

11227

30

29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

"FACULTAD DE MEDICINA"
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN

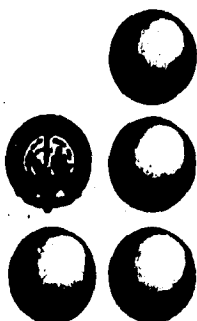
"UTILIDAD DEL ELISA EN EL SERODIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS EXPERIENCIA DEL INNSZ"

**TESIS DE POSTGRADO
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALISTA EN:**

"MEDICINA INTERNA"

**P R E S E N T A :
DR. LUIS FELIPE FLORES SUAREZ**

**ASESOR DE TESIS :
DR. JOSE SIFUENTES OSORNIO**



INNSZ

MEXICO, D.F.

OCTUBRE 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

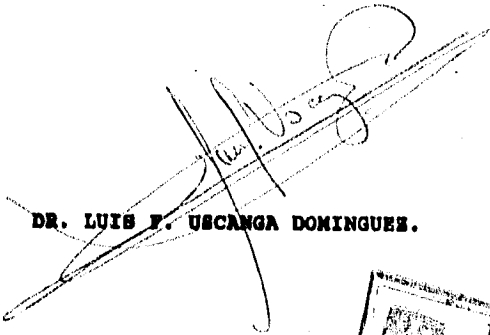


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

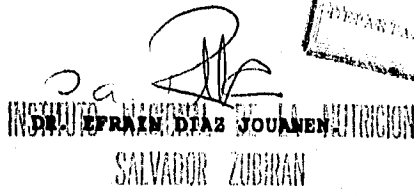
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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



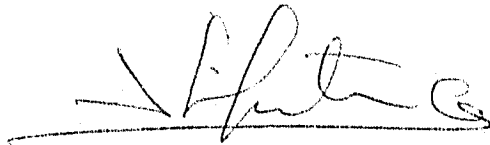
DR. LUIS F. USCANGA DOMINGUEZ.

Profesor titular del curso





INSTITUTO MEXICANO DE LA EDUCACION
DR. EFRAIM DIAZ JOUANEN
SALVADOR ZUBIRAN
SUBDIRECCION DE ENSEÑANZA
MEXICO, D. F.
Jefe de Enseñanza e Investigación



DR. JOSE SIFUENTES OSORNIO.

Asesor de tesis.

DEDICATORIA

**A MI PADRE Y MIS TRES MADRES, POR SU EJEMPLO, AMOR, PACIENCIA Y
ENSEÑANZAS PERENNES.**

AGRADECIMIENTOS.

Al Sr. Renato Sánchez Montero y a la Dra. Angelina Villasís Keever por su ayuda en la primera fase del estudio.

A la Q.C. Ma. de Lourdes Infante Suárez y al Biol. Luciano Hernández Gómez.

Al Dr. Antonio Villa, sin quien, como ya se está haciendo costumbre, este trabajo no hubiese concluido.

Al Dr. José Sifuentes por la paciencia mostrada por varios años a pesar de retrasos inexplicables.

Al Instituto Nacional de la Nutrición.

A los pacientes, razón vital de nuestra profesión.

INDICE

	Página
Introducción -----	1
Objetivos -----	5
Hipótesis -----	6
Diseño del estudio -----	6
Material y métodos -----	6
Análisis estadístico -----	9
Resultados -----	10
Discusión -----	14
Conclusión -----	22
Bibliografía -----	22

**UTILIDAD DEL ELISA EN EL SERODIAGNOSTICO DE
TUBERCULOSIS: EXPERIENCIA DEL
INNSI.**

I. INTRODUCCION.

La tuberculosis es una enfermedad crónica, debilitante y en ocasiones incapacitante, de prevalencia elevada en México y que ocupa uno de los primeros lugares en morbilidad y uno no despreciable en cuanto a causa de mortalidad. Como en otras naciones, en México existe un resurgimiento importante de esta enfermedad, especialmente a raíz del incremento en la población afectada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), del número de casos con enfermedades crónicas como diabetes mellitus, cirrosis hepática, cáncer, etc., además de una proporción cada vez mayor de individuos con transplante de órganos (1,2,3).

El diagnóstico de la tuberculosis puede ser difícil en algunos casos, como ocurre en otras enfermedades causadas por micobacterias, depende del cultivo del agente infeccioso, o en su defecto, dada la dificultad de ello, de la observación del germen en tejidos o secreciones de los individuos sospechosos de padecer la infección (2,3). Estas condiciones no siempre se cumplen y ello obliga al médico a administrar tratamiento de prueba a muchos sujetos con infección micobacteriana probable.

Desde el siglo pasado, varios intentos se han hecho para

disponer de una prueba serológica con sensibilidad y especificidad suficientes para ser confiable en el diagnóstico de la infección tuberculosa. Los resultados van desde aquellos de Daniel (5), quien desarrolló una prueba serológica con sensibilidad del 67%, y especificidad del 88%, o los más alentadores de Kiran, quien reportó 94% y 100% de sensibilidad y especificidad respectivamente (6), ambos utilizando extractos crudos de bacilos tuberculosos.

Se han observado varias dificultades en el estudio de los anticuerpos séricos en contra de *Mycobacterium tuberculosis*. Inicialmente, las características propias de la micobacteria son muy relevantes, destacando la abundancia de lípidos en su pared y la presencia de otros antígenos de naturaleza proteínica y glicoproteínica, como se muestra en las figuras 1, 2 y 3, lo cual ha sido motivo de excelentes y extensas revisiones por Daniel y Janicki (7), Goren (8) y más recientemente McNeil, Besra y Brennan (9) y a donde se remite al lector para mayor detalle.

Esta gran diversidad en la composición de la pared de las micobacterias es responsable desde luego de la inmunogenicidad que pueda darse en contra de estos microorganismos. Sin embargo, debemos recordar que el crecimiento y sobrevivencia de estos gérmenes ocurre en el ambiente intracelular y de hecho, poco se conoce con precisión acerca de los mecanismos inmunopatogénicos que conllevan a las manifestaciones clínicas de enfermedad tuberculosa a pesar de la importancia de este padecimiento. Aparentemente, parte de la capacidad de la micobacteria para vivir en el medio intracelular de los macrófagos se debe a la evasión de los mecanismos de lisis y muerte celular al través del

FIGURA 1

PARED CELULAR MICOBACTERIANA

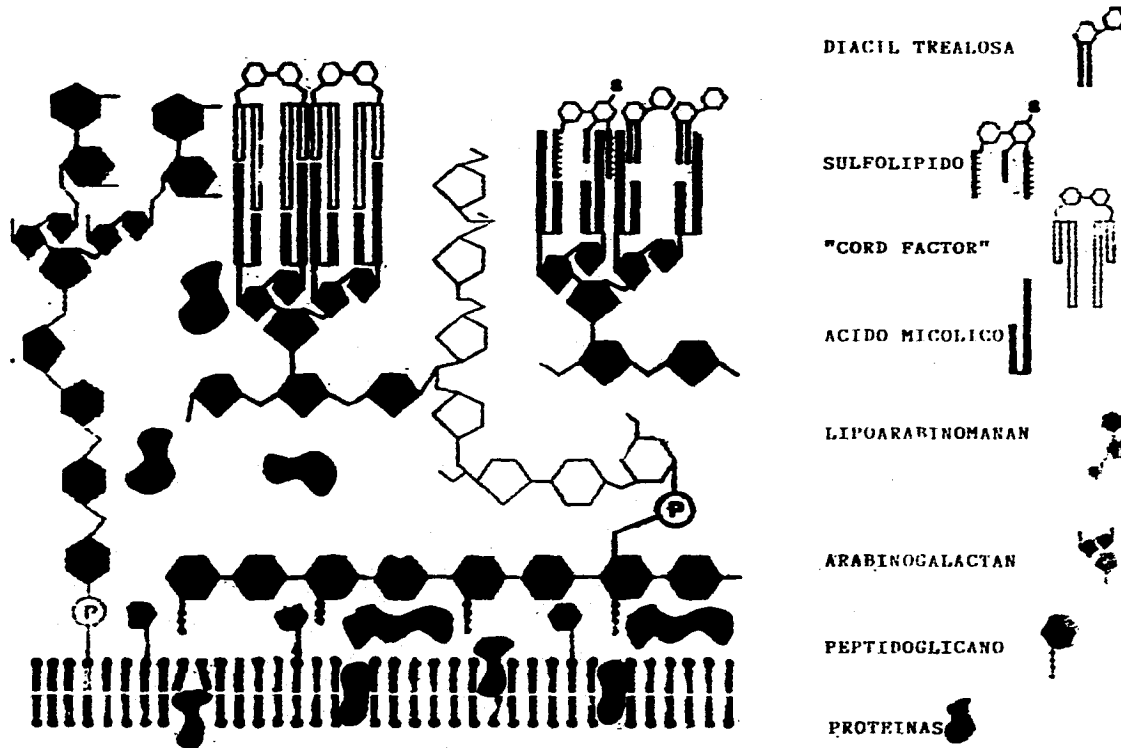


FIGURA 2

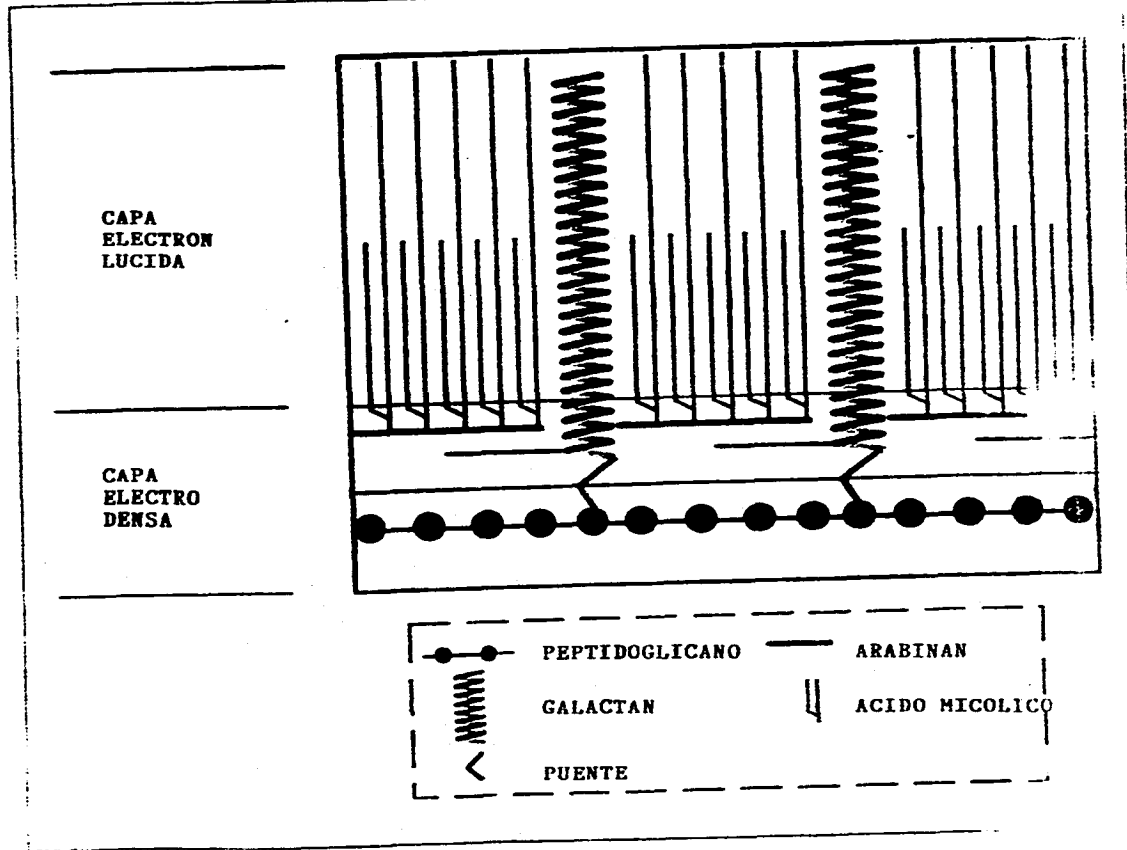
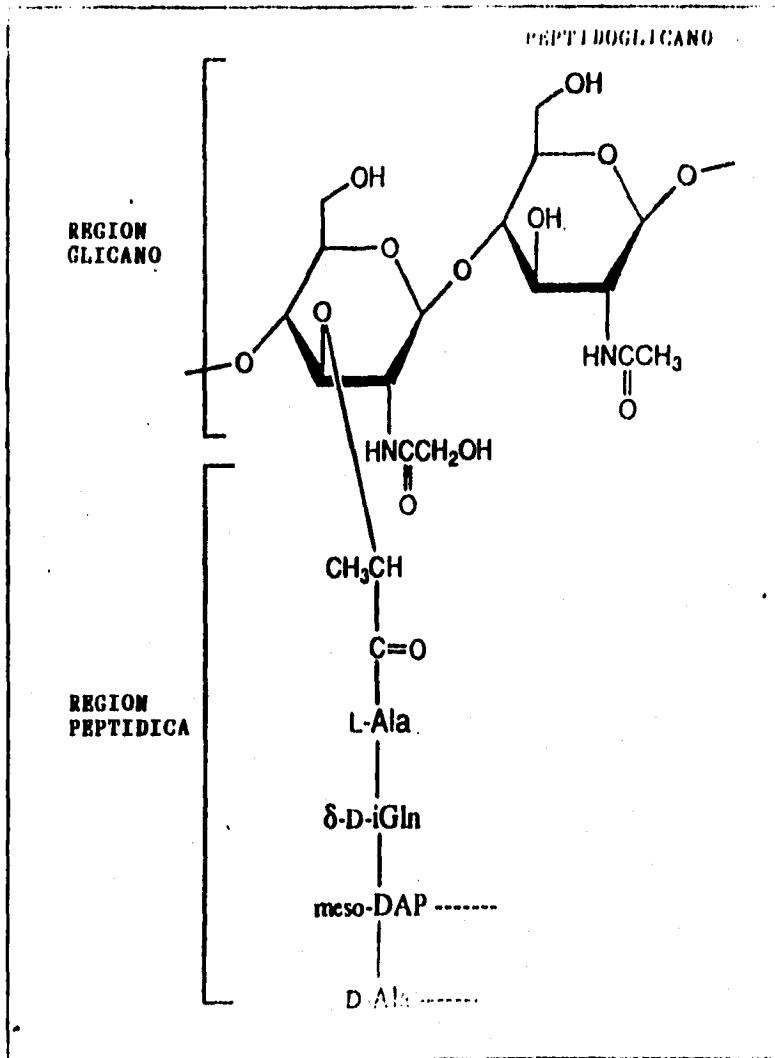


FIGURA 1



impedimento de la fusión entre fagosomas y lisosomas, posiblemente al través de algunos de los compuestos químicos presentes en su pared, como es el caso de los sulfátidos, citados con anterioridad (9). Se sabe que los mecanismos inmunes predominantes para protección en contra de la infección tuberculosa son eminentemente de naturaleza celular, generándose granulomas como las lesiones características de la tuberculosis. A pesar de ello, no siempre estos mecanismos son protectores y la hipersensibilidad retardada puede ser deletérea para el hospedero, especialmente en presencia de una carga antigénica excesiva (1,10).

La inmunidad humoral parece ser menos importante en la protección en contra de la infección por *M. tuberculosis*, a pesar de que haya producción de anticuerpos específicos en contra de diversos componentes de las micobacterias. Esto es de particular importancia en el desarrollo de pruebas serológicas para diagnóstico y estudio de la infección. Desafortunadamente, estos anticuerpos pueden encontrarse tanto en individuos con enfermedad activa, como en aquellos infectados sin enfermedad, y esto ha limitado la aplicación práctica de los ensayos serológicos (5).

Con estos antecedentes, es posible afirmar la importancia que tiene tanto la presencia de anticuerpos dirigidos contra diferentes compuestos químicos de las micobacterias, como también la identificación de antígenos que sean importantes tanto para mediar inmunopatogenicidad, como para promover el desarrollo de respuestas adecuadas de defensa del hospedero. No es difícil afirmar que a mayor especificidad de un antígeno para determinada especie micobacteriana, mayor es la probabilidad de que dicho

antígeno pueda ser responsable de inducir cambios en la capacidad infectante del microorganismo (5).

Esto último se ve apoyado por estudios recientes que demuestran cambios en el patrón fenotípico de secreción de diversas proteínas micobacterianas como las de choque térmico de 65 y 70 kd, o el complejo proteínico de 30-32 kd, bajo diversas condiciones, tanto intracelulares, donde se da incremento en la secreción de dichos compuestos, bajo situaciones que se conocen incompletamente, como extracelulares, con manipulación de pH, choque térmico o presencia de peróxido de hidrógeno, que inducen un patrón de secreción en ocasiones opuesto (11).

Asimismo, la especificidad de las pruebas serológicas depende en gran medida de los antígenos utilizados, siendo esto el determinante principal de dicha característica. Entre los diferentes antígenos que se han utilizado están desde antígenos bacilares crudos como filtrado de *M. tuberculosis*, sonicados de BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) y extractos de *M. tuberculosis*. La sensibilidad va de 56 a 94% y la especificidad de 86 a 100%. En otros estudios se ha usado PPD como antígeno, con sensibilidad tan baja como 31% a un máximo de 86% y especificidad del 78 al 100% (5). El mayor conocimiento de diversas estructuras antigénicas de *M. tuberculosis*, permitiría obtener pruebas con resultados más sensibles y específicos y con valores predictivos positivos también mayores. Los resultados falsos positivos pueden atribuirse a la existencia de anticuerpos en contra de determinantes antigénicos presentes en otras micobacterias que son inocuas para el humano y no producen enfermedad, aunque se tenga contacto y se desarrolle una memoria inmunológica contra

ellas. Por ello, se han desarrollado métodos serológicos para determinación de anticuerpos contra otros antígenos propios de M. tuberculosis.

PROPOSITO.

En el curso de mi estancia en el Instituto Nacional de la Nutrición he podido observar el estudio diagnóstico de muchos pacientes con signos y síntomas atribuibles a infección por M. tuberculosis. Dentro de la ruta diagnóstica establecida, la serología mediante ELISA se ha vuelto prácticamente rutinario. Como observación personal me ha sido posible encontrar resultados tanto falso positivos como falso negativos en un número mayor de casos de los reportados en estudios previamente publicados.

Por ello, he decidido abordar en forma retrospectiva la relación entre las pruebas solicitadas y el diagnóstico final comprobado de la mayoría de aquellos pacientes en los cuales se solicitó serología en contra de M. tuberculosis en el lapso de 24 meses comprendido de julio de 1990 a junio de 1992.

II. OBJETIVOS.

1. Determinar la eficiencia diagnóstica de la serología versus extracto crudo de BCG mediante ELISA en el diagnóstico de tuberculosis activa en los pacientes atendidos en el Instituto Nacional de la Nutrición.

III. HIPOTESIS.

La determinación de anticuerpos séricos por el método de ELISA, con extracto crudo de BCG como antígeno, no es de utilidad en su forma actual en el diagnóstico de enfermedad tuberculosa en los pacientes del INNSZ.

IV. DISEÑO DEL ESTUDIO.

El diseño utilizado fue retrospectivo, observacional, transversal, descriptivo y comparativo entre diversos grupos de enfermos en quienes se realizó la prueba.

V. MATERIAL Y METODOS.

I. PACIENTES: Se revisaron los expedientes disponibles de aquellos pacientes en los que se efectuó la serología para tuberculosis en el periodo comprendido de julio de 1990 a junio de 1992. En algunos casos se encontraron resultados de más de una prueba serológica. Esto se hizo acudiendo al registro del Laboratorio de Microbiología Clínica del INNSZ.

Se recolectó la siguiente información de los expedientes de los pacientes:

Datos demográficos, antecedente de inmunización con BCG, exposición a tuberculosis, riesgo para infección por VIH, antecedentes de tuberculosis o tratamiento para la misma previo

a la fecha de obtención de la muestra para serología.

Manifestaciones clínicas de tuberculosis: pulmonares (tos, hemoptisis, expectoración), renales (hematuria, leucocituria estéril), gastrointestinales (diarrea crónica, ascitis), hepáticas (alteración de las pruebas de función hepática, ictericia), osteo-articulares (osteomielitis crónica, artritis séptica, formación de abscesos "fríos"), cutáneas, generales (pérdida de peso, fiebre de origen oscuro, hiporexia, diaforesis profusa de predominio nocturno), ganglionares (adenomegalias), hematológicas (aplasia medular), neurológicas (meningitis).

Manifestaciones radiológicas: pulmonares (cavernas, infiltrados reticulares compatibles con micobacteriosis atípicas), gastrointestinales (cambios del patrón normal mucoso en tránsito intestinal), osteoarticulares, renales (estenosis ureteral o uretral u otros cambios en urografía excretora compatibles con infección tuberculosa).

Histopatología compatible con tuberculosis (específicamente presencia de granuloma o necrosis caseosa). Baciloscopias, cultivo para M. tuberculosis y PPD.

II. CLASIFICACION DE TUBERCULOSIS: Los pacientes se agruparon en 7 categorías:

AI - tuberculosis definitiva: caso con cultivo positivo para M. tuberculosis.

AII - tuberculosis probable: a) caso con manifestaciones clínico-radiológicas e histopatología compatible más baciloscopias positivas o

b) caso con respuesta terapéutica específica positiva en presencia de manifestaciones clínico-radiológicas.

AIII - tuberculosis posible: a) paciente con manifestaciones clínicas ,

b) histopatología compatible o,

c) baciloscopias.

AIV - paciente con PPD positivo.

B - otras micobacteriosis con cultivo positivo.

C - otros diagnósticos.

D - individuos sanos.

Este último grupo se constituyó con mujeres adultas sanas participantes en un estudio simultáneo del Departamento de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, sobre las ventajas de lactar a infantes y su impacto en la incidencia y la prevalencia de infecciones diarreicas en la población infantil de San Pedro Mártir, delegación Tlalpan, Distrito Federal. Como parte del estudio sobre lactancia, se les efectuó tipificación de grupo sanguíneo y Rh; en una alícuota de suero se realizó la prueba de ELISA en contra del extracto crudo de BCG. Se les aplicó en forma voluntaria un cuestionario y se hizo una exploración física en su medio ambiente habitacional en mayo de 1994.

III. DETERMINACION DE ANTICUERPOS VS.

M. TUBERCULOSIS.

La prueba fue desarrollada en el Departamento de Infectología del INNSZ en 1982 y reestandarizada en 1989. Se

TABLA 1
ESPECIES DE MICOBACTERIAS DIFERENTES A
Mycobacterium tuberculosis

<u>Mycobacterium chelonae</u>	2 casos
<u>Mycobacterium smegmatis</u>	2 casos*
<u>Mycobacterium flavescens</u>	1 caso
<u>Mycobacterium fortuitum</u>	1 caso
<u>Mycobacterium avium</u>	1 caso
<u>Mycobacterium goodii</u>	1 caso*
<u>Mycobacterium goodii</u>	1 caso
<u>Mycobacterium terrae</u>	1 caso

* Probable contaminante

TABLA 2

DIAGNOSTICOS EN EL GRUPO CONTROL.

Absceso dental	1
Absceso hepático	1
Absceso (sitio no determinado)	1
Absceso retroperitoneal	1
Amibiasis hepática	2
Amiloidosis	2
Anemia hemolítica autoinmune	2
Ansiedad	1
Aplasia medular	2
Artritis reumatoide (AR)	4
AR + hepatitis crónica autoinmune	1
Artritis reumatoide juvenil	1
Budd-Chiari	1
Bulas enfisematosas	1
CA de primario desconocido	3
CA colon	2
CA duodeno	1
CA esófago	1
CA estómago	2
CA pulmón	2
CA páncreas	1
CA riñón	2
CA testículo	1
Candidato a trasplante	2
Cirrosis biliar primaria	1
CCL + OAD	1
Cirrosis hepática alcohólica	7
Cirrosis hepática postnecrótica	9
Crohn	4
Cushing (síndrome)	1
Cistitis inespecífica	1
Coccidioidomycosis	1
Carcinomatosis peritoneal	1
Carcinoide	2
Depresión	1
Derrame paraneumónico	1
Diabetes mellitus	16
DM + HAS	1
DM + fractura femoral	1
DM + ICCV	1
DM + neumonia	1
DM + iatrogenia de vías biliares	1
DM + osteomielitis	1
Diarrea crónica	7
Diverticulosis	1
Donador de médula ósea	1
Donador renal	15
Espondilitis anquilosante	1
Enfermedad acidopéptica	4
Enf. mixta de tejido conjuntivo	1
Endometriosis	1

Enfermedad inflamatoria intestinal	1
(no incluye Crohn)	
Enfermedad pélvica inflamatoria	1
Epididimitis	1
Epilepsia	1
Eritema nodoso	1
Eritema polimorfo	1
Escara glútea	1
Fasciolosis	1
Fatiga crónica	2
Fibrilación atrial + gota	1
Fibromatosis retroperitoneal	1
Fibrosis pulmonar	1
Fiebre de origen desconocido	10
FOD + CA colon	1
Fabry	1
Gota + IRCT	1
Guillain-Barré	1
HAS	1
HAS + hipotiroidismo	1
Hepatitis crónica activa	1
Hipertrofia prostática + HAS	1
Hematuria inespecífica	1
Hepatitis alcohólica	1
Hepatitis por virus C	3
Hepatopatía crónica	1
Hernia hiatal	1
Hipertensión portal hemorrágica	1
Hipoglucemia	1
Histoplasmosis	2
Hodgkin	4
ICCV + AR	1
Insuficiencia renal crónica	31
IRCT + CBP	1
IRCT + HIV	1
Infección de vías urinarias	4
Insuficiencia arterial	1
Insuficiencia ovárica	1
Intestino corto	2
Leucemia aguda mielógena	2
LAM + neumonía	1
Lupus eritematoso generalizado	12
LEG + AHA	1
LEG + IRCT	2
LEG + criptococosis	1
Leucemia granulocítica crónica	1
Linfadenitis inespecífica	1
Linfangitis	2
Linfoma no Hodgkin	7
Liposarcoma	1
Litiasis renal	1
Malformación arterio-venosa	1
Mastopatía fibroquística + HAS	1
Mielofibrosis	1
Miositis	1
Mucormicosis	1
Necrosis avascular de cadera	1

Neumonitis	1
Neuritis	1
Nocardosis	1
Nódulo pulmonar	1
Osteomielitis	2
Pancreatitis aguda	1
Pancreatitis crónica	1
Periodontitis	1
Poliquistosis ovárica	1
Poliquistosis renal	1
Pérdida de peso + urolitiasis	1
Preeclampsia	1
Estado procoagulante	1
Proteinuria	1
Psicosis	1
Pénfigo	1
Quiste renal	1
Síndrome de sepsis	1
SIDA + linfoma	1
SIDA + histoplasmosis	1
Enf. de Schuerman	1
Sin diagnóstico	1
Enfermedad de Still	1
Sobrepoblación bacteriana	2
Sprue tropical	1
TIA	1
Tiroiditis	1
Tos crónica	1
Toxoplasmosis	1
Transplante hepático	5
Transplante de médula ósea	1
TRDC	2
TRDC + CHPN	1
TRDVR + enf. de Wegener	1
TRDVR	17
TFD	4
Vértigo + trastorno funcional digestivo	1

Abreviaturas: AR (artritis reumatoide), CA (carcinoma), CCL (colecistitis crónica litiásica), OAD (osteoartrosis degenerativa), DM (diabetes mellitus), HAS (hipertensión arterial sistémica), ICCV (insuficiencia cardíaca congestivo venosa), FOD (fiebre de origen desconocido), IRCT (insuficiencia renal crónica terminal), CBP (cirrosis biliar primaria), HIV (infección por virus de inmunodeficiencia humana), LAM (leucemia aguda mielógena), LEG (lupus eritematoso generalizado), TRDC (transplante renal de donador cadavérico), TRDVR (transplante renal de donador vivo relacionado), TIA (ataque isquémico transitorio), TFD (trastorno funcional digestivo).

Se excluyeron de esta tabla a los pacientes con infección por HIV o SIDA exclusivamente, sin asociación con otras patologías en ese momento.

describe brevemente el método empleado:

La placa de poliestireno se sensibilizó con BCG en dilución 1:3000 (100 microlitros) en amortiguador de bicarbonato; se incubó toda la noche a temperatura ambiente o bien por 3 hrs. a 37°C; se lavó con PBS-Tween-albúmina, se secó con papel absorbente y después se lavó una vez con PBS-Tween; las muestras de suero se diluyeron en PBS-Tween 80, inicialmente 1:10 y después 1:1000, 1:5000 y 1:25000; las placas selladas se incubaron en baño maría a 37°C por 90 minutos y se lavó con PBS-Tween 80 en 3 ocasiones; se agregaron 100 mcl. de conjugado por pozo, se incubó a 37°C por 90 minutos, se lavó en 3 ocasiones con PBS-Tween; se agregaron 100 mcl de sustrato por pozo (ortofenildietilanolamina), se incubó por 15 a 30 minutos y se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 0.5N; se leyó a 492 nm.

El punto de corte para cada ensayo y dilución se estableció mediante la siguiente fórmula: media de controles negativos + media de controles positivos/2.

Este ensayo detecta inmunoglobulinas totales (IgG, IgM e incluso IgA) en el suero de pacientes tuberculosos, dirigidas en contra de una mezcla de antígenos presentes en el extracto crudo de BCG.

VI. ANALISIS ESTADISTICO.

Con la información recabada se integró una base de datos capturada en el paquete FOXPRO. A partir de la información capturada y mediante el empleo del paquete estadístico SPSS/PC

versión 5.0.1. se procedió a obtener estadísticas de orden descriptivo, previa limpieza y validación de la base de datos.

La comparación de la positividad o negatividad a la serología por ELISA según diferentes diluciones (1:1000, 1:5000 y 1:25000) contra los distintos grupos o categorías (AI, AII, AIII...etc.) se realizó al través de la estadística de chi cuadrada de Pearson con corrección de Yates. El valor alfa establecido fue el convencional (0.05).

Para medir la validez en términos de sensibilidad y especificidad, así como el valor predictivo positivo y negativo de la serología con respecto a los grupos AI y AII (como estándar de oro), vs. el resto, se usaron las fórmulas conocidas. Dichos cálculos junto con los intervalos de confianza al 95% se establecieron mediante el empleo del paquete EPIDAT versión 1.0.

VII. RESULTADOS.

Tomando en cuenta el número de pruebas promedio realizadas mensualmente, que fueron 50 en el lapso de estudio, se puede afirmar que se revisó cerca de un 50% de pruebas en los 2 años. Se revisaron los expedientes de 528 pacientes divididos en 2 grupos: 164 del grupo de estudio (categorías AI a B) y 364 del grupo control constituido por enfermos con diferentes patologías, además de 49 sujetos control sanos. Los grupos estuvieron constituidos por el siguiente número de sujetos: AI con 7 pacientes, AII con 28, AIII con 78, AIV con 41, B con 10 (las especies de las micobacterias se describen en la tabla 2), el

grupo control de enfermos con otras patologías designado C, con 364, y el grupo de individuos sanos - D - con 49 (Figura 4). Se excluyó del análisis a un paciente por tener resultados disímolos en la serología. Tuvo 2 pruebas, una con título 1:25000 y otra con título de 1:1000, constituyendo el único caso de esta naturaleza. Pertenecía al grupo C y era un enfermo con SIDA.

De los 164 sujetos en las categorías de tuberculosis u otras micobacteriosis, 93 fueron hombres (56.7%) y 71 mujeres (43.3%). En el grupo C (enfermos con otras patologías) hubo 186 hombres (51.09%) y 178 mujeres (48.91%).

En cuanto a la distribución por edad de los grupos AI a B, 3 pacientes estaban entre los 15 y los 19 años, 31 entre los 20 y los 29, 40 entre los 30 y 39 años, 32 entre los 40 y 49, 23 entre los 50 y 59, 25 entre los 60 y 69, 7 entre los 70 y 79, 2 entre los 80 y 89 años y uno entre los 90 y 98 años, en tanto que en el grupo C se encontraron 23, 63, 95, 69, 54, 35, 20, 4 y uno, respectivamente. En el grupo D hubo 1, 31, 14, 3, 0, 0, 0, 0 y 0, respectivamente (Figura 5).

El antecedente de vacunación con BCG en los grupos AI a B fue negativo en 48 (29.3%) de dichos pacientes, se aplicó tal en 45 (27.4%) y desconocido en 71 (43.3%). El contacto con enfermos con tuberculosis fue negativo en 89 casos, positivo en 21 y desconocido en 54. El PPD fue positivo en 79 pacientes (57.7%), incluyendo a los 41 pacientes del grupo AIV, negativo en 58 (42.3%) y desconocido en 27. En el grupo C el antecedente de BCG fue negativo en 79 pacientes, positivo en 109 y desconocido en 176. El antecedente de contacto con enfermos con tuberculosis fue

ELISA EN EL DIAGNOSTICO DE TB.

DISTRIBUCION POR CATEGORIAS

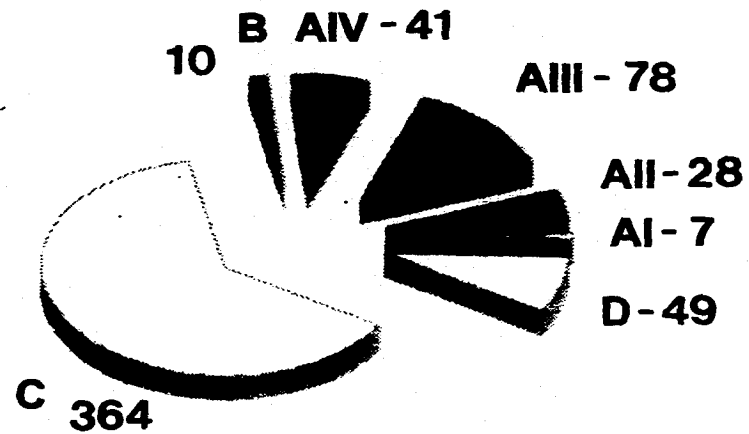


Figura 4

FIGURA 5
RELACION POR GRUPOS ETAREOS

■ **Pacientes (n=164)** ■ **Controles enfermos (n=364)** ■ **Controles sanos (n=49)**

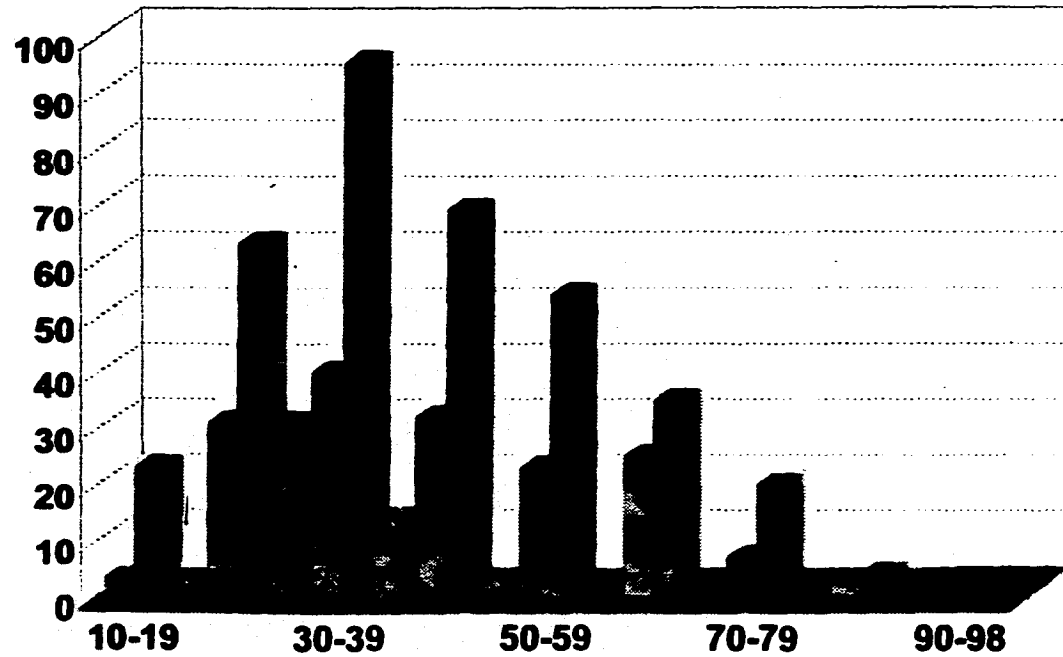
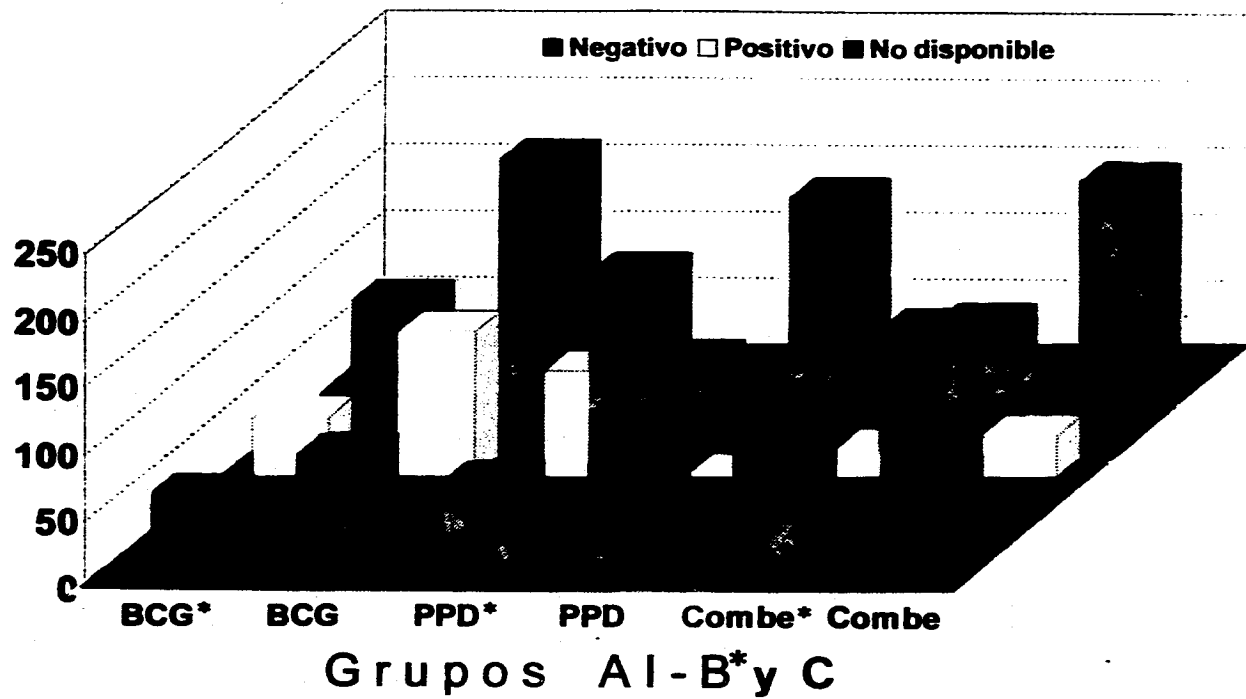


FIGURA 6
STATUS BCG, PPD y COMBE



negativo en 173 casos, positivo en 32 y desconocido en 159. Se aplicó PPD en 217, siendo negativo en 214 y positivo en 3 (Figura 6). Del grupo D 47 no tuvieron antecedente de contacto con pacientes con tuberculosis, en una fue positivo y se desconocía en una mujer; 45 recibieron vacuna con BCG y dos no.

Se incluyeron 37 pacientes con infección asintomática por VIH y a 39 con SIDA. Hubo un paciente con SIDA en el grupo AI, en el grupo AII, 2 seropositivos y 3 con SIDA; en el AIII, 2 seropositivos y 8 con SIDA, en el AIV 2 seropositivos, y en el B, un seropositivo y 3 con SIDA. En el grupo control se incluyeron los 54 sujetos con infección asintomática por VIH o SIDA restantes.

Cientoveintitrés pacientes presentaron manifestaciones clínicas de tuberculosis, de ellos, 47 con manifestaciones pulmonares y 76 con síntomas extrapulmonares.

Se recabaron los resultados de 539 pruebas en 528 pacientes. El resultado fue 1:1000 en 412 pruebas, 1:5000 en 28 y 1:25000 en 99.

Se efectuó posteriormente el análisis estadístico correlacionando el resultado de la prueba (negativo, título menor o igual a 1:1000 y positivo, título igual o mayor a 1:5000 o más) (Tabla 3).

En dicha tabla se presentan los resultados de las serologías por cada grupo, expresando para cada una de las columnas donde se apuntan los títulos, el número de pacientes que presentó dicha serología como la máxima dilución a la cual se obtuvo un resultado favorable. Es decir, como ejemplo puede citarse en la fila D (grupo de controles sanos), que el número total de sujetos

TABLA 3
Distribución de resultados por grupos

	n	MAXIMA DILUCION A LA QUE SE OBTUVO POSITIVIDAD				
		1:1000	1:5000	p^*_β	1:25000	p^*_β
AI	7	5	1			
AII	28	16	2	.08	10	.06
AIII	78	58	5		15	
AIV	41	29	3		9	
B	10	4	2		4	.09
C	363	293	14	---	56	---
D	49	10	2	NS	37	NS
Total	596	415	29		132	

* Vs. grupo control usando chi cuadrada con corrección de Yates

β No significativo para cada grupo por separado vs. el grupo control

NS no significativo al comparar vs. otros grupos

a quienes se efectuó la prueba fueron 49, 10 tuvieron un resultado positivo máximo a dilución 1:1000, 2 a dilución 1:5000 y 37 a dilución 1:25000. Esto quiere decir que estos últimos 37 también fueron positivos a diluciones 1:1000 y 1:5000, pero se consideró exclusivamente el máximo valor obtenido para el análisis e interpretación de resultados.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar grupos con un punto de corte 1:5000 únicamente entre el grupo control vs. el conjunto de categorías AI a B ($p=.08$). Cuando se empleó 1:25000 como punto de corte, se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y el conjunto de las categorías AI a AIV ($p=.06$) y entre el grupo control y el B por separado ($p=.09$).

No hubo diferencia significativa cuando se efectuó la comparación entre el grupo de controles sanos (D) vs. cada uno de los grupos por separado, ni al agrupar a las categorías AI más AII, AI a B, AI a AIV y comparar con los controles con otras patologías (infectados con VIH o bien los enfermos con cualquier micobacteriosis infectados con VIH).

Con respecto a la forma de presentación, la prueba no discriminó entre aquellos pacientes con tuberculosis con manifestaciones exclusivamente pulmonares y otros con manifestaciones extrapulmonares.

Se observó en forma global, sensibilidad que fue desde el 23.78% al comparar vs. el grupo control D, a una máxima de 40%, y especificidades del 20.4% al comparar los grupos AI a B vs. el control de individuos sanos - D -, hasta un 84.57% al comparar los grupos AI, AII y AIII vs. el grupo control C de individuos

enfermos. Estos resultados se presentan en la tablas 4 y 5.

En las mismas, se aprecian los resultados tomando en cuenta solamente a los pacientes con infección por virus de inmunodeficiencia humana (ya fuese asintomáticos o enfermos con SIDA) en ambos grupos, tanto control con otras patologías como enfermos con micobacteriosis, siendo los mejores resultados los hallados con punto de corte de 1:25000 al comparar a este último grupo vs. los controles enfermos (grupo C).

Al introducir en el análisis al grupo control de individuos sanos (D), hallamos resultados inesperados. Tanto la sensibilidad como la especificidad fueron muy bajas como se aprecia en las tablas.

VIII. DISCUSION.

Daniel ha expresado recientemente que en el caso del inmunodiagnóstico de tuberculosis, mayor importancia radica en la especificidad del ensayo que en la sensibilidad y para ello argumenta que es preferible tener un mayor valor predictivo positivo que permita que aquellos pacientes con un resultado positivo sean tratados eficazmente, y además que en ese intento otras condiciones patológicas que expliquen los hallazgos clínicos no se atribuyan erróneamente a enfermedad tuberculosa. Propone entonces que el estándar de oro en contra del cual se comparen las pruebas de inmunodiagnóstico en suero sea la visualización del germen en esputo (baciloscopia) (12).

Hasta el momento, algunos de estos requisitos se cumplen con el uso de diferentes antígenos purificados, con especificidad

TABLA 4
PUNTO DE CORTE 1:25000

GRUPOS	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	VALOR PREDICTIVO POSITIVO	VALOR PREDICTIVO NEGATIVO
AI + AII vs. C	31.4%	84.57%	16.4%	92.7%
AI + AII + AIII vs. C	24.39%	84.57%	34.88%	76.75%
AI a B vs. C	23.78%	84.57%	41.05%	71.06%
AI + AII vs. D	31.42%	24.48%	22.91%	33.33%
AI a B vs. D	27.27%	24.48%	13.95%	42.85%
HIV + más micobacteriosis vs. HIV + del grupo C	27.27%	74.07%	30%	71.42%
HIV + más micobacteriosis vs. grupo C	27.27%	84.57%	9.67%	95.04%
HIV + más micobacteriosis vs. grupo D	27.27%	24.48%	13.95%	42.85%

TABLA 5
PUNTO DE CORTE 1:5000

GRUPOS	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	VALOR PREDICTIVO POSITIVO	VALOR PREDICTIVO NEGATIVO
AI + AII vs. C	40%	80.71%	16.6%	93.3%
AI + AII + AIII vs. C	32.53%	80.71%	36.36%	77.92%
AI a B vs. C	31.7%	80.71%	46.42%	72.34%
AII + AIII vs. D	40%	20.4%	26.41%	32.25%
AI a B vs. D	31.7%	20.4%	57.14%	8.19%
HIV + más micobacteriosis vs. HIV + del grupo C	27.27%	70.37%	27.27%	70.37%
HIV + más micobacteriosis vs. grupo C	27.27%	80.71%	7.89%	94.82%
HIV + más micobacteriosis vs. grupo D	27.27%	20.4%	13.3%	38.46%

hasta del 100%, mientras que la sensibilidad va desde el 26% hasta el 100%. En dichos ensayos se miden niveles de IgG, como se muestra en la tabla 6 (13). Sin embargo, el uso de extractos crudos de micobacterias, en nuestro caso BCG, tiene resultados menos satisfactorios. Closs y colaboradores han mostrado la presencia de al menos 30 componentes antigénicos diferentes (14). En nuestro ensayo se detectan inmunoglobulinas en forma polivalente; ello hace suponer que los resultados de la prueba como apoyo diagnóstico son insatisfactorios.

Entre los diferentes antígenos utilizados para detectar anticuerpos en contra de micobacterias están los siguientes:

El antígeno 5 de M. tuberculosis el cual es una proteína bien caracterizada que se ha usado más que otras con fines diagnósticos. Sin embargo, parece que tampoco es una proteína específica de especie (5,15). Recientemente se observó en un estudio efectuado en un país subdesarrollado como Bolivia sensibilidad del 84% (16) y la especificidad fue similar a la reportada con el uso de extractos antigénicos crudos. Otro antígeno usado es el 6, éste parece ser de mayor utilidad en pacientes afectados por la micobacteria a nivel articular u óseo (17).

Otros antígenos usados son glicolípidos llamados SAG A1, B1 y C, con mejor sensibilidad para el glicolípido C y con especificidades similares para los tres. Sin embargo, existieron resultados falso positivos usando suero de pacientes lepromatosos (5). Otras técnicas usando anticuerpos monoclonales, en especial el denominado TB-C-1 y eluyendo posteriormente los antígenos por cromatografía de afinidad han dado resultados muy parecidos (18).

Tabla 6. Serología para el diagnóstico de tuberculosis.

Antígeno	Sensibilidad	Especificidad	Referencia
PPD	67 %	79 %	34
Crudo	56 %	98 %	35
Extracto*	70 %	75 %	datos no publicados
Antígeno 5	89 %	100 %	16
Antígeno de 30 kda*	70 %	100 %	36
Lipoarabinomanana*	72 %	92 %	37

* Estudios realizados en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Tomado de: Sifuentes J, Bobadilla del Valle M & Sada E: Métodos de diagnóstico en la tuberculosis. En: Tuberculosis. Temas de Medicina Interna 1995; 3: 889.

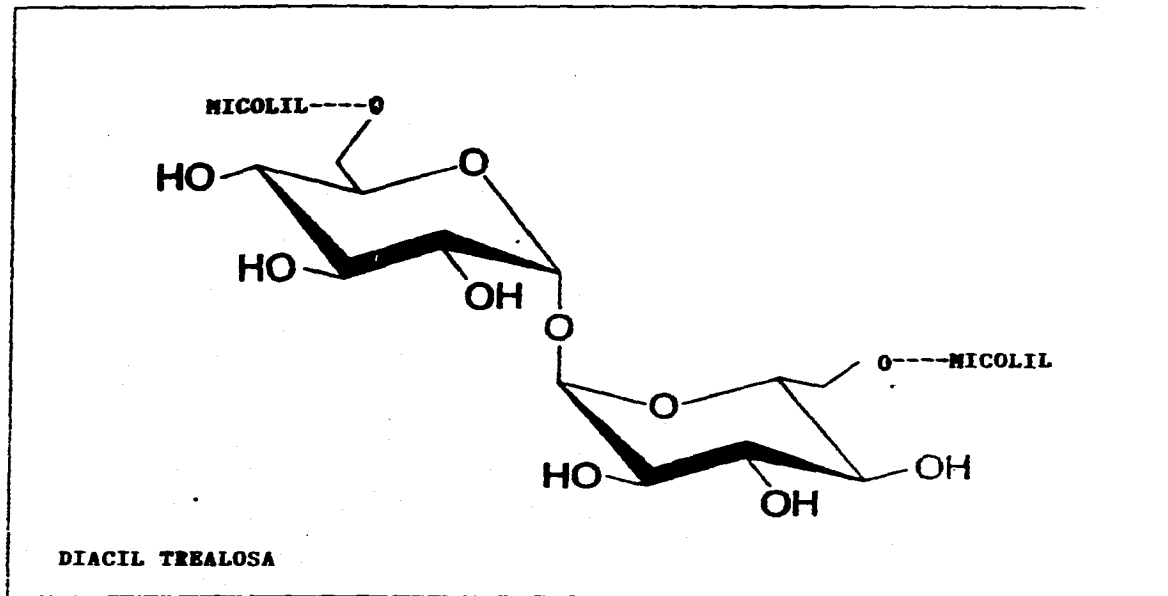
Se han utilizado otros antígenos como trealosa-6,6'-dimicolato (18,19) también conocido como "cord factor" (Figura 7), antígeno de 30,000 daltones (20,22) y antígeno A60 (22,23,24,25). Los resultados con estos antígenos en diversos procedimientos muestran sensibilidad que va desde el 19% para anticuerpos IgM contra extractos bacilares crudos, hasta 92.5%, y especificidad que va del 76.3 al 100% en otros estudios (5). Es de hacer notar que todos los estudios descritos, excepto el del antígeno 6, son en poblaciones con tuberculosis pulmonar, y los mejores datos son de pacientes con enfermedad activa.

El antígeno SL-IV (glicolípido o aciltrealosa) ha proporcionado resultados más prometedores en la identificación de casos de tuberculosis, dado que esta molécula es específica de M. tuberculosis, y altamente antigénico (26,27,28).

El caso de la meningitis tuberculosa es particularmente relevante, tanto por la mortalidad de la enfermedad, como a los grupos de población que afecta, especialmente el pediátrico. Si bien se requieren más estudios para definir la utilidad del serodiagnóstico en esta forma de enfermedad tuberculosa, parece ser que la utilidad de estos métodos es pobre (5). Los mejores resultados se han tenido con el uso del antígeno A60 (29).

En forma casi unánime, el uso de serología para diagnóstico de tuberculosis en los pacientes con VIH-SIDA no es de utilidad, puesto que los resultados son prácticamente similares a los de las poblaciones control que se han incluido en los diversos informes. Por ello, no es posible recomendar la determinación de anticuerpos contra M. tuberculosis en el diagnóstico de tuberculosis en pacientes con infección asintomática por VIH o

FIGURA 4



con SIDA que tengan síntomas atribuibles a patología tuberculosa (5,20,29).

La inmunización previa con BCG o el estado previo de reactor a PPD (PPD positivo), no se han encontrado como factores de riesgo para resultados falso positivos (3,24,25). La posibilidad de observar resultados falsos positivos atribuibles a vacunación previa con BCG es prácticamente nula, dado que los resultados de estudios previos lo descarta (25). Además, nuestros datos muestran, en el grupo de individuos vacunados previamente, un 22% de positivos (con punto de corte 1:5000) y un 78% de negativos, y en el grupo de sujetos sin vacunar un 19% de positivos y un 81% de negativos.

Nuestro ensayo detecta inmunoglobulinas en forma polivalente, lo que probablemente limita la sensibilidad del mismo, dado que los resultados de otros estudios indican la respuesta presente con inmunoglobulina del tipo G. Posiblemente nuestros resultados podrían mejorar al detectar solamente IgG. A pesar de ello, la sensibilidad y la especificidad de nuestros resultados, están dentro del rango de los reportados en la literatura; aún cuando se toma en cuenta los resultados de la comparación con el grupo D, en el cual obtuvimos resultados pobres (5).

Encontramos resultados significativos con el punto de corte 1:5000, sólo al comparar el grupo control C con el resto de los grupos, incluso con los sujetos con infección tuberculosa asintomáticas (PPD positivos). Sin embargo, al excluir los pacientes del grupo B el resultado es no significativo ($p=.08$ vs 0.17). Al elevar el punto de corte a 1:25000, se obtuvo un

resultado con valor significativo entre el grupo control y los grupos AI a AIV. También se observó diferencia significativa entre el grupo control y el grupo de pacientes con infecciones por micobacterias distintas a M. tuberculosis.

Estos resultados son paradójicos, es decir, al parecer el ensayo utilizado en la actualidad parece ser de mayor utilidad cuando se aplicó a pacientes con otras micobacteriosis. La explicación para este fenómeno puede atribuirse a la detección de anticuerpos dirigidos contra antígenos presentes tanto en la cepa de BCG como en las micobacterias diferentes a M. tuberculosis aisladas en nuestra población. Si bien esto puede ser cierto, no satisface de forma adecuada la pregunta, dado que existe similitud antigénica entre M. tuberculosis y la cepa de BCG, por lo que esperaríamos que esto hubiese sido consistente con mayor número de resultados positivos en el grupo AI (tuberculosis definitiva). Además, las especies de micobacterias aisladas en algunos casos no corresponden a las que se encuentran en el complejo tuberculosis, como son microti o africanum, de hecho, taxonómicamente se encuentran alejadas del complejo (31).

En relación a la utilidad de la prueba en sujetos con inmunosupresión, encontramos resultados semejantes a aquellos descritos previamente en la literatura. Esto es, la prueba no ayuda en el diagnóstico de tuberculosis en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana, es decir en pacientes con coinfección por aquel y por M. tuberculosis. Lo mismo se apreció cuando se revisó esta información en el grupo B, esto es, el estar infectado por HIV y por micobacterias diferentes a M. tuberculosis, la prueba no ayudó a discriminar

si las manifestaciones clínicas fueron atribuibles a micobacterias en estos pacientes, dado que un si bien un resultado positivo en la serología en este grupo (B), apoya la posibilidad de que las manifestaciones clínicas sean al menos en parte, causadas por micobacterias, en pacientes con infección por VIH esto no puede aseverarse.

Los resultados de este estudio no muestran diferencias significativas entre los resultados de los pacientes con manifestaciones pulmonares en comparación con aquellos con manifestaciones extrapulmonares. De esta manera, puede decirse que la prueba tenga gran utilidad en los pacientes con manifestaciones extrapulmonares.

El cultivo es aún el estándar de oro en el diagnóstico de la tuberculosis. Con frecuencia existe demora para obtener esta información, lo cual en ocasiones demanda inicio del tratamiento en forma empírica, basándose en los hallazgos clínicos. La identificación de la micobacteria en secreciones de los pacientes infectados, o bien en muestras de tejidos, es un apoyo importante, pero se requiere una concentración no despreciable de bacilos (32), además de experiencia para la lectura.

El desarrollo de técnicas de Biología Molecular permitiría en teoría la detección en especímenes clínicos de material genético propio de M. tuberculosis en forma relativamente sencilla y rápida, evitando así la necesidad de una espera prolongada para apoyar el diagnóstico de esta entidad (13,32). La amplificación de señales de DNA, como la amplificación de DNA ramificado que consiste en el empleo de un oligonucleótido bifuncional con una secuencia específica del DNA blanco y otro

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

más ramificado que tiene sitios de unión a un tercer oligo marcado con fosfatasa alcalina que produce una señal; la amplificación de la señal Q β en donde el DNA blanco es mezclado con un oligo bifuncional de captura (que tiene una secuencia que se une al DNA blanco) y un replicón Q β , el cual se recupera y amplifica, y los sistemas que utilizan micobacteriófagos a los cuales se les ha agregado el gene que codifica para la enzima luciferasa que actúa oxidando a la luciferina en una reacción dependiente de ATP lo que produce una luz que se puede detectar en muestras donde el número de micobacterias va de 500 a 5000, sobre todo en las fases de crecimiento de la micobacteria.

Asimismo, otras técnicas como la reacción de polimerasa en cadena (PCR), que consiste en la amplificación *in vitro* de un fragmento de DNA, generando varios millones de copias del original y en cuyo procedimiento se requiere la separación de la doble cadena de DNA blanco mediante denaturalización por calor, su incubación con dos oligonucleótidos análogos que se alinean al DNA blanco y finalmente su polimerización por medio de Taq polimerasa, permite la identificación de secuencias de DNA a partir de números relativamente pequeños de micobacterias en muestras clínicas, tiene una sensibilidad y especificidad cercana al 100%. Varios genes de *M. tuberculosis* se han usado, pero su práctica cotidiana en la clínica es aún lejana por razones tales como dificultad en la interpretación clínica y costos.

La amplificación de RNA es otro procedimiento que se fundamenta en ampliar RNA ribosomal blanco por medio de una RNA polimerasa, llegando a amplificar hasta un billón de veces el blanco y la amplificación de la reacción de ligasa en cadena,

ensayo específico que se basa en la homología de la hibridización de los oligos al DNA blanco, son otros métodos que también requieren poco tiempo y una mínima cantidad de bacilos presentes en las muestras. Estos métodos al poderse aplicar en forma cotidiana, desplazarían de manera clara la necesidad de uso de técnicas menos específicas, como la que nos ocupa; sin embargo, su costo por ahora es limitante, además de la accesibilidad como prueba de tamizaje en grandes poblaciones y su aplicación en el laboratorio clínico (32). Mientras aún se requiere de una prueba sobre todo suficientemente sensible para su aplicación a poblaciones donde la prevalencia e incidencia de la tuberculosis reviste importancia capital y constituye un problema de salud global.

Sería por ello deseable contar con una prueba serológica que tuviese una mayor especificidad, incrementando por ende su valor predictivo positivo. En el caso contrario, una prueba negativa permitiría su uso en poblaciones seleccionadas donde sería importante la exclusión de la enfermedad; de esta manera, sería inaceptable una prueba falso negativa y sería indispensable una prueba con una alta sensibilidad. Daniel et al (33) en un estudio llevado al cabo en Bolivia, una nación con características semejantes a las encontradas en el nuestro, con una alta prevalencia de tuberculosis, demostró la posibilidad de efectuar una prueba en grupos grandes de población, aunque con resultados de sensibilidad claramente mayores que nuestro ensayo, y utilizando antígenos purificados a partir de su adsorción con el anticuerpo monoclonal TB-C-1. En este estudio se concluye que la serología empleada puede ser de ayuda, cuando se usa en conjunto

con la baciloscopia en expectoración, en el diagnóstico de tuberculosis en poblaciones con prevalencia elevada.

En nuestro caso, sería deseable incrementar la sensibilidad de la prueba y esto podría lograrse al evaluar otros antígenos empleados en el método. Evidentemente, esto requiere de una nueva estandarización y sería deseable también su comparación con otras pruebas de uso rutinario en la ruta diagnóstica de la tuberculosis.

IX. CONCLUSION.

El uso de ELISA con los antígenos utilizados (extracto crudo de BCG), no es recomendable como apoyo diagnóstico de tuberculosis en el INNSZ, por su sensibilidad baja y su especificidad limitada.

X. REFERENCIAS.

1. Rom WN & Zhang Y: The rising tide of tuberculosis and the human host response to Mycobacterium tuberculosis. J Lab Clin Med 1993; 121: 737-41.
2. Woods GL & Washington II JA: Mycobacteria other than Mycobacterium tuberculosis: review of microbiologic and clinical aspects. Rev Infect Dis 1987; 9: 275-275-95.
3. Valero G, Peters J, Jorgensen JH et al: Clinical isolates of Mycobacterium simiae in San Antonio, Texas. Am J Respir Crit Care Med 1995; 152: 1555-7.

4. Wolinsky E: Coventional diagnostic methods for tuberculosis. Clin Infect Dis 1994; 396-401.
5. Daniel TM & Debanne SM: The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. Am Rev Respir Dis 1987; 135: 1137-51.
6. Kiran U, Shriniwas, Kumar R, Sharma A: Efficacy of three mycobacterial antigens in the serodiagnosis of tuberculosis. Eur J Respir Dis 1985; 66: 187-95.
7. Daniel TM & Janicki BW: Mycobacterial antigens: a review of their isolation, chemistry, and immunological properties. Microbiol Rev 1978; 42: 84-113.
8. Goren MB: Immunoreactive substances of mycobacteria. Am Rev Resp Dis 1982; 125: 50-67.
9. McNeil MR, Besra GS, Brennan PJ: Chemistry of the mycobacterial cell wall. En: Tuberculosis. 1a. edición. Rom W & Garay SM, editores. Ed. Little, Brown & Co. Boston, EUA. 1996. Pp: 171-85.
10. Dunlap NE & Briles DE: Immunology of tuberculosis. Med Clin North Am 1993; 77: 1235-51.
11. Lee BY & Horwitz MA: Identification of macrophage and stress-induced proteins of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Invest 1995; 96: 245-9.
12. Daniel TM: Immunodiagnosis of tuberculosis. En: Tuberculosis. 1a. edición. Rom W & Garay SM, editores. Ed. Little, Brown & Co. Boston, EUA. 1996. Pp.: 223-31.
13. Sifuentes J, Bobadilla del Valle M & Sada E: Métodos de diagnóstico en la tuberculosis. En: Tuberculosis. Temas de Medicina Interna 1995; 3: 889.

14. Closs O, Harboe M, Axelsen NH et al: The antigens of Mycobacterium bovis, strain BCG, studied by crossed immunoelectrophoresis: a reference system. Scand J Immunol 1980; 12: 249-63.
15. Ma Y, Wang YM, Daniel TM: Enzyme-linked immunosorbent assay using Mycobacterium tuberculosis antigen 5 for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in China. Am Rev Respir Dis 1986; 134: 1273-5.
16. Benjamin RG & Daniel TM: Serodiagnosis of tuberculosis using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of antibody to Mycobacterium tuberculosis antigen 5. Am Rev Respir Dis 1982; 126: 1013-6.
17. Lau JHK, Leong JCY, Stroebel AB: A longitudinal study of antibody titres to antigen 6 in patients with bone and joint tuberculosis. Int Orthop 1983; 7: 205-8.
18. He H, Oka S, Han YK et al: Rapid serodiagnosis of human mycobacteriosis by ELISA using cord factor (trehalose-6,6'-dimycolate) purified from Mycobacterium tuberculosis as antigen. FEMS Microbiol Immunol 1991; 3: 201-4.
19. Maekura R, Nakagawa M, Nakamura Y et al: Clinical evaluation of rapid serodiagnosis of pulmonary tuberculosis by ELISA with cord factor (trehalose-6,6'-dimycolate) as antigen purified from Mycobacterium tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1993; 148: 997-1001.
20. Daniel TM, Sippola AA, Okwera A et al: Reduced sensitivity of tuberculosis serodiagnosis in patients with AIDS in Uganda. Tuber Lung Dis 1994; 75: 33-7.
21. Mc Donough JA, Sada DE, Sippola AA et al: Microplate and dot

- immunoassays for the serodiagnosis of tuberculosis. *J Lab Clin Med* 1992; 120: 318-22.
22. Verbon A, Weverling GJ, Kuijper S et al: Evaluation of different tests for the serodiagnosis of tuberculosis and the use of likelihood ratios in serology. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 378-84.
23. Wang HC, Lu JY, Liang L et al: Evaluation of the potential role of enzyme-linked immunosorbent assay in serodiagnosis of tuberculosis. *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih (Taipei)* 1993; 52: 9-14.
24. Querol JM, Oltra C, Granda D et al: Utilidad de la determinación de IgG e IgM frente al antígeno 60 para el diagnóstico de la tuberculosis torácica. *An Med Interna (España)* 1993; 271-4.
25. Qadri SM & Smith KK: Nonspecificity of the Anda A60-Tb ELISA test for serodiagnosis of mycobacterial disease. *Can J Microbiol* 1992; 38: 804-6.
26. Laszlo A, Baer HH, Goren MB et al: Evaluation of the synthetic pseudo cord-factor-like glycolipids for the serodiagnosis of tuberculosis. *Res Microbiol* 1992; 143: 217-23.
27. Sempere M, Ariza M, Sánchez-Montán T et al: Evaluación de aciltrealosas de *Mycobacterium fortuitum* en el diagnóstico serológico de tuberculosis pulmonar. *Enferm Infecc Microbiol Clin (España)* 1995; 13: 292-6.
28. Hou W, Wu Q, Zhang P: Evaluation of two glycolipids from *M. tuberculosis* in the serodiagnosis of tuberculosis. *Chung Kuo I Hsueh Yuan Hsueh Pao (China)* 1994; 16: 374-7.

29. Zou YL, Zhang JD, Chen MH et al: Serological analysis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis with enzyme-linked immunosorbent assays for anti-60 immunoglobulins. Clin Infect Dis 1994; 19: 1084-91.
30. Morishita M, Magaki K, Kato H et al: Recent advances in immunological diagnosis for tuberculosis. Kekkaku (Japan) 1994; 69: 97-106.
31. Wayne LG: Microbiology of tubercle bacilli. Am Rev Resp Dis 1982; 125: 31-41.
32. Shinnick TM & Good RC: Diagnostic mycobacteriology laboratory practices. Clin Infect Dis 1995; 21: 291-9.
33. 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 1986; 134: 662-5.
34. Nassau E, Parson ER, Johnson GD: The detection of antibodies to M. tuberculosis by microplates enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Tubercle 1976; 57: 67.
35. Kalish SB, Radin R, Phair JP et al: Use of an enzyme linked immunosorbent assay technique in the differential diagnosis of active pulmonary tuberculosis in adults. J Infect Dis 1983; 147: 523.
36. Sada E, Ferguson L, Daniel T: An ELISA for serodiagnosis of tuberculosis using the 30,000 D native antigen of M. tuberculosis. J Infect Dis 1990; 162: 928.
37. Sada E, Brennan P, Herrera T et al: Evaluation of lipoarabinomannan for the serological diagnosis of tuberculosis. J Clin Microbiol 1990; 30: 214.