old Tuberculin, and autoclaved *Mycobacterium bovis BCG* studied by crossed immunoelectrophoresis. *Am Rev Respir Dis* 1.981; 124: 80-7.
153. Kalish SB, Radin RC, Phair JP, Levitz D, Zeiss CR, Metzger E. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay technique in the differential diagnosis of active pulmonary tuberculosis in humans. *J Infect Dis* 1.983; 147: 523-30.
154. Kalish SB, Radin RC, Levitz D, Zeiss CR, Phair JP. The enzyme-linked immunosorbent assay method for IgG antibody to purified protein derivative in cerebrospinal of patients with tuberculous meningitis. *Ann Intern Med* 1.983; 99: 630-3.
155. Daniel TM, Anderson PA. The isolation by immunoabsorbent affinity

BIBLIOGRAFIA

- chromatography and physicochemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5. Am Rev Respir Dis 1.978; 117: 533-39.
156. Daniel TM, Anderson PA. The use of immunoabsorbents for the purification of mycobacterial antigens. J Lab Clin Med 1.977; 90: 354-60.
157. Reggiardo Z, Middlebrook G. Serologically active glycolipid families from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Extraction, purification and immunologic studies. Am J Epidemiol 1.975; 100: 469-76.
158. Homasson JP, Normand M, Burnat C, Garcin J, Maes R. Diagnostic serologique de la tuberculose. Technique ELISA et antigene 60. Communication á la Société de Pneumologie de Langue Francaise, Paris 1.987.
159. Cocito C, Benoit C, Baelden MC, Vanlinden F. Properties of antigen 60 of BCG: Use in diagnosis and prognosis of tuberculosis. IX Annual Meeting of European Society of Mycobacteriologists. Lisboa 1.988 (Resumen): 51.
160. Fabre I, L'Homme O, Bruneteau M, Michel G, Cocito. Chemical composition of antigen 60 from *Mycobacterium bovis* BCG. Scand J Immunol 1.986; 24: 591.

BIBLIOGRAFIA

161. **Cocito C, Baelden MC, Benoit Ch.** Immunological properties of antigen 60 of BCG. Induction of humoral and cellular immune reaction. *Scand J Immunol* 1.987; 25: 579-85.
162. **Schwerer B, Meeker HC, Sersen G, Levis WR.** IgM antibodies against phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* in leprosy sera: relationship to bacterial index and erythema nodosum leprosum. *Acta Leprol (Geneve)* 1.984; 95: 394-402.
163. **Brett SJ, Payne SN, Gigg J, Burgess P, Gigg R.** Use of synthetic glycoconjugates containing the *Mycobacterium leprae* specific and immunodominant epitope of phenolic glycolipid I in the serology of leprosy. *Clin Exp Immunol* 1.986; 64: 476-83.
164. **Douglas JT, Naka SO, Lee JW.** Development of an ELISA for detection of antibody in leprosy. *Int J Lepr* 1.984; 52: 19-25.
165. **Benjamin RG, Debanne SM, Ma Y, Daniel TM.** Evaluation of mycobacterial antigens in an enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of tuberculosis. *J Med Microbiol* 1.984; 18: 309-18.
166. **Winter SM, Bernard EM, Gold JWM, Armstrong D.** Humoral response to disseminated infection by *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* in acquired immunodeficiency syndrome and hairy all

BIBLIOGRAFIA

- leukemia. J Infect Dis 1.985; 151: 523-7.
167. **Abbas B, Riemann HP, Lonnerdal B.** Isolation of specific peptides from *Mycobacterium paratuberculosis* protoplasm and their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle. Am J Vet Res 1.983; 44: 2.229-36.
168. **Jorgensen JB, Jensen PT.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle. Acta Vet Scand 1.978; 19: 310-2.
169. **Yokomizo Y, Merkal RS, Lyle PAS.** Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G 1 antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. Am J Vet Res 1.983; 44: 2.205-7.
170. **Thoen CD, Malstrom C, Himes EM, Mills K.** Use of enzyme-linked immunosorbent assay for detecting mycobacterial antigens in tissues of *Mycobacterium bovis* infected cattle. Am J Vet Res 1.981; 42: 1.814-5.
171. **Armbrust AL, Thoen CD, Bruner JA, Renquist DM, Brown GM.** Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in monkeys infected with *Mycobacterium bovis*. Proc Annu

BIBLIOGRAFIA

- Meet US Anim Health Assoc 1.980; 84: 522-7.
172. Mann PC, Bush M, Jaussen DL, Frank ES, Montali RJ. Clinicopathological correlations of tuberculosis in large zoo mammals. J Am Vet Med Assoc 1.981; 179: 1.123-9.
173. Thoen CD, Mills K, Hopkins MP. Enzyme-linked protein A: an enzyme-linked immunosorbent assay reagent for detecting antibodies in tuberculosis exotic animals. Am J Vet Res 1.980; 41: 833-5.
174. Thoen CD, Armbrust AL, Hopkins MP. Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in swine infected with *Mycobacterium bovis*. Am J Vet Res 1.978; 40: 1.096-9.
175. Thoen CD, Eacret WG, Himes EM. An enzyme-linked antibody test for detecting antibodies in chickens infected with *Mycobacterium avium* serotype 2. Avian Dis 1.978; 22: 162-6.
176. Ridell M. Serodiagnosis of tuberculosis. Eur Respir J 1.988; 1: 587-8.
177. Brostoff J, Lenzini L, Rottoli P, Rottoli L. Immune complexes in the spectrum of tuberculosis. Tubercle 1.981; 62: 169-73.
178. Johnson N Mc I, McNichol MW, Burton-kei EJ, Mowbray JF. Circulating immune complexes in tuberculosis Thorax 1.981; 36: 610-7.

BIBLIOGRAFIA

179. **May JJ, Katilus J, Henson PM, Dreisin RB.** The purification and identification of circulating immune complexes in tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1.983; 128: 920-5.
180. **Burrell R, Cate CC.** The effect of lung reactive antibodies on the pathogenesis of tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 1.971; 9: 809-19.
181. **Burrell R, Lewis DM.** Further studies on the effect of lung antibodies on the pathogenesis of tuberculosis. *J Lab Clin Med* 1.975; 86: 741-5.
182. **Samuel AM, Ashtekar MD, Ganatra RD.** Significance of circulating immune complexes in pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 1.984; 58: 317-24.
183. **Toussaint AJ, Fife EH, Parlett RC et al.** A soluble antigen fluorescent antibody test for the serodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Am J Clin Pathol* 1.969; 52: 708-13.
184. **Lau JHK, Leong JCY, Stroebel AB.** A longitudinal study of antibody titres to antigen 6 in patients with bone and joint tuberculosis. *Int Orthop* 1.983; 7: 205-8.
185. **Stavri D, Niculescu D, Fuiorea I, Stavri H, Basacopol A.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with staphylococcal protein A-horseradish peroxidase conjugate and exocellular native proteic

BIBLIOGRAFIA

antigens in an attempt to be used as a diagnostic tool in pulmonary tuberculosis. *Arch Roum Pathol Exp Microbiol* 1.985; 44: 229-37.

186. **Gupta AK, Jamil Z, Srivastava VK, Tandon A, Saxena KC.** Antibodies to purified tuberculin (PPD) in pulmonary tuberculosis and their correlation with PPD skin sensitivity. *Indian J Med Res* 1.983; 78: 484-8.
187. **Viljanen MK, Eskola J, Tala E.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to purified protein derivative of tuberculin (PPD). *Eur J Respir Dis* 1.982; 63: 257-62.
188. **Palenque E, Pérez A.** Respuesta serológica al antígeno 60 en enfermos con tuberculosis de un hospital general. II Reunión Nacional del Grupo Español de Micobacteriología. Barcelona 1.989.
189. **Caminero JA, Rodríguez de Castro F, González A et al.** Diagnóstico serológico de la tuberculosis. *Arch Bronconeumol* 1.989; 25 (supl): 35-6.
190. **Mattar S, Broquetas J, Carceller A et al.** Valor del antígeno 60 en el diagnóstico serológico de la tuberculosis pulmonar por el método ELISA. *Arch Bronconeumol* 1.989; 25 (supl): 27.
191. **Thayer WR, Coutu JA, Chiodini RJ, Van Kruiningen HI, Merkal RS.**

BIBLIOGRAFIA

- Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. II
Mycobacterial antibodies in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1.984; 29:
1.080-5.
192. Daniel TM, Oxfoby MJ, Pinto E, Moreno E. The immune spectrum in
patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1.981; 123:
556-9.
193. Caplin M, Grange JM, Morley S et al. Relationship between radiological
classification and the serological and haematological features of
untreated pulmonary tuberculosis in Indonesia. *Tubercle* 1.989; 70:
103-13.
194. Rook GAW, Carswell JW, Stanford J. Preliminary evidence for the
trapping of antigen-specific lymphocytes in the lymphoid tissue of
"anergic" tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 1.976; 26: 129-32.
195. Rossi GA, Balhi B, Mauca F. Tuberculous pleural effusions. Evidence for
selective presence of PPD-specific T lymphocytes at site of inflammation
in the early phase of infection. *Am Rev Respir Dis* 1.987; 136: 575-9.
196. Ellner JJ. Suppressor adherent cells in humans tuberculosis. *J Immunol*
1.978; 121: 2.573-9.
197. Kleinhenz ME, Ellner FF, Spagnolo PJ, Daniel TM. Suppression of

BIBLIOGRAFIA

- lymphocyte responses tuberculosis plasma and mycobacterial arabinogalactam. *J Clin Invest* 1.981; 68: 153-62.
198. Levy H, Wade AA, Feldman C, Rabson AR. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* in bronchial washings and serum. *Chest* 1.988; 93: 762-6.
199. Rodríguez MA, Mira J, García C, Mosquera S. Evaluación de una prueba ELISA para el diagnóstico de la tuberculosis. II Reunión Nacional del Grupo Español de Micobacteriología. Barcelona 1.989.
200. McFadden JJ, Hondayer C. No evidence for antibodies to mycobacterial A 60 antigens in Crohn's disease sera by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Med Microbiol* 1.988; 25: 295-8.
201. Alde SLM, Piñasco H, Pelosi F, Budassi H, Palma Beltrán O, Gonzalez Montaner LJ. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an IgG antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 in the diagnosis of active tuberculosis in children. *Am Rev Respir Dis* 1.987; 135 (Supl): A 32.
202. García F, Blanco J, Domínguez ME, Jiménez-Mesa F, Gómez AC. Diagnóstico serológico de la tuberculosis determinando anticuerpos IgG frente al antígeno 60 por un método ELISA. II Reunión Nacional del

BIBLIOGRAFIA

Grupo Español de Micobacteriología. Barcelona 1.989.

203. Alde SLM, Piñasco HM, Pelosi FR, Budani HF, Palma-Beltrán OH, González-Montaner LJ. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an IgG antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 in the diagnosis of active tuberculosis in children. Am Rev Respir Dis 1.989; 139: 748-51.
204. Levy H, Feldman Ch, Wade AA, Rabson AR. Differentiation of sarcoidosis from tuberculosis using an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against *Mycobacterium tuberculosis*. Chest 1.988; 94: 1.254-5.
205. García Ortigoza E, Gutiérrez Velázquez A. Diagnóstico de la Tuberculosis pulmonar crónica por el método de inmunoensayo enzimático (ELISA). Rev Latinoam Microbiol 1.982; 24: 193-204.
206. García Carreño FL, Carvajal RE, Hernández R. Enzyme immunoassay using BCG in serodiagnosis of pulmonary tuberculosis. J Hyg Camb 1.986; 97: 483-7.
207. Sánchez T, Martín F, Hernández J, Sánchez F. Estudio de los niveles de anticuerpos de 100 pacientes tuberculosos empleando la técnica ELISA. Correlación clínico-inmunológico. Congreso Nacional de Microbiología Clínica. Libro de Resúmenes 1.988; 01-17: pág 115.

BIBLIOGRAFIA

208. **Sánchez T, Martín Luengo F, Martín E, Olivas M.** Estudio comparativo en pacientes tuberculosos y leprosos de los niveles de IgG e IgM obtenidos mediante un enzimoimmunoensayo con dos antígenos distintos: a) PPD y b) (3-6 Me Glc-Rha-Octyl)-BSA. II Reunión del Grupo Español de Micobacterología. Barcelona. 1.989
209. **Mattar S, Carceller A, Broquetas J et al.** Detección y comparación de anticuerpos anti-IgG en sujetos tuberculosos con el método ELISA usando los antígenos PPD y A 60. II Reunión Nacional del Grupo Español de Micobacterología. Barcelona. 1.989.
210. **Daniel TM, Ellner JJ, Todd LS et al.** Immunobiology and species distribution of *Mycobacterium tuberculosis* Antigen 5. Infect Immun 1.979; 24: 77-82.
211. **Daniel TM, Ferguson LE, Sanson AJ.** Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 6 for use in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1.989; 139 (supl): A394.
212. **Daniel TM, Sanson AJ.** Partial purification and characterization of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 6. Am Rev Respir Dis 1.988; 137 (supl): 23.
213. **Stroebe AB, Daniel TM, Lau JHK, Leong JCY, Richardson H.** Serologic

BIBLIOGRAFIA

- diagnosis of bone and joint tuberculosis by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Infect Dis* 1.982; 146: 280-3.
214. Reggiardo Z, Vázquez E, Schnaper L. ELISA test for antibodies against mycobacterial glycolipids. *J Immunol Methods* 1.980; 34: 55-60.
215. Verbon A, Kuyper S, Jansen HM, Kolk AHJ. Use of purified mycobacterial antigens for serodiagnosis of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1.989; 139 (Supl): A239.
216. Martín N, González T, Roselló J, Vidal R, Goira A, de Gracia J. Determinación por técnica ELISA de anticuerpos específicos frente a dos antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*: PPD y el fenoglicolípido PGL-TB1. I Jornada sobre Tuberculosis e Infecciones Respiratorias 1.989; (Resumen): 16.
217. Casal M, Linares MJ. Diagnóstico serológico de la tuberculosis. Estudio de la primera prueba comercializada existente (Andaelisa-Tuberculosis). *Rev Esp Microbiol Clin* 1.988; 3: 491-2.
218. Caminero J, Rodríguez de Castro F, Carrillo T. Importancia de los grupos etarios control en el diagnóstico serológico de la tuberculosis. *Arch Bronconeumol* 1.991; 27: 47-8.
219. Caminero J, Rodríguez de Castro F, Losada A, González A, Carrillo T,

BIBLIOGRAFIA

- Cabrera P.** Evaluation of antigen 60 for use in ELISA for the serodiagnosis of tuberculosis. 1.990 World Conference on Lung Health. Am Rev Respir Dis 1.990 ; 141 (Supl): A791.
- 220. Plouffe JF, Silva J, Fekely R, Baird I.** Cerebrospinal fluid lymphocyte transformation in meningitis. Arch Intern Med 1.979; 139: 191-4.
- 221. Coovadia YM, Dawood A, Ellis ME, Coovadia HM, Daniel TM.** Evaluation of adenosine deaminase activity and antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 in cerebrospinal fluid and the radioactive bromide partition for the early diagnosis of tuberculosis meningitis. Arch Dis Chil 1.986; 61: 428-35.
- 222. Hernández R, Muñoz D, Guiscafre H.** Sensitive enzyme immunoassay for the early diagnosis of tuberculous meningitis. J Clin Microbiol 1.984; 20: 533-5.
- 223. Petterson T, Klockars M, Hellstroem PE, Riska H, Wangel A.** T and B lymphocytes in pleural effusions. Chest 1.978; 73: 49-51.
- 224. Shikomata K, Kawachi H, Kishimoto H, Maeda F, Ito Y.** Local cellular immunity in tuberculous pleuresy. Am Rev Respir Dis 1.982; 126: 822-4.
- 225. Murate T, Mizoguchi K, Amano H, Shimokata K, Matsuda T.**

BIBLIOGRAFIA

- Antipurified protein derivative antibody in tuberculous pleural effusions. Chest 1.990; 97: 670-3.
226. Levy H, Wayne LG, Anderson BE, Barner PF, Ligth RW. Antimycobacterial antibody levels in pleural fluid as refection of passive diffusion from serum. Chest 1.990; 97: 1.144-7.
227. Van Vooren JP, Farber CM, De Bruyn J, Yernaut JC. Antimycobacterial antibodies in pleural effusions. Chest 1.990; 97; 88-90.
228. Caminero J, Rodríguez de Castro F, Losada A, Carrillo T, Delgado J, Cabrera P. The detection by ELISA of specific IgG to mycobacterial antigen 60 in a tuberculous exudate. Respiration 1.990; 57: 402-3.
229. Daniel TM. Antibody and antigen detection for the immunodiagnosis of tuberculosis: Why not? What more is needed? Where do we stand today?. J Infect Dis 1.988; 158: 678-80.
230. Ballet JJ, Sulcebe G, Courdec LJ et al. Impaired antipneumococcal antibody response in patients with AIDS realted persistent generalized lymphadenopathy. Clin Exper Immunol 1.987; 68: 479-87.
231. Straus E, Wu N, Quraishi MHA, Levine S. Clinical applications of the radioimmunoassay of secretory tuberculoprotein. Proc Natl Sci USA 1.981; 78: 3.214-17.

BIBLIOGRAFIA

232. Straus E, Wu N. Radioimmunoassay of tuberculoprotein derivated from *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Sci USA 1.980; 77: 4.301-4.
233. Raja A, Machico AR, Morrisey AB, Jacobs HR, Daniel TM. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* in radiometric cultures by using an immunoassay antigen 5. J Infect Dis 1.988; 158: 468-70.
234. Estrada García I, Quesada Pascual F, Argumeda LS, Romo LF, Estrada Parra S, Buchanan TM. The early serodiagnosis of leprosy. I. The use of counterimmuno-electrophoresis and enzyme-linked immunosorbent assay. Rev Latinoam Microbiol 1.984; 26: 267-72.
235. Cho SN, Hunter SW, Gelber RH, Ria TH, Brennam PJ. Quantitation of the phenolic glycolipid of *Mycobacterium leprae* and the relevance to glycolipid antigenemia in leprosy. J Infect Dis 1.986; 153: 560-9.
236. Mitchell AN, Rees RJW. Further observations on the nature and physical characteristics of transmissible agents from human sarcoid and Crohn's disease tissue. Proceedings of the 8th International Conference on Sarcoidosis. Cardiff 1.979.
237. Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS, Thayer WR, Coutou JA. Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. J Clin Microbiol 1.984; 20: 966-71.

BIBLIOGRAFIA

238. **McFadden JJ, Butcher PD, Chiodini RJ, Herman-Taylor J.** Use of DNA probes to distinguish between mycobacterial species. Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1.987; 25: 798-801.
239. **Cho SN, Brennam PJ, Yoshimura HH, Korelitiz BJ, Graham BY.** Mycobacterial etiology of Crohn's disease: serologic study using common mycobacterial antigens and a species-specific glycolipid antigen from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Gut* 1.986; 27: 1.353-6.
240. **Stanford JL, Grange JM.** The meaning and structure of species as applied to mycobacteria. *Tubercle* 1.974; 55: 143-52.
241. **Maes R, Homasson JP, Kubin M, Bayer M.** Development of an Enzyme Immuno-assay for the serodiagnosis of tuberculosis and Mycobacteriosis. *Med Microbiol Immunol* 1.989; 178: 323-35.
242. **Carrillo T, Rodríguez de Castro F, Cuevas M, Díaz F, Cabrera P.** Effect of cigarette smoking on the humoral immune response in pigeon fanciers. *Allergy* 1.991; 46: 241-4.
243. **Toman K.** Sensitivity, specificity and predictive value of diagnostic tests. *Bull Int Union Tuberc* 1.981; 18-28.
244. **Daniel TM, Balestrino EA, Balestrino OC, Davidson PT, Debanno SM,**

BIBLIOGRAFIA

- Kataria S, Kabaria YP, Scorozza JB. The tuberculin specificity in humans of M Tuberculosis antigen 5. *Am Rev Respir Dis* 1.982; 126: 600-6.
245. Ivany J, Kambrovitis E, Klein M. Evaluation of monoclonal antibody (TB 72) based serological test of tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 1.983; 54: 337-45.
246. Bothamley G, Udani P, Rudd R, Festenstein F, Ivany J. Humoral response to defined epitopes of tubercle bacilli in adult pulmonary and child tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1.988; 7: 639-45.
247. Chan SL, Reggiardo Z, Daniel TM, Girling DJ, Mitchinson DD. Serodiagnosis of tuberculosis using an ELISA with antigen 5 and a hemagglutination assay with glycolipid antigen. Results in patients with newly diagnosed pulmonary tuberculosis ranging in extent disease from minimal to extensive. *Am Rev Respir Dis* 1.990; 142: 385-9.
248. Charpin D, Herabault H, Gevaudan MJ et al. Value of ELISA using a 60 antigen in the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1.990; 142: 380-4.
249. Berger HW, Mejia E. Tuberculosis pleuresy. *Chest* 1.973; 63: 88-92.
250. Sibley JC. A study of 200 cases of tuberculous pleuresy with effusion.

BIBLIOGRAFIA

Am Rev Tuberc 1.950; 62: 314-22.

251. **Molinos L, Escudero C, Rodríguez S, Martínez J.** Estudio prospectivo de la rentabilidad de la biopsia pleural con aguja de COPE. Arch Bronconeumol 1.979; 15: 67-9.
252. **Scharer L, McClement JH.** Isolation of tubercle bacilli from needle biopsy specimens of parietal pleura. Am Rev Respir Dis 1.968; 97: 466-8.
253. **Scerbo J, Kelty H, Stone AJ.** A prospective study of closed pleural biopsies. JAMA 1.971; 218: 466-8.
254. **Levine H, Metzger W, Lacera D, Kay L.** Diagnosis of tuberculosis pleuresy by culture of biopsy specimen. Arch Inter Med 1.970; 126: 269-71.
255. **Liebowitz S, Kennedy L, Lessof MH.** The tuberculin reaction in the pleural cavity and its suppression by antilymphocyte serum. Br J Exp Pathol 1.973; 54: 152-62.
256. **Samuel AM, Kadival GU, Ashtikar HD, Ganatra RA.** Evaluation of tubercular antigen and antitubercular antibodies in pleural ascitis effusions. Indian J Med Res 1.984; 80: 563-5.

BIBLIOGRAFIA

257. Baldaen MC, Vander Elst B, Dieng M, Prignot J, Cocito C. Serological analysis of human tuberculosis by an ELISA immunoassay with mycobacterial antigen 60. *Scand J Infect Dis* 1.990; 22: 63-73.
258. Mitchinson DA. Basic mechanisms of chemotherapy. *Chest* 1.979; 76 (Supl): 771-82.
259. Fontes A. Bemerkunger uber die tuberkulose infektion und ihr verus. Portuguese-German text. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro* 1.910; 2: 141.
260. Stanford HJ. Munch's granules revisited. *Tubercle* 1.987; 68: 241-2.
261. Rey R. Bases microbiológicas de la terapéutica y aspectos de la situación actual de la tuberculosis. *Drugs of today* 1.990; 26 (Supl 3): 55-7.
262. Khomenko AG. The variability of *Mycobacterium tuberculosis* in patients with cavitary pulmonary tuberculosis in the course of chemotherapy. *Tubercle* 1.987; 68: 243-53.
263. American Thoracic Society. Treatment of tuberculosis and tuberculous infection in adults and children. *Am Rev Respir Dis* 1.986; 134: 355-64.

BIBLIOGRAFIA

264. **Browne GL.** Enfermedades micobacterianas: Lepra. En Fitzpatrick T, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg In, Austin F (Ed). Dermatología en Medicina General. Vol 3. Ed Panamericana. Buenos Aires 1.988: 2.411-30.
265. **Glassroth J, Robins A, Snider A.** Tuberculosis in the 1980s. N Engl J Med 1.980; 302: 1.441-50.
266. **Styblo K.** Overview and epidemiologic assessment of the current global tuberculosis situation with an emphasis on the control in developing countries. Rev Infect Dis 1.989; 11(Supl 2): 339-46.