

00544

5
2 ej^o



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**VALORACION DEL USO DE INMUNOENSA-
YOS PARA EL DIAGNOSTICO RAPIDO DE
TUBERCULOSIS EN POBLACION ABIERTA**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALIZACION EN BIOQUIMICA
CLINICA**

P R E S E N T A :

Q.F.B. MARIA DEL CARMEN SARABIA LEON





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedico este trabajo a aquellos por quienes me fue posible llegar al termino de esta Especialización, sea por su apoyo incondicional, por sus consejos, por su ayuda técnica o por sus llamadas de atención. A quienes han estado conmigo y saben lo importante que son y a mis nuevos amigos que forman parte de las buenas adquisiciones en este negocio.

A mis padres

A mis hermanos

A Sergio

A Angeles, Olga y Angela

A Miguel

A mis amigos del INER y de Nutrición

A Yolanda Lopez-Vidal, Eduardo Rivera y Eduardo Sada

El trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias bajo la dirección del Dr. Eduardo Sada Díaz

RESUMEN

Se valoró la utilización de técnicas inmunológicas como métodos alternativos en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar (TbP), realizando la búsqueda de antígenos de *M. tuberculosis* y anticuerpos dirigidos contra la misma bacteria en suero de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis. El antígeno -lipoarabinomana- (LAM) de *M. tuberculosis* se detectó por coaglutinación e inmunoensayo en papel (DOT) utilizando suero hiperinmune de conejo y un anticuerpo monoclonal. Para la detección de anticuerpos se usaron dos sistemas de ELISA utilizando en ellos como antígenos un extracto soluble de *M. tuberculosis* y lipoarabinomana purificada. Los resultados demostraron que la detección del antígeno en estos sistemas fue poco eficiente, para coaglutinación la sensibilidad fue 32% y la especificidad 81%, mientras que para DOT fueron de 38% y 84% respectivamente. La detección por ELISA de anticuerpos utilizando extracto de *M. tuberculosis* mostró una sensibilidad del 80% con especificidad del 60%. Con LAM la sensibilidad fue 50% con especificidad de 90%.

Los resultados anteriores sugieren que el uso de inmunoensayos utilizando sueros de pacientes para la búsqueda de LAM y para la detección de anticuerpos en contra de estos antígenos no tiene suficiente especificidad y sensibilidad para ser de utilidad en el diagnóstico rutinario de tuberculosis en población abierta. Es necesario desarrollar métodos rápidos para el diagnóstico de TbP, especialmente en países en desarrollo en los que la prevalencia de TbP es mayor.

(PALABRAS CLAVE: Tuberculosis, lipoarabinomana, antigenemia.

ABSTRACT

The usefulness of immunological techniques as alternative methods for the diagnosis of pulmonary tuberculosis was evaluated. Mycobacterial antigens and anti mycobacterial antibodies were determined in sera from patients with clinical signs of tuberculosis. The antigen -lipoarabinomannan- (LAM) was assayed by coagglutination and by DOT immunobinding assay using a hyperimmune rabbit serum and a monoclonal antibody against LAM. For antibody detection two ELISA systems were used, one with soluble *M. tuberculosis* extract as antigen and the other with lipoarabinomannan as antigen. According to the results obtained, the two antigen detection methods tested are of little usefulness. For coagglutination the sensitivity was 32% and specificity was 81%, while for the DOT assay they were 38% and 84% respectively. For the antibody detection method using mycobacterial extract as antigen a sensitivity of 80% and a specificity of 60% were obtained. When using LAM as antigen the sensitivity was 50% and the specificity was 90%. These results suggest that immunoassays using sera either for antigen or antibody detection do not have enough specificity or sensitivity to be used in the routine diagnosis of tuberculosis in an open population with clinical suspicion of this entity. It is necessary to develop fast methods for diagnosis, especially in developing countries where differentiation by immunological techniques is difficult.

KEY WORDS: Tuberculosis, lipoarabinomannan, antigenemia

INTRODUCCION

La tuberculosis es un padecimiento que data de la antigüedad, y a pesar de los adelantos técnicos y científicos de esta era, sigue siendo un problema de salud mundial. En 1990 un número estimado de 8 millones de individuos la desarrollaron, y se calcularon entre 2.6 y 2.9 millones de muertes por tuberculosis.¹ En los países en desarrollo la incidencia es mayor y en nuestro país se informó una mediana de 12,906 casos de tuberculosis pulmonar, y alrededor de 200-300 casos de tuberculosis meningea por año en 1990-1991.²

Las dos razones principales por las que el control mundial de la tuberculosis falla, son la incapacidad de diagnosticar eficientemente fuentes de infección y la incapacidad de curar aquellos que son diagnosticados.³ Para poder solucionar estos problemas se han desarrollado técnicas alternativas de diagnóstico,⁴ y se ha investigado el uso de nuevos fármacos⁵

Tradicionalmente se han utilizado en zonas de alta prevalencia baciloscopias, cultivos, y en sitios de baja prevalencia: la intradermoreacción (prueba de PPD). Los problemas fundamentales que tienen estos métodos de diagnóstico son que la baciloscopia y la intradermoreacción (PPD) tienen una sensibilidad del 75% comparados con el cultivo el cual se considera estandar de oro. Este último, a pesar de ser el más sensible también tiene desventajas como

es la necesidad de concentración y descontaminación de las muestras y principalmente el tiempo de obtención de resultados.⁶ Estas desventajas han impulsado el desarrollo de alternativas en el diagnóstico que incluyen el uso de técnicas cromatográficas, biología molecular⁷, y el inmunodiagnóstico⁸.

En el diagnóstico inmunológico se tienen dos alternativas, una es la determinación de anticuerpos contra antígenos micobacterianos y la otra es la determinación de antígenos de micobacterias presentes en la muestra. La sensibilidad, especificidad y valores predictivos varían con la prevalencia de la enfermedad y la técnica utilizada.^{9,10}

En este estudio se evaluó la utilidad de técnicas diferentes técnicas inmunológicas en comparación con las tradicionales (baciloscopia y cultivo) para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar en una población abierta, determinando cual de ellas presenta las mejores cualidades para su uso en forma rutinaria.

Para ello se emplearon dos sistemas de ELISA para detectar anticuerpos dirigidos contra *M. tuberculosis*, en uno se empleó como antígeno un extracto soluble de *M. tuberculosis*, y en el otro lipoarabinomana purificada de *M. tuberculosis*, que es un antígeno de pared,¹⁰ de 30-40 kilodaltones (kD)¹¹ y que se le considera como un factor que contribuye a que la micobacteria persista en los macrófagos¹².

Recientemente se describió el uso de coagulación para el diagnóstico de tuberculosis a través de la detección de LAM de la micobacteria en suero de pacientes utilizando anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra LAM¹⁸. Esta prueba por ser específica rápida y sencilla de realizar podría ser utilizada como prueba de rutina. Por otro lado, considerando la necesidad de realizar el diagnóstico en un número de muestras grande y en un lugar de facilidades técnicas limitadas se evaluó una prueba de DOT para la detección del mismo antígeno utilizando anticuerpos monoclonales específicos de ratón.

MATERIAL Y METODOS

GRUPOS DE ESTUDIO

Se obtuvieron muestras de suero de pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, que asistieron a consulta externa con sospecha clínica de tuberculosis pulmonar. Las muestras de suero fueron identificadas y almacenadas en alícuotas a -20°C hasta su procesamiento. Para el diagnóstico de tuberculosis a todos los pacientes se les realizó baciloscopia (auramina-rodamina) y cultivo de acuerdo a la metodología convencional.¹⁴

Se consideró como población abierta a los pacientes que llegan por primera vez a consulta con síntomas que pueden ser sugestivos de tuberculosis pulmonar cuyo diagnóstico es desconocido en ese momento y sin seleccionarlos con base a edad, estado socioeconómico, sexo ni zona geográfica de procedencia.

ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS SERICOS EN CONTRA DEL EXTRACTO DE *M. tuberculosis*

El extracto se obtuvo a partir de un cultivo de *M. tuberculosis* (H37Rv) en medio Proskauer-Beeck-Youmans de 6 semanas a 37°C . Para el inmunoensayo se sensibilizaron placas para ELISA (Maxisorb Nunc InterMed) con $100\ \mu\text{L}$ de este extracto proteico ($1\ \mu\text{g}/\text{mL}$) en solución amortiguadora de carbonatos ($0.05\ \text{M}$, pH 9.6) incubando a 4°C 20hr. Se lavaron las placas 4 veces con solución amortiguadora de

fosfatos (PBS) con 0.05 % de Tween 20 y se bloqueo con 200 μ L de PBS-Tween con 1 % de albúmina sérica bovina por 2 hr a 37°C. Se lavaron las placas 4 veces con PBS-Tween. Las muestras de suero se diluyeron 1:200 en PBS-Tween 20, y se adicionaron 100 μ L de la dilución a cada pozo de la placa por duplicado. Se incubó 1 hr a 37°C y posteriormente se lavó 4 veces con PBS-Tween20. Se adicionaron 100 μ L de una dilución 1:1000 en PBS-Tween de IgG anti IgG humana conjugada a biotina (Sigma Chem. Co. St. Louis) y se incubó por 1 hr a 37°C. Despues de lavar 4 veces con PBS-Tween se agregaron 100 μ L de una dilución 1:2000 de estreptoavidin peroxidasa y se incubó por 1 hr a 37°C. Finalmente despues de lavar la placa 4 veces se reveló con 100 μ L de sustrato constituido por 4 mg de o-fenilendiamina (Sigma Chem. Co. St. Louis), 10 mL de solución amortiguadora de citratos (0.1 M, pH 5.0) y 5 μ L de H₂O₂ al 30 %. La reacción se detuvo con 50 μ L de H₂SO₄ (2.5 N) y se leyó la absorbancia a 490nm en un lector de ELISA (Minireader II, Dynatech).

ELISA PARA DETECCION DE ANTICUERPOS anti-LAM

Este ensayo fue realizado de acuerdo a la técnica descrita por Sada y cols.¹⁰ La técnica se estandarizó utilizando el 50% del volumen descrito con la finalidad de ahorrar reactivo.

DETECCION DE LIPOARABINOMANANA
A. CONCENTRACION DE LIPOARABINOMANANA Y REDUCCION DE REACCIONES INESPECIFICAS

fosfatos (PBS) con 0.05 % de Tween 20 y se bloqueo con 200 μ L de PBS-Tween con 1 % de albúmina sérica bovina por 2 hr a 37°C. Se lavaron las placas 4 veces con PBS-Tween. Las muestras de suero se diluyeron 1:200 en PBS-Tween 20, y se adicionaron 100 μ L de la dilución a cada pozo de la placa por duplicado. Se incubó 1 hr a 37°C y posteriormente se lavó 4 veces con PBS-Tween20. Se adicionaron 100 μ L de una dilución 1:1000 en PBS-Tween de IgG anti IgG humana conjugada a biotina (Sigma Chem. Co. St. Louis) y se incubó por 1 hr a 37°C. Después de lavar 4 veces con PBS-Tween se agregaron 100 μ L de una dilución 1:2000 de estreptoavidina peroxidasa y se incubó por 1 hr a 37°C. Finalmente después de lavar la placa 4 veces se reveló con 100 μ L de sustrato constituido por 4 mg de o-fenilendiamina (Sigma Chem. Co. St. Louis), 10 mL de solución amortiguadora de citratos (0.1 M, pH 5.0) y 5 μ L de H₂O₂ al 30 %. La reacción se detuvo con 50 μ L de H₂SO₄ (2.5 N) y se leyó la absorbancia a 490nm en un lector de ELISA (Minireader II, Dynatech).

ELISA PARA DETECCION DE ANTICUERPOS anti-LAM

Este ensayo fue realizado de acuerdo a la técnica descrita por Sada y cols.¹⁵ La técnica se estandarizó utilizando el 50% del volumen descrito con la finalidad de ahorrar reactivo.

DETECCION DE LIPOARABINOMANANA

A. CONCENTRACION DE LIPOARABINOMANANA Y REDUCCION DE REACCIONES INESPECIFICAS

El procesamiento de las muestras de suero se realizó según la técnica descrita por Doskeland y Berdal¹⁶. Brevemente, 400 μ L de suero se diluyeron con 800 μ L de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (0.01M, pH 7.2) y se adicionaron 400 μ L de solución de EDTA (0.1 M, pH 7.0). La mezcla anterior se ebulló por 3 min, y se centrifugó por 8 min a 10,000 xg. El sobrenadante se precipitó con ETOH hasta alcanzar una concentración de 70 % y se centrifugó en las mismas condiciones. El precipitado se disolvió en 400 μ L de PBS, se ebulló por 3 min, se centrifugó por 5 min a 10,000 xg. El sobrenadante se precipitó con ETOH nuevamente y se centrifugó por 8 min a 10,000 xg y el precipitado obtenido se disolvió en 100 μ L de PBS con 1 % de albúmina sérica bovina (G.P. Sigma Chem. Co. St. Louis).

Este último material fue utilizado para la detección de antígeno por coagulación y DOT.

B. PREPARACION DEL REACTIVO DE COAGULACION

El reactivo de coagulación se preparó utilizando una cepa *S. aureus* Cowan I según la técnica de Edward y Larson¹⁷. A 500 μ L de suspensión de *S. aureus* 10 % (v/v) se agregaron 50 μ L de suero de conejo hiperinmune contra LAM. La mezcla se incubó por 2 hr a 37°C con agitación esporádica. Posteriormente las bacterias se lavaron 3 veces con PBS y se llevó a un volumen final de 2 mL con PBS-Albúmina sérica bovina 1 %, lo que constituyó el reactivo final. El suero hiperinmune se obtuvo según la técnica descrita por Sada y

col.¹³

Como control se preparó una suspensión semejante utilizando suero normal de conejo en lugar del suero hiperinmune contra LAM.

C. DETECCION DE LAM POR REACCION DE AGLUTINACION

Para la prueba de coagulación se mezclaron 25 μ L de reactivo de coagulación con 25 μ L del material obtenido en el punto A (concentrado de LAM), se incubó por 10 min con rotación (100 rpm) a temperatura ambiente y se leyó la aglutinación comparando con controles. Los controles fueron soluciones de LAM en concentración 100 ng/mL, 50 ng/mL, 25 ng/mL, 10 ng/mL, y 5 ng/mL y solución de PBS-Albúmina. Una prueba se consideró positiva si la aglutinación resultante era por lo menos tan intensa como la observada en el control de 25 ng/mL de LAM. El LAM utilizado en este estudio fue una donación de Patrick Brennan, (Departament of Microbiology, Colorado State University, Ft. Collins.) quien lo obtuvo purificado por cromatografía de filtración en gel de intercambio iónico y con detergente según una técnica previamente descrita por el mismo.¹⁰

D. PREPARACION DE MEMBRANA PARA DOT

Se cortaron cuadros de nitrocelulosa con poro de 0.45 μ (BIORAD Trans-BlotTM transfer medium) y se sumergieron en PBS por 5 min. Se dejaron secar y se colocaron 25 μ L del material obtenido en el punto A y en el caso de soluciones controles de LAM 100 μ L por pozo, empleando el aparato para

DOT (BIO-RAD Bio-DotTM Apparatus) una vez que se absorbieron las soluciones depositadas en cada pozo se lavó la membrana con 100 μ L de PBS, posteriormente se sacó la membrana del aparato, se dejó secar y se bloqueó con solución de PBS con 1 % de leche (Svelty^{MR} leche descremada en polvo Nestle^{MR}) incubando 30 min a temperatura ambiente. Finalmente se lavó la membrana tres veces con PBS y se dejó secar. Las muestras y los controles fueron los mismos que se utilizaron para la aglutinación.

E. DETECCION DE LAM POR DOT

Se incubó la membrana de nitrocelulosa durante 1 hr con una dilución 1:100 de anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra LAM (anticuerpos purificados por columna de afinidad (1 mg/mL), donados amablemente por P. Brennan) . Se lavó 5 veces con PBS-tween 20 y se incubó con una dilución 1:500 de IgG anti ratón especie específico biotilinado (Amersham International Pic) por 1 hr. Se lavó 5 veces con PBS tween 20 y se incubó la membrana con una dilución 1:1000 de estreptoavidin peroxidasa (Sigma Chem. Co. St. Louis) por 1 hr. Se lavo 4 la membrana veces con PBS tween 20 y 2 veces con PBS y se reveló con una solución que contiene: 30 mg de 4-Cl-naftol (Sigma Chem. Co. St. Louis), 10 mL de MeOH absoluto (Merck México S.A.) 50 mL de PBS y 100 μ L de H₂O₂ al 30 % (Merck México S.A.) durante 10-30 min. Se detuvo la reacción con PBS y se leyó comparando con los controles, la presencia de una mancha de intensidad

semejante o mayor al control de 5 ng/mL de LAM fue considerada positiva. Las diluciones se hicieron en PBS con 1 % de Tween 20 (Sigma Chem. Co. St. Louis) y todas las incubaciones fueron realizadas a temperatura ambiente con agitación esporádica.

CALCULOS ESTADISTICOS

Para la detección de anticuerpos por ELISA se calcularon índices de densidad óptica (IDO) dividiendo las absorbancias obtenidas de las muestras entre el valor obtenido por una muestra positiva que se corrió en todas las placas.

Los cálculos de correlación de Spearman sobre los índices de densidad óptica (IDO) para ELISA, y la comparación de los IDO de los grupos de estudio fueron realizados con Minitab Data Analysis Software (Minitab INC.). La concordancia de las técnicas con respecto al BAAR y el cultivo se valoró con el valor de kappa (κ) de Cohen¹⁸. Los parámetros de sensibilidad, especificidad y valores predictivos se calcularon como indica Tomar¹⁹.

RESULTADOS

GRUPOS DE ESTUDIO

La población de estudio constó de 94 pacientes atendidos por la consulta externa del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. De acuerdo al cuadro clínico y resultado de baciloscopías y cultivos los pacientes se clasificaron en tres grupos como se indica en la cuadro I.

DETECCION DE ANTICUERPOS

La mediana de los resultados de los índices de densidad óptica (IDO) calculados para extracto son: para el grupo con tuberculosis de 0.58 ± 0.30 mientras que para el grupo de no tuberculosis de 0.36 ± 0.19 los resultados demostraron una diferencia estadísticamente significativa $p < 0.025$. Utilizando LAM se obtuvieron medianas de 0.69 ± 0.34 y de 0.44 ± 0.27 respectivamente con una diferencia estadísticamente significativa $p < 0.025$. En los cuadros II y III se muestran los resultados obtenidos al dicotomizar la población en positivos o negativos para las pruebas considerando diferentes valores de IDO como puntos de corte para cada una. Las figuras 1 y 2 muestran en forma gráfica los resultados de serología para extracto y LAM. En el caso del ELISA utilizando extracto como antígeno se obtiene una mayor concordancia con el resultado de cultivo y/o baciloscopia a un punto de corte de $IDO = 0.5$ en donde se tienen especificidad del 75 % y sensibilidad de 65 %. Para el ELISA en el que se utilizó lipoarabinomanana como

antígeno se obtuvo a un punto de corte de 0.7 una concordancia con el cultivo y/o baciloscopia de 0.38 con sensibilidad de 51 % y especificidad de 90%. La correlación entre ambas técnicas de ELISA(ρ de Spearman) utilizando extracto crudo o lipoarabinomanana como antígenos es de 0.597. La representación gráfica se aprecia en la fig. 3.

DETECCION DE ANTIGENEMIA EN SUERO (LIPOARABINOMANANA)

Los resultados se muestran en la cuadro IV. De un grupo de 47 pacientes con tuberculosis pulmonar, en 15 (32%) se encontró una prueba de coaglutinacion positiva y de 18 (38%) con prueba de DOT positiva. Del grupo de 32 pacientes sin tuberculosis demostrable 6 (19%) dieron una prueba positiva por coaglutinación y 5 (15%) por DOT. Los valores calculados para sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo fueron calculados con estos datos y se encuentran en la cuadro IV. Cuando se agruparon los resultados de coaglutinación y de DOT, (cuadro V) se logró mejorar la sensibilidad a 53 % con muy discretos cambios en especificidad (Más de 80 % con coaglutinacion o DOT solos a 78 % con al menos una prueba positiva).

DISCUSION

Diversos estudios realizados por nuestro grupo y otros investigadores han revelado la utilidad de la detección de anticuerpos para el diagnóstico de tuberculosis en suero por el método de ELISA ^{15,20 21} sin embargo la gran mayoría de estos estudios son retrospectivos y en población altamente seleccionada, en los que se encuentra una división clara entre los grupos de pacientes con tuberculosis y pacientes con enfermedades diferentes a tuberculosis y/o sujetos sanos. Hasta el momento existen pocos estudios prospectivos en que se evalúen métodos serológicos, a partir de casos con alta sospecha de tuberculosis y se efectúe la serología. Desde el punto de vista práctico esta es la situación en que estos estudios deberían realizarse. El objetivo y diseño de este trabajo fue el determinar la utilidad de la serología y detección de antígenos de *M. tuberculosis* en la práctica diaria. Como se aprecia, los resultados de las determinaciones de anticuerpos demuestran que las diferencias entre las medianas de los grupos con y sin tuberculosis son estadísticamente significativas, sin embargo las desviaciones estándar de los grupos son tan grandes que se superponen como se observa en las figuras 1 y 2. Estos resultados demuestran que no es posible tener un punto de corte basado solo en estos datos (como promedios $\pm 2DS$). Por lo que es necesario evaluar a diferentes puntos de corte en cual se obtienen mejores sensibilidades y

especificidades. Como se observa en los cuadros II y III cuando se escoje una alta sensibilidad se pierde especificidad, lo contrario tambien es evidente, a una alta especificidad existe una baja sensibilidad, estos resultados van en relación directa con la sobreposición de los valores de IDO de los grupos.

Algunos investigadores como Bothamley han demostrado una asociación significativa del nivel de anticuerpos a diferentes antígenos de la micobacteria con la exposición ocupacional a la misa²². En nuestro caso, el hecho de que un alto porcentaje de la población tenga anticuerpos contra micobacterias dificulta la interpretación de los resultados. La causa de desarrollo de anticuerpos probablemente esté en relación a la vacunación con BCG, la exposición a micobacterias comensales, y al contacto eventual con *M. tuberculosis*. Aun más, con respecto a los antígenos individuales, se sabe que ciertos anticuerpos anti LAM tienen reacción cruzada con antígenos de otras especies de micobacterias²³ y de otras bacterias²⁴ por lo que la exposición a otros microorganismos específicos pudiera condicionar estos niveles altos de anticuerpos .

El diseño de este estudio (evaluación solo de casos sospechosos de tuberculosis) no permite distinguir casos que efectivamente correspondan a tuberculosis pero que por baciloscopia y cultivos sean considerados negativos y que al tener alguna de las pruebas serológicas positivas alteren la

especificidad del estudio. Considerando los resultados con estos antígenos parece ser que la alternativa de diagnóstico implica la utilización de otros antígenos o anticuerpos monoclonales dirigidos a epitopes no compartidos de los ya utilizados en técnicas de inhibición competitiva que muestran ser muy específicas, aun cuando las sensibilidades no son mucho mayores a las obtenidas por nosotros.^{25,26}

La búsqueda de antígenos es una alternativa para el diagnóstico de tuberculosis ya que para su aplicación no se tiene el problema del desarrollo de anticuerpos por la exposición previa al bacilo. En nuestro estudio se observa que la limitación más importante para la detección de antígeno (LAM) es la baja sensibilidad, que fue de 53%, situación que se ha encontrado también en la detección de mananas para el diagnóstico de candidiasis invasiva donde la sensibilidad se ha reportado en un intervalo de 22-100 % siendo la más baja para la aglutinación con latex²⁷. Un estudio previo publicado por nuestro grupo demostró que la detección de LAM en suero fue de gran utilidad para el diagnóstico de tuberculosis¹³ con una sensibilidad del 88%. No existe una explicación clara de por qué los cambios en la sensibilidad obtenidos en el trabajo previo y los resultados actuales; probablemente este cambio esté en relación a que en el estudio previo las muestras obtenidas correspondían esencialmente a pacientes hospitalizados con tuberculosis más avanzadas y que en el estudio actual los casos

correspondieron a pacientes de consulta externa y por lo tanto con tuberculosis menos avanzada, de hecho los resultados en sensibilidad se parecen a los obtenidos en el estudio previo en pacientes con tuberculosis pulmonar y baciloscofia negativa en los que la sensibilidad fue de 67% y cuyo diagnóstico fue hecho por cultivo a partir de lavado broncoalveolar.¹⁹

Dos aspectos importantes a considerar acerca del antígeno son en qué sitio se tiene la mayor probabilidad de encontrarlo y en qué cantidad. Cambiaso y cols²⁸ describieron una técnica de detección de antígeno por aglutinación con latex utilizando lisados celulares con lo que obtuvieron un límite de detección de 15-20 micobacterias y pudieron distinguir evaluando muestras de lavados bronquiales casi en 100 % a pacientes y controles. La cantidad y las características de los lipopolisacáridos (LPS) obtenidos utilizando lisados celulares y otros fluidos como suero es considerablemente diferente. Se han realizado estudios donde se observa que durante el curso de la infección los lipopolisacáridos son liberados de la bacteria en cantidad finita y asociados a proteínas séricas en forma aparentemente labil²⁹, posteriormente se concentran en hígado donde se metabolizan y sus productos son excretados por orina y heces³⁰. Lo cual conduciría a tener una concentración baja de LPS circulantes con la consecuente baja sensibilidad al intentar detectarlos.

Así pues, consideramos que la detección de antígeno debe abordarse desde diferentes aspectos, una es buscarlos en otras fuentes donde sea más factible que se encuentren en mayor concentración y la otra es desarrollar técnicas de concentración y de detección más sensibles, utilizando anticuerpos contra epitopos específicos.

REFERENCIAS

¹Sudre P, ten Dam G, and Kochi A. Tuberculosis: a global overview of the situation today. Bull WHO 1992; 70:149-159.

²Boletín de Epidemiología de los Estados Unidos Mexicanos, Mayo, 1992.

³Syblo K. Overview and epidemiologic assessment of the current global tuberculosis situation with emphasis on control in developing countries. Rev Infec Dis 1989; 11(supl 2):s339-s346.

⁴Daniel T W and Debanne S M. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. Am Rev Respir Dis 1987; 135: 1137-1151.

⁵Parenti F. New experimental drugs for the treatment of tuberculosis. Rev Infec Dis 1989; 11(supl 2): s479-s483.

⁶Sada E, Torres M, Herrera T. Nuevos métodos diagnósticos en tuberculosis. Rev. Inst Nal Enf Resp Mex 1988; 1:121-125.

⁷Brisson-Noel A, Aznar C, Chureau C, Nguyen S, Pierre C, Bartoli M y col. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. The Lancet 1991;338:364-366.

⁸Daniel T M. Rapid diagnosis of tuberculosis: laboratory techniques applicable in developing countries. Rev Infec Dis 1989; 11(supl 2): s471-s478.

⁹Daniel T M, De Murillo G L, Sawyer J A, McLean A, Pinto E, Debanne S M, y col. Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1986; 134:662-665.

¹⁰Young D B. Structure of mycobacterial antigens. British Medical Bull. 1988; 44:562-583.

¹¹Hunter, S W, Gaylord H, and Brennan P. Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tubercle bacilli. J Biol Chem 1986; 261:12345-12351.

¹²Chan J, Fan X, Hunter S W, Brennan P J and Bloom B R. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. Infect and Immun 1991; 59:1755-1761.

¹³Sada E, Aguilar D, Torres M, y Herrera T. Detection of lipoarabinomannan as a diagnostic test for tuberculosis. J Clin Microbiol 1992;30:2415-2418.

¹⁴Runyon, E H, Karlson A G , Kubica G P and Wayne L G. *Mycobacterium*, . En E. H. Lennette, A. Balows, W. J. Hausler, Jr., and J.P. Truant (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 3era ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1980, p150-179.

¹⁵Sada E, Brennan P J, Herrera T, Torres M. Evaluation of lipoarabinomannan for the serological diagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28:2587-2590.

¹⁶Doskeland S O and Berdal B F. Antigen detection in body fluids: methods for rapid antigen concentration and reduction of nonspecific reactions. *J Clin Microbiol* 1980; 11:380-384.

¹⁷Edward E A and Larson G L. New method of grouping beta-hemolytic streptococci directly on sheep blood agar plates by coagglutination of specifically sensitized protein A-containing staphylococci. *Appl Microbiol* 1974; 28:972-976.

¹⁸Leach C. *Fundamentos de estadística: enfoque no paramétrico para ciencias sociales*. México, LIMUSA, 1982. 366-369.

¹⁹Toman K. Sensibilidad, especificidad y valor predictivo de los test diagnósticos. *Bol Union Inter Tuberc* 1981; 56:19-29.

²⁰McDonough J A, Sada E., Sippola A A, Ferguson L E, and Daniel T M. Microplate and dot immunoassays for the serodiagnosis of tuberculosis. J Lab Clin Med 1992; 120:318-22.

²¹Ma Y, Wang Y M, and Daniel T M. Enzyme-linked immunosorbent assay using *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in china. Am Rev Respir Dis 1986; 134:1273-1275.

²²Bothamley G H, Swason J, Potts R C, Grange J M, Kardjito T, and Ivanyi J. Specificity of antibodies and tuberculin response after occupational exposure to tuberculosis. J Infect Dis 1992; 166:182-186.

²³Levis W R, Meeker H C, Schuller-Levis G, Sersen E, Brennan P, and Fried P. Mycobacterial carbohydrate antigens for serological testing of patients with leprosy. J Infect Dis 1987; 156:763-769.

²⁴McNab, B W., Meek A H, Duncan J R, Brooks B W, Van Dreumen A A, Martin S W. y col. An evaluation of selected screening test for bovine paratuberculosis. Can J Vet Res 1991; 55:252-259.

²⁵Wilkins E G L and Ivanyi J. Potential value of the serology for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. Lancet 1990; 336:641-644.

²⁶Bothamley G H, Rudd R, Festenstein F, and Ivanyi J. Clinical value of the measurement of *Mycobacterium tuberculosis* specific antibody in pulmonary tuberculosis. *Thorax* 1992; 47:270-275.

²⁷Jones J M. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3:32-45.

²⁸Cambiaso C L, Van Vooren J P, and Farber C M. Immunological detection of mycobacterial antigens in infected fluids, cells and tissues by latex agglutination: animal model and clinical application. *J Immunol Methods* 1990; 129:9-14.

²⁹Tesh V L and Morrison D C. The physical-chemical characterization and biologic activity of serum released lipopolisaccharides. *J Immunol* 1988; 141:3523-3531.

³⁰Kleine B, Freudenberg M A, and Salanos C. Excretion of radioactivity in faeces and urine of rats injected with 3H,14C-lipopolisaccharide. *Br J Exp Pathol* 1985; 66:303-8

FALTA

PAGINA

23

CUADRO I Clasificación de la población de estudio

Población	Número (%)	Características
No tuberculosis	32 (34%)	BAAR negativo y cultivo negativo
Tuberculosis	47 (50%)	Sintomatología compatible con TBP BAAR y/o cultivo positivo
Secuelas	15 (16%)	Antecedentes de TBP BAAR negativo y cultivo negativo
Total	94	

BAAR= Tinción para bacilos ácido-alcohol resistentes
TBP= Tuberculosis pulmonar

CUADRO II Resultados de la determinación de anticuerpos utilizando como antígeno extracto soluble de *M. tuberculosis*

IDO para punto de corte	No. de positivos por grupo			S %	E %	VPP*	VPN*	Valor de kappa
	TB	SEC	NO TB					
0.1	47	14	30	100	6	0.19	1.0	0.07
0.2	44	13	25	93	21	0.21	0.92	0.17
0.3	43	10	18	91	43	0.27	0.95	0.37
0.4	38	10	13	80	59	0.31	0.92	0.41
0.5	31	8	8	65	75	0.37	0.90	0.39
0.6	23	7	2	48	93	0.61	0.88	0.38
0.7	18	3	1	38	96	0.68	0.86	0.30
0.8	15	2	1	31	96	0.64	0.85	0.24
0.9	12	2	1	25	96	0.59	0.84	0.19
1.0	8	1	0	17	100	1	0.83	0.14
1.1	5	1	0	10	100	1	0.82	0.08
1.2	2	0	0	4	100	1	0.81	0.03
1.3	2	0	0	4	100	1	0.81	0.03
1.4	0	0	0	0	100	--	0.81	0.00
1.5	0	0	0	0	100	--	0.81	0.00

IDO= Índice de densidad óptica

TB= Grupo: tuberculosis

NO TB= Grupo: no tuberculosis

VPP= Valor predictivo positivo

*= Prevalencia 0.189

SEC= Grupo: escuelas

S= Sensibilidad

E= Especificidad

VPN= Valor predictivo negativo

CUADRO III Resultados de la determinación de anticuerpos utilizando como antígeno lipoarabinomana

IDO para punto de corte	No. de positivos por grupo			S %	E %	VPP*	VPN*	Valor de kappa
	TB	SEC	NO TB					
0.1	45	15	30	95	6	0.19	0.83	0.02
0.2	43	14	27	91	15	0.19	0.87	0.08
0.3	39	13	24	82	25	0.20	0.85	0.08
0.4	35	10	16	74	50	0.25	0.89	0.24
0.5	29	7	13	61	59	0.25	0.86	0.20
0.6	26	6	8	55	75	0.33	0.87	0.28
0.7	24	6	3	51	90	0.54	0.88	0.37
0.8	16	3	3	34	90	0.44	0.85	0.21
0.9	14	2	3	29	90	0.40	0.84	0.17
1.0	10	2	2	21	93	0.41	0.83	0.12
1.1	5	1	1	10	96	0.36	0.82	0.06
1.2	3	1	1	6	96	0.25	0.81	0.02
1.3	1	0	1	2	96	0.10	0.80	0.00
1.4	0	0	0	0	100	--	0.81	0.00
1.5	0	0	0	0	100	--	0.81	0.00

IDO= Índice de densidad óptica
 TB= Grupo: tuberculosis
 NO TB= Grupo: no tuberculosis
 VPP= Valor predictivo positivo
 * = Prevalencia 0.100

SEC= Grupo: secuelas
 S= Sensibilidad
 E= Especificidad
 VPN= Valor predictivo negativo

CUADRO IV Resultados de la determinación de antígeno por coaglutinación y DOT

Técnica	No. de positivos por grupo			S %	E %	VPP*	VPN*	Valor de kappa
	TB	SEC	NO TB					
	n=47	n=15	n=32					
Coaglutinación	15	3	6	31.91	81.25	0.28	0.83	0.11
DOT	18	7	5	38.29	84.37	0.36	0.85	0.20

TB= Grupo: tuberculosis
 NO TB= Grupo: no tuberculosis
 VPP= Valor predictivo positivo
 * = Prevalencia 0.189

SEC= Grupo: secuelas
 S= Sensibilidad
 E= Especificidad
 VPN= Valor predictivo negativo

CUADRO V Resultados agrupados de la determinación de antígeno

Grupo	No. total	Resultados positivos por coaglutinación y/o DOT	S %	E %	VPP*	VPN*
Tuberculosis	47	25 (53%)	53	78	0.36	0.87
No tuberculosis	32	7 (21%)				

S= Sensibilidad

E= Especificidad

VPN= Valor predictivo negativo

VPP= Valor predictivo positivo

*= Prevalencia O.189

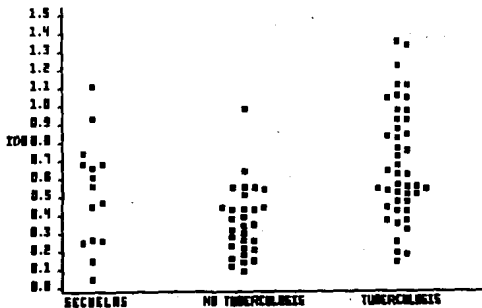


FIGURA 1

FIGURA 1 Resultados de índices de densidad óptica para la determinación de anticuerpos en suero utilizando extracto de *M. tuberculosis* como antígeno en el ensayo. La población de estudio se muestra dividida en los tres grupos definidos: tuberculosis, no tuberculosis y secuelas, el resultado de cada sujeto se indica como un punto.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

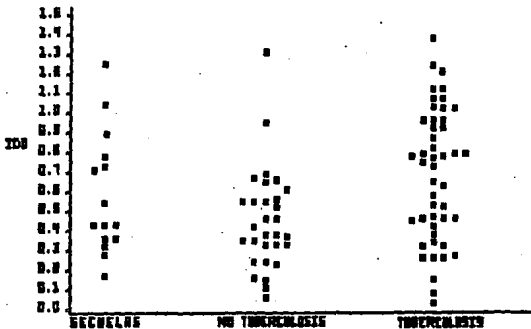


FIGURA 2

FIGURA 2 Resultados de índices de densidad óptica para la determinación de anticuerpos en suero utilizando lipoarabinomannana de *M. tuberculosis* como antígeno en el ensayo. La población de estudio se muestra dividida en los tres grupos definidos: tuberculosis, no tuberculosis y secuelas, el resultado de cada sujeto se indica como un punto.

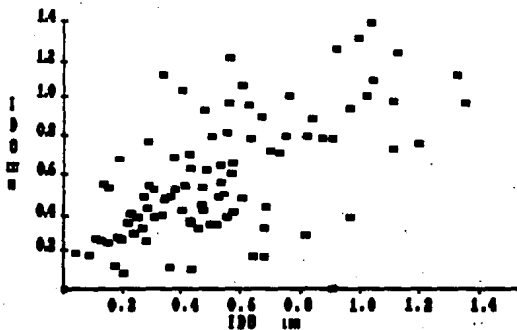


FIGURA 3

FIGURA 3 Correlación de los índices de densidad óptica obtenidos por ELISA utilizando como antígenos extracto y lipoarabinomannano de *M. tuberculosis*. En cada eje se indica el antígeno que se utilizó en el ensayo. $\rho = 0.597$