



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**INMUNOELECTROTRANSFERENCIA, ELISA ANTI-LÍPIDO 4MT
Y ELISA LIPOSOMAL
COMO HERRAMIENTAS DE APOYO PARA EL DIAGNÓSTICO DE
TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MARÍA CONCEPCIÓN SÁNCHEZ GARCÍA

ASESORES:

Q. F. B. SILVIA GONZÁLEZ MATEOS

Dr. MARCO ANTONIO VEGA LÓPEZ

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología Aplicada del
Departamento de Investigaciones Inmunológicas
del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE, Ssa) bajo la
asesoría de la QFB. Silvia González Mateos

Este trabajo está dedicado a mis seres queridos,
a los cuales amo y agradezco mucho:

MIS PADRES

Álvaro Sánchez León† y Laura García Sanabria

MIS HERMANOS

MIS SOBRINOS

MIS FAMILIARES

MIS AMIGAS

DE AYER, DE HOY Y DE SIEMPRE

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a *Dios*, a la *Virgen* y a la *Vida* lo que soy, lo que tengo y lo que estoy viviendo.

A *mi Madre y a mi Padre*[†] por su amor, apoyo, confianza y por todo su esfuerzo para que yo pudiera realizar mis estudios y concluir este trabajo. Por guiarme y ayudarme a llegar a la línea de salida, que me llevará hacia nuevas metas. ¡Eternamente Gracias!

A todos mis *Hermanos* por creer en mí y apoyarme en mis decisiones, eso me ha dado fuerza para seguir siempre adelante. De manera especial, a *mis hermanas* por ser mis cómplices y por ayudarme a realizar este y muchos otros sueños. ¡Gracias por su generosidad y fortaleza!

A la *Universidad Nacional Autónoma de México* y a mi querida *FES Cuautitlán C-1*, por darme la oportunidad de formar parte de ella y de realizar la Licenciatura.

A mis *Profesores*, por ser mis guías y formadores.

A mis *Amigos y compañeros* de la FES-Cuautitlán, especialmente a la generación 26, por su apoyo durante la carrera y por los momentos compartidos.

A mí asesora de Tesis la *QFB. Silvia González Mateos*, un profundo agradecimiento por darme la oportunidad de trabajar en su Laboratorio, por su confianza, apoyo y enseñanza. Sobre todo por su tiempo y dedicación, por sus aportaciones y sugerencias a este trabajo, que fueron fundamentales para su desarrollo. Y Una sincera admiración por ser una persona generosa y con gran calidad humana.

A mí asesor el *Dr. Marco Antonio Vega López*, por su atención y tiempo para revisar este trabajo así como por las oportunas sugerencias y comentarios hechos para corregirlo y mejorarlo. ¡Gracias por ser tan dedicado y comprometido con su trabajo!

Al *Dr. Alejandro Escobar Gutiérrez*, jefe del Departamento de Investigaciones Inmunológicas por su confianza, apoyo y sobre todo por compartir sus conocimientos.

¡Lo admiro Doc!

A la *Tec. Lupita Torres Gómez* y al *Biol. Sergio Pastén*, por su valiosa colaboración en la realización de este trabajo. ¡Gracias por su apoyo y entusiasmo!

A la *QFB. Raquel Escobar*, al *M en C Fernando Cázares*, al *Dr. Sigifredo Pedraza*, al *Dr. Salvador Fonseca*, a todos mis *compañeros y amigos* con quienes conviví en el InDRE.

¡Gracias por su apoyo!

Al *Dr. Miguel Ibáñez Hernández* del Laboratorio de Biomembranas del departamento de Bioquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, por su confianza y ayuda. ¡Gracias!

A quienes son mis *sinodales de Tesis*, por sus observaciones realizadas para mejorar este trabajo: MVZ. Gerardo Cruz Jiménez, Dr. Marco Antonio Vega López, Dr. Víctor Zendejas Buitrón, MVZ. Ángel Germán Martínez Sosa y QFB. Leticia Badillo Solís. ¡Muchas Gracias!

MCSG

ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice general	i
Índice de figuras	iii
Índice de tablas	iv
Abreviaturas	v
Resumen	viii
Marco teórico	1
1. Tuberculosis	1
2. Generalidades epidemiológicas	1
3. Características de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3
3.1 Propiedades biológicas	4
3.2 Pruebas bioquímicas para identificar a <i>M. tuberculosis</i>	5
3.3 Características de la envoltura	6
3.3.1 Factor cuerda	8
4. Transmisión	9
5. Patogenia	10
5.1 Componentes glicosilados de <i>M. tuberculosis</i> y su relación con la patogenia de la tuberculosis	12
6. Mecanismos inmunológicos involucrados en la tuberculosis	14
6.1 Respuesta inmunológica celular	16
6.1.1 Hipersensibilidad tipo IV o retardada	16
Hipersensibilidad de tipo tuberculínico	17
Hipersensibilidad granulomatosa	19
6.1.2 Presentación de antígenos lipídicos por CD1	20
6.2 Respuesta inmunológica humoral	21
6.2.1 La presencia de anticuerpos en la tuberculosis	22
6.2.2 Heterogénea respuesta de anticuerpos en tuberculosis	23
6.2.3 El nivel de anticuerpos y su relación con...	25
7 Enfermedad tuberculosa	26
7.1 Factores de riesgo	28
8. Métodos de diagnóstico	30
8.1 Diagnóstico directo	30
Baciloscopía	30
Cultivo	31
PCR	32
8.2 Diagnóstico indirecto	33
Medición de Adenosina desaminasa (ADA)	33
8.2.1 Métodos inmunológicos de tipo celular	33
Pruebas cutáneas	33
8.2.2 Métodos inmunológicos de tipo humoral	35
Prueba inmunocromatográfica	37
Inmunoelectrotransferencia (IET)	37
ELISA	39
8.3 ELISA como prueba diagnóstica en TB extrapulmonar	39

9	Aspectos importantes de las pruebas serológicas	41
9.1	Ventajas de las pruebas serológicas en el diagnóstico	41
9.2	Desventajas de la serología en el diagnóstico	42
10	Soluciones para elevar la calidad de los antígenos utilizados	43
10.1	Anticuerpos monoclonales (AcMo)	43
10.2	Liposomas	44
	Asociaciones moleculares lipídicas diferentes a la bicapa	45
10.3	La fracción 4MT	47
	Justificación e Hipótesis	48
	Objetivos	49
	Material y métodos	50
	Población de estudio	50
	Métodos	51
	a) Diseño de la investigación	51
	b) Diseño experimental	52
	c) Procedimiento experimental	53
	d) Procedimiento estadístico	61
	Resultados	62
	Estimación de la calidad diagnóstica de las técnicas empleadas	64
	Discusión	70
	Conclusiones	77
	Anexos	79
	Anexo 1	79
	Anexo 2	82
	Anexo 3	86
	Anexo 4	87
	Anexo 5	88
	Anexo 6	99
	Referencias	100
	Referencias en orden de aparición	100
	Referencias en orden alfabético	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1.	Bacilo de <i>M. tuberculosis</i> .	3
Figura 2.	Aspecto de <i>M. tuberculosis</i> por tinción de Ziehl Neelsen.	4
Figura 3.	Microscopía electrónica de transmisión de <i>M. tuberculosis</i> .	6
Figura 4.	Representación esquemática de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i> .	7
Figura 5.	Representación de un liposoma.	44
Figura 6.	Clasificación de los fosfolípidos y glicolípidos con base a su forma molecular.	45
Figura 7.	Electroforesis en geles de poliacrilamida al 18% y glicerol al 1% con extracto soluble de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra (ESMTB).	88
Figura 8.	Curva estándar de marcadores de bajo peso molecular.	89
Figura 9.	Resultados de Inmunolectrotransferencia en sujetos sanos.	62
Figura 10.	Resultados de Inmunolectrotransferencia en verdaderos casos de TBEP confirmada por cultivo.	63
Figura 11.	Resultados de Inmunolectrotransferencia en los casos con baciloscopía confirmada.	90
Figura 12.	Resultados de Inmunolectrotransferencia en casos con baciloscopía confirmada / sospecha clínica de TBEP.	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
Tabla. 1	Pruebas bioquímicas para <i>M. tuberculosis</i>	5
Tabla. 2	Moléculas de origen lipídico de <i>M. tuberculosis</i> asociadas con la patogenia de la tuberculosis.	13
Tabla. 3	Clasificación de casos tuberculosos de acuerdo con la localización de la enfermedad.	26
Tabla. 4	Tipos de TBEP y características que incluyen al diagnóstico.	27
Tabla. 5	Algunos antígenos empleados en el diagnóstico serológico de TB.	36
Tablas de resultados		
Tabla. 6	Marcadores de bajo peso molecular preteñidos.	88
Tabla. 7	Datos para la curva estándar.	89
Tabla. 8	Resumen de los resultados de las pruebas realizadas al grupo testigo negativo.	62
Tabla. 8-A	Resultado en extenso de pruebas realizadas al grupo testigo negativo.	91
Tabla. 9	Resultado de pruebas realizadas a verdaderos casos de TBEP confirmados por cultivo.	63
Tabla. 10	Tabla de contingencia para el cálculo de los parámetros operativos del ELISA liposomal.	64
Tabla. 11	Tabla de contingencia para el cálculo de los parámetros operativos del ELISA anti-lípido 4MT.	64
Tabla. 12	Tabla de contingencia para el cálculo de los parámetros operativos de la Inmunoelectrotransferencia.	64
Tabla. 13	Resultados de las pruebas realizadas a casos con baciloscopía confirmada.	65
Tabla. 14	Porcentaje de positividad de las pruebas realizadas al grupo con sospecha clínica de TBEP.	66
Tabla. 14-A	Resultados en extenso del grupo diagnosticado clínicamente como TBEP.	93
Tabla. 15	Relación entre las densidades ópticas del ELISA liposomal y el resultado de IET.	66
Tabla. 16	Porcentaje de positividad de las técnicas para cada uno de los grupos estudiados.	67
Tabla. 17	Parámetros operativos obtenidos de las técnicas a evaluar en los tres grupos.	68
Tabla. 18	Resumen de porcentajes de positividad de las pruebas aplicadas a los casos de TBEP agrupados según la localización de la enfermedad.	69

ABREVIATURAS

ADA	Adenosina desaminasa
AG	Arabinogalactano
APC	Del inglés <i>antigen presenting cells</i> Célula(s) presentadora(s) de antígeno
BAAR	Bacilos Ácido Alcohol Resistentes
BCG	Bacilo de Calmette y Güerin
BSA	Albúmina sérica bovina
CENAVECE	Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades
DAB	Diaminobencidina
ELISA	Del inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> . Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
ELISA ANTI-LIPIDO 4MT	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas utilizando la fracción 4MT de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> como antígeno
ELISA-BCG	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas utilizando extracto soluble de <i>Mycobacterium bovis</i> cepa BCG como antígeno
ELISA-LIPOSOMAL	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas utilizando liposomas constituidos de fosfatidilcolina y fracción 4MT como antígeno
ESMTB	Extracto soluble de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Fracción 4MT	Extracto lipídico de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra con peso molecular cercano a 4 kDa.
GM-CSF	Factor estimulante de las colonias de macrófagos y granulocitos
Gp	Glicoproteína

HLA	Antígeno leucocitario humano
HR	Hipersensibilidad retardada
Hsp	Del inglés <i>Heat shock protein</i> Proteína de choque térmico
IET	Inmunoelectrotransferencia
IFN- γ	Interferón $-\gamma$
IL	Interleucina
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
INH	Isoniacida
iNOS	Oxido nítrico sintasa inducible
kDa	Kilodalton
LAM	Lipoarabinomanana
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LPC-4MT	Liposomas constituidos de fosfatidilcolina y la fracción 4MT.
mAGP	ácidos micólicos-arabinogalactano- peptidoglicano
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1
MDGF	Factor de crecimiento derivado de macrófagos
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MPM	Marcadores de peso molecular
NK	Células “asesinas naturales”
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PG	Peptidoglicano
PGE2	Prostaglandina E2
PKT	Proteín cinasa C
PMN	Polimorfonucleares

PPD	Derivado proteínico purificado
PZA	Pirazinamida
Rf	Relación de frentes de corrimiento
ROI	Intermediarios reactivos de oxígeno
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
T- $\alpha\beta$	Linfocitos T $\alpha\beta$
T- $\gamma\delta$	Linfocitos T $\gamma\delta$
TB	Tuberculosis
TBEP	Tuberculosis extrapulmonar
TBP	Tuberculosis pulmonar
TFN	Tasa de falsos negativos
TFP	Tasa de falsos positivos
TGF- β	Factor de crecimiento transformante- β
TNF	Factor de necrosis tumoral
UT	Unidades de tuberculina
VC	Valor de corte
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VPN	Valor predictivo de negatividad
VPP	Valor predictivo de positividad

RESUMEN

El diagnóstico clínico de casos de tuberculosis extrapulmonar es complejo y de difícil confirmación bacteriológica, por lo que el objetivo de este estudio fue la evaluación de las técnicas serológicas: Inmunoelectrotransferencia, ELISA anti-lípido 4MT y ELISA liposomal para ser utilizadas como herramientas de apoyo en el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar. Dado que el uso del antígeno 4MT como marcador serológico de enfermedad en casos pulmonares fue muy útil, se buscó determinar si lo era para la población con tuberculosis extrapulmonar. Se utilizó como antígeno un extracto soluble de *M. tuberculosis* cepa H37Ra en Inmunoelectrotransferencia, la fracción lipídica 4MT disuelta en etanol para el ELISA anti-lípido 4MT y en ELISA liposomal esta misma fracción asociada a fosfatidilcolina en liposomas.

La respuesta inmunitaria humoral se determinó mediante el reconocimiento de los anticuerpos IgG en 73 sueros de sujetos sanos provenientes de un banco de sangre y 194 sueros de pacientes con diagnóstico clínico de tuberculosis extrapulmonar. Estos últimos fueron clasificados en 8 grupos de acuerdo a la localización anatómica de la enfermedad. Para realizar la evaluación de las técnicas se calculó sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo, tasas de falsos positivos y falsos negativos así como el Índice de Youden, considerando principalmente a 16 pacientes con cultivo positivo confirmado.

Los resultados mostraron que por ELISA liposomal se obtuvo una sensibilidad de 87.5% y especificidad 94.52%. Para ELISA anti-lípido 4MT, la sensibilidad fue 56.25% y la especificidad 72.60%, mientras que para la Inmunoelectrotransferencia la sensibilidad y especificidad fue 18.75% y 100% respectivamente. El ELISA liposomal obtuvo los mejores parámetros operativos, por lo que se concluyó que podría utilizarse como herramienta en el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar aprovechando que el arreglo del antígeno lipídico 4MT en liposomas a nivel molecular mejora el reconocimiento antígeno-anticuerpo.

MARCO TEÓRICO

1. TUBERCULOSIS

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa, generalmente crónica, causada por un grupo de bacterias del orden Actinomicetales (bacterias con forma de hongos) de la familia *Mycobacteriaceae*; el complejo *Mycobacterium tuberculosis* se compone por: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. canetti*, y se adquiere por vía aérea principalmente. Es una enfermedad sistémica que afecta mayoritariamente al aparato respiratorio¹. La tuberculosis puede involucrar cualquier órgano del cuerpo. El término tuberculosis extrapulmonar (TBEP) se utiliza para referirse a la tuberculosis que ocurre en un sitio diferente al pulmón². *Mycobacterium tuberculosis* es el principal agente causal de TB en humanos y su temprana detección en muestras clínicas es cada vez más importante para el control de la tuberculosis, el tratamiento clínico de personas infectadas y la identificación de sujetos expuestos³.

2. GENERALIDADES EPIDEMIOLÓGICAS

La tuberculosis es una de las enfermedades más antiguas en el mundo que aqueja al ser humano. A 125 años del descubrimiento del *Mycobacterium tuberculosis* por Robert Koch y a más de cincuenta de la aparición del primer fármaco antituberculoso (estreptomocina), aún en nuestros días, sigue siendo un problema de salud difícil de resolver debido al incremento en su incidencia y a la aparición de cepas resistentes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) informó que, a nivel mundial, un tercio de la población se encuentra infectada por la bacteria. Se estima que anualmente ocurren 10 millones de casos nuevos y se registran 2 millones de defunciones⁴. De 23 países que generan 80% del total de casos nuevos de TB, en 5 de ellos (Bangladesh, China, India, Indonesia, y Nigeria) se concentran más de la mitad de estos casos⁵.

De acuerdo al Informe Global 2005 de la OMS, la tasa de incidencia de TB pulmonar en México fue de 17 por 100,000 y la mortalidad por TB descendió de 6.5 a 3.2 por 100,000 habitantes⁶. Salud México señaló que el Estado de México y Guanajuato presentan las menores tasas de esta enfermedad, mientras que Veracruz, Baja California, Guerrero, Chiapas, Tamaulipas y Nuevo León son las entidades de mayor incidencia⁷. Aunque en el país, el número real de infecciones extrapulmonares es desconocido, dentro del escenario de una investigación fue revelado que de los casos de tuberculosis, aproximadamente 30% son extrapulmonares⁸.

No obstante el predominio de la tuberculosis pulmonar sobre la tuberculosis extrapulmonar, la incidencia de esta última está aumentando, sobre todo en grupos de riesgo como los VIH seropositivos^{9,10}. *Mycobacterium tuberculosis* afecta a los pacientes infectados por VIH en etapas tempranas (CD4 promedio: 354/mm³), convirtiéndose en un problema de salud pública debido a la resistencia del microorganismo causal a diferentes fármacos antituberculosos y al aumento de la presentación extrapulmonar¹¹. Además, la tuberculosis es una de las principales infecciones secundarias en individuos VIH positivos¹².

Estudios epidemiológicos moleculares realizados en San Francisco, indican que la TBEP (excepto TB pleural) se presenta con mayor frecuencia en mujeres, personas jóvenes (25 - 44 años) e inmigrantes¹³. En áreas altamente endémicas, la primoinfección micobacteriana usualmente ocurre en la infancia y aún cuando sea controlada exitosamente por el sistema inmunológico, algunos bacilos permanecen en estado latente por el resto de la vida de los individuos¹⁴. En México, para registros epidemiológicos según la NOM-006-SSA2-1993, la confirmación de la presencia de *M. tuberculosis* se lleva a cabo por bacteriología, principalmente por baciloscopía o cultivo, mediante cultivo de biopsias, fluidos o secreciones de órganos de pacientes con manifestaciones clínicas, radiológicas y datos epidemiológicos compatibles con la enfermedad¹.

3. CARACTERÍSTICAS DE *Mycobacterium tuberculosis*

El bacilo *M. tuberculosis* forma parte del complejo *Mycobacterium tuberculosis* el cual comprende además a las especies: *bovis*, *africanum*, *microti*, y *canetti*. Éstas son agentes causantes de la tuberculosis en humanos y animales, su cercana relación se determinó por el gran parecido en sus DNA (homología del DNA de un 85% a 100%) por *electroforesis enzimática multiloci*, secuenciación del gen 16S rRNA (rDNA) y de la región 16S-a-23S rDNA denominada región interna espaciadora. A pesar de estar relacionados genéticamente, los miembros del complejo *M. tuberculosis* difieren en su epidemiología e importancia de la enfermedad en humanos¹⁵.

La morfología celular de *Mycobacterium tuberculosis*, consiste en bacilos que miden de 2 a 6 μm x 0.3 μm , generalmente de forma ligeramente curva (Figura 1), no forman esporas y son inmóviles. En cultivo, los bacilos en ocasiones forman cordones serpentininos que tienden a ser extensos¹⁶.

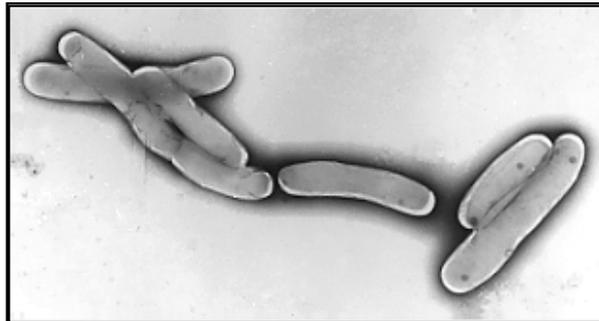


Figura 1. Bacilo de *M. tuberculosis*.

Respecto a su morfología colonial, en medio de Lowenstein-Jensen desarrollan abundantes colonias de color amarillo pálido, secas, elevadas y verrucosas que semejan migas de pan, o a veces tienen aspecto de coliflor; este crecimiento se describe como eugónico¹⁷. *M. tuberculosis* crece mejor en presencia de oxígeno y a 37° C, puede sobrevivir en un ambiente seco por largo tiempo y muere rápidamente cuando es expuesto a la luz solar directa o a rayos ultravioleta, así como a ebullición durante un minuto y por pasteurización a 60° C durante 20 minutos¹⁷⁻²⁰. Sin embargo otros autores afirman que es susceptible a la desecación²¹. El medio ambiente en el que se encuentra constituye un factor muy importante para su viabilidad²⁰.

El hábitat natural de *M. tuberculosis* son los humanos, pero puede infectar también animales (primates, cerdos, elefantes, perros, órix y tapir)^{15, 16}. El bacilo tiene una serie de características estructurales que lo hacen poco vulnerable a la mayoría de los agentes químicos y lo protegen de los mecanismos de defensa naturales del hospedero. Tiene la pared más compleja de todas las bacterias conocidas, una verdadera coraza lipídica. De ella depende, entre muchas otras propiedades, la de ser ácido-alcohol resistente, que hace que una vez teñida sea capaz de resistir la decoloración con ácido y alcohol; de ahí el nombre de bacilos ácido - alcohol resistentes (BAAR)²¹.

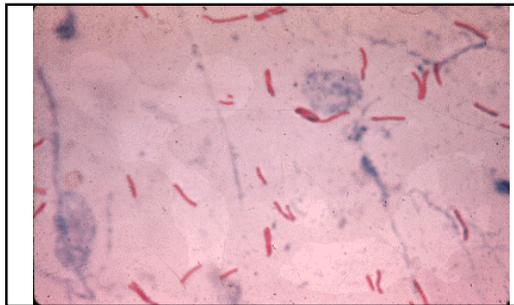


Figura 2. Aspecto de *M. tuberculosis* por tinción de Ziehl Neelsen.
(Cortesía de QFB. Silvia González)

3.1 Propiedades biológicas²¹

1. Es un parásito estricto, por lo cual su transmisión generalmente es directa, de persona a persona.
2. No tiene toxinas conocidas, así que puede persistir en bacteriostasis por largos períodos en el interior de las células.
3. Es un aerobio obligado, esto explica su predilección para causar enfermedad en tejidos altamente oxigenados como el lóbulo superior del pulmón y el riñón²⁰. Su capacidad de metabolización y de crecimiento es muy diferente según la tensión parcial de oxígeno del órgano o lesión que lo anida.
4. Es de multiplicación lenta (18-21 horas), factor que condiciona su tendencia a la cronicidad. Debido a que su crecimiento es lento, el cultivo de muestras clínicas deber ser mantenido de 6-8 semanas antes de ser registrado como negativo²⁰.

5. Tiene una virulencia variable, lo que podría explicar algunas de sus características epidemiológicas. Diversos estudios en animales han demostrado que *M. tuberculosis* posee factores de virulencia que le permiten incrementar su capacidad infectiva y su patogenicidad²².
6. Tiene numerosos antígenos, capaces de despertar una gran variedad de respuestas inmunológicas en el hospedero, algunas de las cuales determinan el característico daño tisular que es capaz de producir.

3.2 Pruebas bioquímicas para identificar a *M. tuberculosis*

La diferenciación de entre los más importantes patógenos micobacterianos para humanos, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, y *M. bovis*, se basa en varias pruebas bioquímicas (Tabla 1). *M. tuberculosis* es fácilmente identificado por su especial morfología colonial (aspecto pálido y semejante a una coliflor), reducción de nitratos y acumulación de niacina. *M. bovis* muestra crecimiento disgónico (colonias poco elevadas y húmedas) y es negativo a la reducción de nitratos y acumulación de niacina. Un criterio importante para la diferenciación de *M. bovis* es su resistencia intrínseca a la pirazinamida (PZA). Sin embargo algunos estudios reportan susceptibilidad a la PZA entre aislados de *M. bovis*¹⁵.

Tabla 1. Pruebas bioquímicas para *M. tuberculosis* (Cowan y Steel's. 1979)²³

Propiedad	Resultado
Catalasa	-
Pigmento en la luz	-
Pigmento en la oscuridad	-
Crecimiento <3días	-
Crecimiento a 25 °C	-
33 °C	+
37 °C	+
45 °C	-
52 °C	-
Crecimiento en MacConkey	-
Crecimiento en 5% de NaCl	-
Reducción de nitratos	+
Ureasa	+
Hidrólisis del Tween 80	d
Producción y acumulación de niacina	+

d= Positivo a 42-43 °C

3.3 Características de la envoltura

La envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* es una estructura compleja, constituida por cápsula, pared celular y membrana plasmática. La cápsula es la capa externa de la envoltura de las micobacterias y sirve de protección contra múltiples factores externos (Figura 3). Por lo tanto, tiene una interacción directa con los elementos de la respuesta inmunológica. Sus características y composición varían en las diferentes especies y cepas de micobacterias. Entre los principales componentes se encuentran los ácidos micólicos y glicolípidos; estos glicolípidos junto con algunas proteínas son responsables de las características antigénicas de la bacteria²⁴.

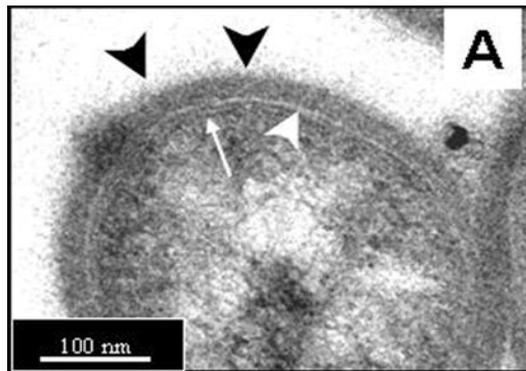


Figura 3. Microscopía electrónica de transmisión de *M. tuberculosis* teñida con rojo de Rutenio para demostrar la cápsula. Se muestra la cubierta de la pared celular y consiste de membrana plasmática y capas de peptidoglicana (flecha blanca delgada), una región electrotransparente (punta de flecha blanca) formada por ácidos micólicos, glicolípidos y otros polímeros lipídicos y una capa delgada externa parecida a una cápsula teñida fuertemente con rojo de Rutenio (punta de flecha negra). *The glycan-rich outer layer of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis acts as an Antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages.* de R. W. Stokes, et al (*Infection and Immunity*. 2004;72:5676-5686)²⁵.

La pared celular micobacteriana se localiza por debajo de la cápsula, separada por un espacio periplásmico, posee un elevado contenido de lípidos (50-60%) que le confieren un carácter hidrofóbico y la hacen refractaria al ataque por hidrólisis enzimática (Figura 4). Es una efectiva barrera frente a muchos de los agentes antimicrobianos convencionales y está constituida por el complejo macromolecular formado por ácidos micólicos-arabinogalactano-peptidoglicano (mAGP)²⁴.

Los ácidos micólicos son ácidos grasos complejos de gran importancia taxonómica para micobacterias y bacterias de géneros relacionados como *Nocardia* y *Corynebacterium*; en el caso de las micobacterias, los ácidos micólicos tienen de 70-80 carbonos y se les atribuye el carácter hidrofóbico de la envoltura²⁴.

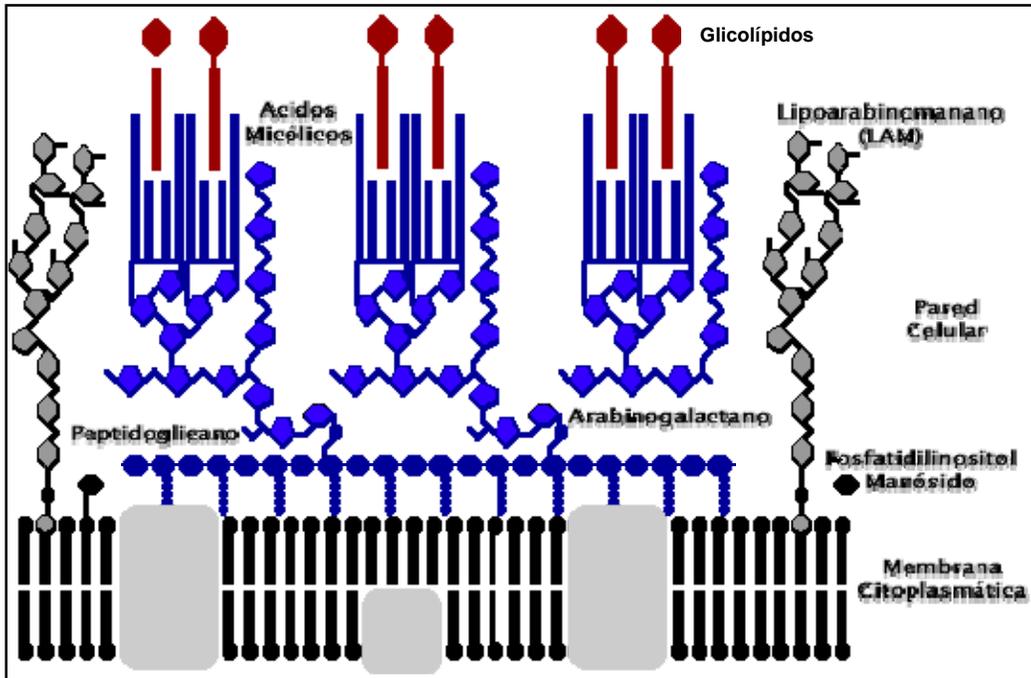


Figura 4. Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis*. La bacteria está envuelta dentro de una bicapa lipídica típica de la membrana citoplasmática que permanece debajo del peptidoglicano rígido (PG). Cierta número de proteínas se encuentra en asociación con el PG y entre la membrana, los PG y algunas de ellas pueden ser inmunogénicas. *Adaptado del minireview "Immunopathology of Tuberculosis: Roles of Macrophages and Monocytes" de M.J. Fenton and M. W. Vermeulen (Infection and Immunity. 1996;64:683-690)*²⁶.

La membrana celular tiene características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana, aunque en las micobacterias los derivados de los fosfolípidos se caracterizan por estar altamente glicosilados dando lugar a moléculas como la lipoarabinomano (LAM); que tienen un papel fundamental en la patogénesis de la tuberculosis. Los componentes mayoritarios de la envoltura de las micobacterias son lípidos asociados a carbohidratos (glicolípidos), fosfolípidos glicosilados o carbohidratos complejos sustituidos con ácido micólico o péptidos²⁴.

Las porciones glicosiladas de estas moléculas son importantes en la interacción con los componentes de la respuesta inmunitaria innata y específica del hospedero. Se estima que el 25% del peso seco de las micobacterias corresponde a lípidos o glicolípidos; el 40% de ellos son moléculas de ácidos micólicos unidos a la trehalosa. La trehalosa es un antígeno presente en numerosas moléculas de micobacterias y existen varias moléculas que contienen este disacárido, las cuales se clasifican en micolatos de trehalosa y sulfolípidos de trehalosa²⁴.

3.3.1 Factor cuerda (6,6-dimicolato de trehalosa)

Es una molécula mixta que se encuentra en la capa periférica de la envoltura y es abundante en todas las micobacterias patógenas. Recibe el nombre porque en los cultivos, los microorganismos forman agregados semejantes a cordones. Presenta pequeñas variaciones en ciertos grupos químicos, que son características en las diversas especies y cepas de micobacterias. El factor cuerda está formado por un complejo de tres macromoléculas: peptidoglicano (PG), arabinogalactano (AG) y micolatos. Es inmunogénico y se ha intentado usarlo en la prevención de la tuberculosis; su naturaleza química favorece la inflamación crónica y ocasiona la formación de granulomas en el pulmón. Además se ha asociado a la inhibición de la fusión de los lisosomas con los fagosomas en los macrófagos, fenómeno que se considera clave para la supervivencia de *M. tuberculosis* en esas células²⁴.

4. TRANSMISIÓN

M. tuberculosis se transmite de persona a persona por vía aérea, el bacilo se propaga principalmente a través de partículas infecciosas aerosolizadas generadas por individuos con tuberculosis bacilífera al toser, o estornudar. Aunque cualquier aceleración del flujo aéreo proveniente de los pulmones puede nebulizar partículas finas, la tos es sin duda la más capaz de generar aerosoles potencialmente infectantes²¹. Las partículas grandes quedan atrapadas en las superficies mucosas y son eliminadas por la acción de los cilios del árbol respiratorio. Sin embargo, las partículas pequeñas que contienen de uno a tres bacilos tuberculosos pueden llegar hasta los alvéolos y comenzar una infección²⁷. Usualmente la primoinfección llega a las vías respiratorias bajas, siendo el pulmón el principal sitio de infección. Para que un bacilo tuberculoso inhalado sea capaz de infectar el pulmón, depende de su propia virulencia y de la inherente capacidad microbicida del macrófago alveolar (MA) que lo ingiere²².

La tuberculosis extrapulmonar, a excepción de la laríngea, generalmente no es transmisible, salvo por aquellos casos insólitos en que se forma una fístula con secreciones hacia el exterior del cuerpo. Las personas con tuberculosis latente no suelen transmitir la enfermedad²⁸. La infección por bacilos tuberculosos también se realiza a través de la piel, este fenómeno se designa *tuberculosis por inoculación directa* a través de alguna pequeña lesión en la piel, se presenta con cierta frecuencia entre el personal de laboratorio, quienes manipulan material infectado²⁹. Los fómites como libros, vestimenta, ropa de cama y utensilios de comida no son fuente importante de transmisión^{18, 30}.

En países en vías de desarrollo *Mycobacterium bovis* también causa tuberculosis en humanos, al consumir productos obtenidos de animales enfermos. El control de la tuberculosis bovina y la pasteurización de la leche han disminuido la tuberculosis humana ocasionada por *M. bovis*^{20, 29}. Tanto las infecciones primarias como las reactivaciones afectan con frecuencia sitios extrapulmonares. Al ingerir *M. bovis* se provoca de manera típica el desarrollo de linfadenitis cervical o tuberculosis abdominal con peritonitis, linfadenitis mesentérica, afección ileocecal o enfermedad anorrectal. Los niños se encuentran en riesgo de desarrollar infecciones diseminadas, sobre todo antes de los dos años de edad. En este

grupo de pacientes la enfermedad miliar puede desarrollarse de tres a nueve meses después de la infección inicial, incluyendo los cuadros de meningitis. Las infecciones extrapulmonares causadas por *M. bovis* en el adulto pueden representar una reactivación de la enfermedad. Los sitios que se afectan con mayor frecuencia son el tubo digestivo, los huesos y articulaciones y el sistema nervioso central³⁰.

Un padecimiento relacionado con tuberculosis es la enfermedad crónica inflamatoria o enfermedad de Johne (en ganado), ocasionada por *Mycobacterium paratuberculosis*. Se conoce que infecta a una amplia variedad de animales, incluyendo primates y humanos, comúnmente afecta el tracto gastrointestinal, es un patógeno obligado, su estudio es difícil debido su lento crecimiento y sólo bajo ciertas condiciones de laboratorio. En 1998 se publicó por primera vez un caso en humano causado por *M. paratuberculosis*, donde el paciente desarrolló una enfermedad intestinal indistinguible de la enfermedad de Crohn y después de cinco años de incubación presentó linfadenitis cervical³¹.

5. PATOGENIA

Los focos primarios de infección por micobacterias se localizan básicamente a nivel pulmonar, entérico y en piel. A partir de estos, la infección puede diseminarse a cualquier órgano o tejido del cuerpo humano¹⁸.

La infección primaria o primoinfección por M. tuberculosis ocurre en individuos que nunca se habían puesto en contacto previamente con el bacilo de la tuberculosis¹⁷. En esta primoinfección una o más micobacterias se encuentran dentro del alvéolo pulmonar donde son rápidamente fagocitadas por macrófagos alveolares. Debido a su resistencia, los bacilos se multiplican dentro de los macrófagos en forma lenta, por lo cual, la aparición de ciertos síntomas o de mecanismos inmunológicos, puede requerir hasta de 4-8 semanas (período prealérgico). Cuando el número de bacilos llega a ser importante, aparece un exudado celular de tipo inflamatorio (neumonitis) que ofrece poca resistencia a la multiplicación del bacilo y por lo tanto puede ocurrir diseminación del mismo desde este foco, que se establece a partir de vasos linfáticos (linfangitis), pudiendo afectar de forma extensa los ganglios linfáticos regionales,

particularmente hiliares y traqueales (linfadenitis), constituyendo así lo que se conoce como *complejo de Ranke* (neumonitis, linfangitis y linfadenitis). Casi al mismo tiempo, y a partir también de los vasos linfáticos o macrófagos alveolares, los microorganismos son vertidos al torrente sanguíneo y por esta vía (diseminación linfohematológica) alcanzan todos los órganos o tejidos corporales¹⁸. En una pequeña proporción el proceso avanza a nivel pulmonar o sistémico, produciendo enfermedad tuberculosa diseminada. Sin embargo, en la mayoría de las personas (95%), después de unas pocas semanas, el rango de multiplicación disminuye y el problema neumónico se resuelve. Estos mismos cambios ocurren en los tejidos donde se diseminó primeramente. Por lo general, el proceso de la enfermedad, en la mayoría de las personas se resuelve espontáneamente, y la zona de neumonitis se fibrosa y calcifica en un pequeño nódulo (nódulo de Ghon), así como a nivel ganglionar parahiliar. Al mismo tiempo que ocurren estos fenómenos, aparecen dos manifestaciones inmunológicas después del periodo prealérgico: los individuos afectados se hacen tuberculino-positivos y los macrófagos, en cuyo interior se multiplicaron bacilos tuberculosos, adquieren la capacidad de inhibir a esos bacilos¹⁸.

La infección tuberculosa secundaria que se presenta en un individuo que ha sufrido previamente la primoinfección y que, por lo tanto, ya se había puesto en contacto con el bacilo de la tuberculosis, puede ser debida a una exacerbación de la infección primaria (endógena) o que corresponda a una infección secundaria con bacilos que provengan del exterior (exógena). Esta infección se localiza con mayor frecuencia en los vértices pulmonares, se caracteriza por la no diseminación, cavitación (formación de cavidades) y necrosis del tejido pulmonar¹⁷. Inicialmente el bacilo tuberculoso sólo se multiplica dentro o próximo al área necrótica, en donde la inmunidad celular ha sido reducida o abolida; sin embargo la enfermedad puede progresar por extensión directa, o bien la diseminación a nivel pulmonar puede ocurrir cuando un bronquio es erosionado y en él se vierten los bacilos (diseminación broncógena) y es menos frecuente la diseminación hematológica cuando un vaso es erosionado¹⁸.

La respuesta inmunológica celular y humoral del hospedero resulta exitosa contra la infección de por vida en >90% de las personas infectadas (infección latente). Aproximadamente el 10% de las personas infectadas posteriormente desarrollan la enfermedad activa: el 5% desarrolla una enfermedad primaria progresiva dentro de los primeros 1-2 años de la infección y el otro 5% sufre reactivación en el pulmón o en otro órgano años después³².

El riesgo promedio de que la infección latente avance hasta activación está relacionado a varios factores o enfermedades. La más característica es la infección por VIH sin tratamiento y su asociación con el deterioro de la inmunidad celular CD4+, lo cual incrementa la activación en un 10% por año³².

A diferencia de TB pulmonar, la mayoría de los casos de TBEP (excepto TB pleural) son consecuencia de la reactivación de una infección latente¹³.

5.1 Componentes glicosilados de *M. tuberculosis* y su relación con la patogenia de la tuberculosis

Los componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* tienen un papel importante en la inmunopatogénesis de la tuberculosis. Permiten la adhesión, penetración y persistencia de la micobacteria en el macrófago; de igual manera, participan en los mecanismos de activación de estas células y la producción de citocinas relevantes en la respuesta inmunológica²⁴ (ver Tabla 2).

Tabla 2. Moléculas de origen lipídico de *M. tuberculosis* asociadas con la patogenia de la tuberculosis (Gorocica, *et al.*, 2005)²⁴

Molécula	Respuesta inmunológica del hospedero	Patogénesis	Otras funciones
Peptidoglicano	Es antigénica y tiene patrones de reconocimiento para receptores fagocíticos	Protege a la micobacteria, de la lisis por cambios osmóticos y por la enzima lisozima	Estructural, forma la pared celular
Ácidos micólicos	Evita la destrucción de micobacterias por mecanismos microbicidas del macrófago.	Forma una barrera impermeable que impide el acceso de sustancias hidrofílicas y fármacos	Es estructural y forma parte del mAGP en la pared celular
Derivados de los Ac. Micólicos			
A) factor cuerda	*Inmunomodulador *Toxina con actividad tumoricida	Induce la producción de TNF- α en macrófagos y formación de granulomas	Es estructural en cápsula
B) SL	Activan neutrófilos y son antígenos de superficie	Bloquean el efecto de IFN γ , IL-1 y TNF- α en macrófagos e inhibe PKT. Inhibe la fusión del fagosoma con el lisosoma en macrófagos. Inhibición de la PKT	Antígeno soluble de cápsula
LOS	Antígeno de superficie	Participa en la unión de la micobacteria con los receptores del macrófago	Estructural en cápsula. Tiene valor taxonómico
GPL	Induce TNF- α y PGE2 en macrófagos	Inhibe respuesta linfoproliferativa	Antígeno de superficie de cápsula
PGL	Activa complemento	Inhibe la respuesta linfoproliferativa y estallido respiratorio en macrófagos Inhibe PKT	Antígeno estructural de cápsula
Derivados de PI PIM	Activan inmunidad específica de células TNK. Son presentados por CD1	Los PIM intervienen activamente en la interacción de la micobacteria con el macrófago y son precursores de LAM	Son exclusivos de actinomicetales y se encuentran en la membrana
LAM	Es inmunomodulador y es presentado por CD1	Activa células T vía TLR y CD1	Tienen un gran espectro de funciones
AraLAM	Activa mecanismos microbicidas dependientes de TNF- α	Inhibición de PKT	LAM sin manosa terminal asociada a cepas no patógenas
ManLAM	Se une al RM, CD14	Induce TNF- α y producción de granuloma. Inhibición de PKT. Inhibe producción de citocinas proinflamatorias	LAM con manosa terminal, en cepas patógenas
PIMLAM o AraLAM	Se une a TLR-2	Induce la producción de citocinas proinflamatorias	

Abreviaturas: Sulfolípidos de trehalosa (SL); Lipooligosacáridos (LOS); Glicopeptidolípidos (GPL); Fenolglucolípidos (PGL); Fosfatidil-inositol (PI); Fosfatidilinositolmanósidos (PIM); Lipoarabinomanana (LAM); Lipoarabinomanana con residuos terminales en manosa (ManLAM); Lipoarabinomanana sin residuos terminales de manosa (AraLAM); Receptores tipo *Toll* (TLR); Proteín cinasa C (PKT).

6. MECANISMOS INMUNOLÓGICOS INVOLUCRADOS EN LA TUBERCULOSIS

La respuesta inmunitaria innata como la respuesta adaptativa participan en el control de la infección por *Mycobacterium*. Sin embargo, los mecanismos efectores humorales, tanto de la respuesta innata (complemento y defensinas), como de la respuesta adaptativa (anticuerpos) y celulares de la respuesta innata (neutrófilos, macrófagos y células NK, TNK, $T\gamma\delta$) son ineficientes debido a que la bacteria alcanza rápidamente un hábitat intracelular³³. En numerosas enfermedades crónicas, incluyendo las infecciones micobacterianas, los linfocitos CD4 juegan un papel importante en la respuesta inmunológica. Promueven la protección, pero también participan en el desarrollo y evolución de la infección, la reactivación crónica y el daño al tejido³⁴.

Los linfocitos CD4+ se dividen en cuatro clases de acuerdo al tipo de citocinas producidas: Los T-helper 1 (Th1) que secretan principalmente la interleucina-2 (IL-2) y el interferón- γ (IFN- γ); los Th2 que producen interleucinas 4, 5, 6, 10 y 13^{33, 34}. Los linfocitos Th3 productores de factor de crecimiento transformante beta TGF- β (regulador de la inmunidad en mucosas y estimulante de la secreción de Ig A por las células B) y los T reguladores Tr1 que se caracterizan por secretar niveles altos de IL-10 (antiinflamatoria) y poco TGF- β ^{35, 36}. La IL-10 y TGF- β son potentes inhibidores de la respuesta inmunitaria mediada por las células Th1, aunque recientemente se ha encontrado que también son capaces de inhibir la respuesta Th2³⁶. Otras células T reguladoras son los linfocitos T CD4+ CD25+, los cuales están asociados con protección en algunos procesos autoinmunes, su mecanismo de acción es dependiente del contacto célula – célula³⁷. Los linfocitos Th1 y los Th2 producen IL-3 y factor estimulante de las colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF). Las interleucinas Th1 promueven la inmunidad celular activando macrófagos, y participan en la hipersensibilidad retardada, mientras que las Th2 inducen el crecimiento y diferenciación de los linfocitos B y antagonizan la respuesta Th1^{33, 34}. El tipo de citocinas presentes en el tejido, la clase de células presentadoras de antígenos, así como la naturaleza y la cantidad del antígeno son los factores más importantes que dirigen a los linfocitos CD4+ hacia poblaciones Th1 o Th2³³.

Diferentes estudios realizados en humanos y en modelos animales muestran que en la tuberculosis, el balance mixto de citocinas Th1–Th2 está relacionado con la inmunopatogénesis de la enfermedad³⁴.

En la inmunidad antimicobacteriana están implicados diferentes grupos de células T, incluyendo las T CD4+, CD8+, DP CD4+ CD8+, CD4+ $\alpha\beta$, CD8+ $\alpha\beta$ y las células T $\gamma\delta$ (DN CD4- CD8- donde el 95% de ellas está presente en mucosas y 5% en circulación). La producción de IFN- γ (por las células T $\gamma\delta$) detiene el avance de la tuberculosis pulmonar primaria. Las células T CD8, demostraron ser protectoras en modelos murinos contra *M. tuberculosis*. Datos obtenidos por experimentación sugieren que la acción primaria de estas células es la secreción de citocinas, más que una actividad lítica directa, su acción prolonga la supervivencia del hospedero infectado³⁸.

6.1 Respuesta inmunológica celular

La respuesta Th1, que constituye la respuesta protectora contra *M. tuberculosis*, se encuentra regulada por IL-1 α , IL-12, IL-15, IL-18 e IL-21, mediada por células T CD4 que producen IL-2, IFN- γ y macrófagos activados productores de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)³⁸. En los sujetos inmunocompetentes, la respuesta celular se induce cuando los antígenos micobacterianos son procesados por células dendríticas y macrófagos (APC) y presentados a los linfocitos T (CD4+ y CD8+). Por acción de IL-12, producida por las APC, los linfocitos T CD4+ forman una clona Th1 productora de las citocinas IL-2, TNF- β e IFN- γ ³⁹. En la infección tuberculosa, el IFN- γ interviene como un potente activador de los macrófagos. Los macrófagos activados son capaces de matar y digerir los bacilos intracelulares que los infectan debido a que liberan intermediarios de oxígeno y nitrógeno, enzimas lisosomales y otros factores. Como resultado, en los sitios de multiplicación de las micobacterias se acumulan macrófagos y linfocitos T activados que progresivamente forman granulomas, en cuyo interior se elimina la gran mayoría de bacterias^{30, 39}.

A pesar de la eficiencia protectora de la inmunidad celular, puede ocurrir que un muy pequeño número de bacilos permanezca vivo en estado de latencia en el granuloma. Esto se conoce como tuberculosis latente la cual no es transmisible y no causa manifestaciones clínicas ni radiológicas³⁹. Esta latencia a menudo se extiende durante toda la vida del individuo. En las infecciones latentes, se desconoce el estado de actividad de la bacteria dentro del granuloma o tubérculo³⁸.

6.1.1 Hipersensibilidad de tipo IV o retardada

Las células T que dan lugar a las respuestas de tipo retardado tienen que haber sido sensibilizadas previamente por exposición al antígeno y su función es atraer células de otros tipos hacia la zona de reacción⁴⁰. Este tipo de inmunidad celular forma parte del mecanismo de defensa primaria frente a bacterias intracelulares como *Listeria monocytogenes* y micobacterias⁴¹. Existen tres variantes de esta hipersensibilidad (tipo tuberculínico, granulomatosa y dermatitis por contacto),

pero sólo se describirán dos de ellas por estar relacionadas con la prueba del PPD y la formación de granulomas durante la enfermedad tuberculosa.

Hipersensibilidad de tipo tuberculínico

Tras la inyección de tuberculina por vía intradérmica en un individuo sensibilizado, se activan las células T específicas de antígeno, que secretan citocinas que inician la reacción de hipersensibilidad. La respuesta de hipersensibilidad retardada (HR) característica se desarrolla en 24 a 48 horas y consta de tres procesos secuenciales⁴⁰.

1) El reconocimiento del antígeno y la activación de las células T

Desde el punto de vista experimental, las reacciones de HR se producen en dos etapas distintas. En la primera, o de “sensibilización”, el antígeno extraño es presentado a las células T vírgenes, seguido de la activación, expansión y diferenciación de las células T CD4+ específicas de antígeno. Las APC residentes especializadas, como las células de Langerhans de la epidermis, transportan el antígeno desde la puerta de entrada (p. ej., la piel) hasta los ganglios linfáticos de drenaje o el bazo, donde es más probable que contacten con células T vírgenes específicas de antígeno. Después de que las células T encuentran al antígeno, entran en el ciclo celular, proliferan y se diferencian en células efectoras. A medida que disminuye el nivel de antígeno, algunas células T se diferencian a células de memoria. Tanto las células T efectoras como de memoria abandonan los órganos linfáticos secundarios y circulan en la sangre. La reacción de HR inicia tras el estímulo de los sujetos sensibilizados o los animales de experimentación con el antígeno específico. La fase de “provocación” se inicia por el reconocimiento del antígeno, en este caso por las células Th1 CD4+ de memoria (o en ocasiones por células T CD8+) presentes en la circulación⁴¹.

2) El desarrollo de la inflamación en la hipersensibilidad de tipo retardado

Una vez que las células de memoria reconocen a su antígeno específico en el lugar de estimulación antigénica, alteran las células endoteliales y atraen leucocitos circulantes hacia la reacción inflamatoria. Las células del endotelio microvascular realizan cuatro funciones que contribuyen a la inflamación⁴¹.

- I. Mediante la producción de sustancias vasodilatadoras como prostaciclina (PGI_2) y óxido nítrico (NO), *las células endoteliales provocan un aumento del flujo sanguíneo local y optimizan el transporte de leucocitos hasta el foco inflamatorio*. El TNF- α aumenta la expresión y la actividad de las enzimas de las células endoteliales que sintetizan prostaciclina y, junto con el IFN- γ , aumenta la síntesis de NO.
- II La expresión de nuevas proteínas de superficie o el aumento de los niveles de algunas de ellas permite que *las células del endotelio venular postcapilar se vuelvan adherentes a los leucocitos*. En este estado de adhesividad, el encuentro aleatorio de un leucocito circulante con una célula endotelial venular da lugar a un aumento del tiempo de permanencia de los leucocitos en la superficie venular. Como en el caso de la emperipolesis (diapédesis) de linfocitos a través de las vénulas endoteliales altas en los tejidos linfoides organizados, la prolongación del tiempo de permanencia puede servir para incrementar la probabilidad de extravasación. En los tejidos periféricos se inducen diversas moléculas de adhesión leucocitaria en el endotelio vascular en respuesta a citocinas o a señales de contacto dependientes de células T. Se han caracterizado tres moléculas endoteliales importantes en el desarrollo de la inflamación inducida por el antígeno en la HR: La **selectina -E** (también llamada molécula de adhesión endotelio-leucocito-1 o ELAM-1), la **molécula de adhesión a la célula vascular-1** (VCAM-1) y la **molécula de adhesión intercelular-1** (ICAM-1 o CD54).
- III. *Las células T activadas por el antígeno inducen a las células endoteliales a secretar citocinas como la interleucina -8 (IL-8) y la proteína quimiotáctica de los monocitos -1 (MCP-1)*. Las citocinas secretadas se unen a los glucosaminoglucanos de heparán sulfato de la superficie de la célula endotelial, donde interactúan preferentemente con leucocitos que están unidos a moléculas de adhesión de la célula

endotelial. Las citocinas actúan sobre los leucocitos para favorecer la extravasación⁴¹.

- IV. *Las citocinas o las señales dependientes del contacto de las células T activadas inducen cambios morfológicos en las células endoteliales y remodelamiento de la membrana basal que favorecen el escape de macromoléculas y la extravasación de células T. A las 24 horas, las células endoteliales reorganizan sus moléculas de adhesión y las concentran en las uniones intercelulares. Otra molécula de adhesión, la **molécula de adhesión plaqueta-endotelio-1** (PECAM-1 o CD31), favorece la migración leucocitaria a través del revestimiento de las células endoteliales. El escape de las macromoléculas del plasma, especialmente fibrinógeno, es la base de la induración. El depósito en los tejidos de fibrinógeno (y su producto de escisión, la fibrina), así como de la fibronectina del plasma, forma una guía que facilita la migración leucocitaria y la subsiguiente retención en los tejidos extravasculares⁴¹.*

3) *Macrófagos activados y resolución de la hipersensibilidad de tipo retardado.*

Una vez que los monocitos sanguíneos abandonan la circulación y penetran en los tejidos extravasculares en los lugares de las reacciones de HR, se diferencian a macrófagos, que representan las células efectoras finales de estas reacciones. Los macrófagos eliminan los microorganismos y otras fuentes de antígeno, lo que lleva a la terminación (**resolución**) de la reacción de HR⁴¹.

Hipersensibilidad granulomatosa

Ésta se caracteriza por la persistencia de microorganismos intracelulares o de otras partículas, dentro de macrófagos que se agrupan en colecciones celulares llamadas granulomas. También puede ser debida a la presencia persistente de inmunocomplejos^{36, 40}. En las reacciones de HR crónicas –es decir, cuando la fuente de antígeno no está erradicada–, los propios macrófagos activados experimentan cambios en respuesta a señales constantes de citocinas, desarrollando más citoplasma y organelos citoplasmáticos, pueden parecer

células epiteliales cutáneas, y por ello se les ha denominado “células epiteloideas”. Algunas veces, estos macrófagos pueden llegar a fusionarse y formar células gigantes multinucleadas denominadas células gigantes de Langhans^{40, 41}.

El granuloma consiste de macrófagos, células gigantes, células T, células B y fibroblastos⁴². En la tuberculosis, la zona central del granuloma puede presentar una necrosis caseosa (con consistencia de queso) parcial, con destrucción total de la estructura tisular. Este núcleo de macrófagos y células epiteloideas está rodeado por una capa de linfocitos y también puede aparecer una notable fibrosis (depósito de fibras de colágeno) debido a la proliferación de los fibroblastos y al aumento de la síntesis de colágeno. Las lesiones granulomatosas en TB pulmonar dan lugar a cavitación (formación patológica de cavidades) y a la consiguiente diseminación de las bacterias^{36, 40}.

6.1.2 Presentación de antígenos lipídicos por CD1

Las CD1 son moléculas presentadoras de antígenos, no polimórficas. Antígenos lipídicos y moléculas de glicolípidos derivados de bacterias como *Mycobacterium tuberculosis* son presentados por miembros de la familia CD1 a las células T. La familia de moléculas CD1 esta asociada con la β -microglobulina y tiene similitud estructural con las moléculas MHC clase I. Las CD1 se expresan en las células presentadoras de antígenos, como células dendríticas y linfocitos B y están divididas en dos grupos: Grupo I (CD1a, b, c) y el grupo II (CD1d). Los humanos poseen ambos grupos^{24, 36, 38, 43, 44}.

El grupo I presenta una variedad de glicolípidos de la pared celular micobacteriana (incluyendo manósidos fosfatidil inositol PIM, LAM y ácidos micólicos) a células T⁴⁴. Las células T $\alpha\beta$ + CD4-CD8- / CD8+ reconocen antígenos presentados por las moléculas CD1, en particular las CD1b actúan como moléculas presentadora de antígenos de *M. tuberculosis*. Antígenos derivados de *M tuberculosis* son también reconocidos por células T $\gamma\delta$ + CD4- CD8- sin embargo, estos antígenos difieren en peso molecular (1000-3000 Da) de los reconocidos por las células T $\alpha\beta$ + DN⁴⁵.

6.2 Respuesta inmunológica humoral

La respuesta humoral está mediada por inmunoglobulinas (Ig), que son moléculas solubles con actividad de anticuerpo, es decir se combinan específicamente con un determinado epítipo del antígeno que indujo su producción. Estructuralmente todas las Ig están formadas por una unidad básica de cuatro cadenas unidas entre sí por puentes disulfuro: dos pesadas (H, del inglés *heavy*), con secuencias exclusivas en cada isotipo, y dos ligeras (L) que son comunes para todas. Esta unidad está conformada por tres porciones globulares, dos Fab (del inglés *antigen binding fragment*, fragmento que se une al antígeno) que poseen sendos sitios activos, y un Fc (del inglés *crystallizable fragment*, fragmento que cristaliza); cada Fab consta de una de las cadenas ligeras y la mitad amino-terminal de una cadena H (donde se ubican las regiones variables que confieren especificidad de anticuerpo), y el Fc incluye las dos mitades carboxi-terminales de ambas cadenas H. En el humano existen cinco clases de Ig: IgM, IgG, IgA, IgD e IgE. La IgG tiene cuatro subclases (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) y la IgA dos (IgA1, IgA2). Todas las Ig tienen actividad de anticuerpo y a excepción de la IgD, participan en fenómenos de protección y daño. Las Ig son sintetizadas y excretadas por células plasmáticas que provienen de linfocitos B, estimulados antigénicamente⁴⁶.

Algunos trabajos han propuesto que la respuesta Th1 confiere protección contra *M. tuberculosis*, mientras que la Th2 está asociada con enfermedad severa⁴⁷. De acuerdo con un modelo experimental de TB pulmonar progresiva desarrollada en ratón, durante la fase avanzada de la enfermedad se incrementa significativamente la presencia y actividad de los linfocitos T cooperadores de tipo 2 (Th-2), los cuales se caracterizan por producir las interleucinas 4, 5, 6, 10 y 13. En particular, la IL-4 es una citocina fundamental en la inducción de la diferenciación de los linfocitos B productores de anticuerpos, que se consideran como no protectores en la tuberculosis. Además la IL-4 al igual que la IL-10 y la IL-13 son eficientes antagonistas de las células Th1. En consecuencia, se considera que la emergencia de los linfocitos Th2 durante la fase progresiva de la enfermedad puede contrarrestar la actividad protectora de las células Th1 y desviar la inmunidad celular hacia la inmunidad humoral, contribuyendo así a favorecer la progresión de la enfermedad⁴⁸. Aunque algunos reportes han mostrado que IL-4 no es esencial para la respuesta inmunitaria protectora,

Sugawara *et al.* (citado en ref 49), revelaron que la IL-4 es requerida en la defensa contra infecciones micobacterianas⁴⁹. La micobacteria contiene numerosos componentes inmunológicos, y cada individuo puede ser capaz de desarrollar una respuesta elevada de anticuerpos contra un limitado número de ellos⁵⁰.

Existen varios factores que afectan la capacidad de los pacientes para llevar a cabo la respuesta inmunológica humoral contra *M. tuberculosis*. Uno de estos factores es la etapa de la enfermedad. Cuando aparece la lesión cavitaria, *M. tuberculosis* expresa ciertos antígenos que no se presentan en etapas tempranas de la infección. Dependiendo del tiempo en que se realice el diagnóstico, las pruebas basadas en estos antígenos mostrarán diferente sensibilidad⁵¹. Los niveles de anticuerpos contra antígenos micobacterianos en niños con tuberculosis son generalmente más bajos que en los adultos. Tal como sucede con la respuesta celular, los anticuerpos contra antígenos micobacterianos pueden estar ausentes en pacientes con SIDA⁵². Por lo tanto la localización y extensión de la infección, el grado de diseminación, y la calidad del estado inmunológico del huésped pueden ser factores importantes en la determinación de anticuerpos⁵³.

6. 2.1 La presencia de anticuerpos en la tuberculosis

De acuerdo con un estudio hecho en Polonia, sobre la respuesta inmunitaria humoral contra antígenos micobacterianos (gp38 kDa, LAM, 16 kDa y A60) en un grupo de pacientes con TB, la sensibilidad de la prueba al determinar anticuerpos IgG en adultos con TB extrapulmonar fue comparable o un poco menor que en pacientes con TB pulmonar. La sensibilidad de la prueba basada en IgA y particularmente IgM fue significativamente baja comparada con IgG. Esto comprueba que la respuesta inmunológica humoral de IgM e IgA contra los antígenos micobacterianos puede estar influenciada por factores (personales o ambientales) que no están relacionados con la presencia de la enfermedad activa, entonces se estableció que los ensayos basados en la determinación de anticuerpos IgA e IgM son limitados y carecen de utilidad diagnóstica comparados con los ensayos en los que se detectan anticuerpos IgG. La respuesta inmunitaria

basada en IgM está usualmente relacionada con la fase temprana de la invasión patógena. En la mayoría de los casos la TBEP representa la forma crónica o recurrente de la enfermedad. Lo que explica la baja sensibilidad al detectar anticuerpos IgM en la enfermedad⁵⁴.

Mediante la realización de ELISA-A60 (ELISA que utiliza al antígeno A60, ver Tabla 5) a muestras de 414 pacientes con TB pulmonar, de 92 pacientes con TB extrapulmonar y de 54 pacientes con ambos tipos de tuberculosis Zou *et al.* (1994)⁵⁵, concluyeron que: (1) las formas primarias de TB pulmonar estuvieron caracterizadas por altos títulos de IgM y bajos de títulos de IgG, (2) las formas de TB pulmonar postprimarias tuvieron altos títulos de IgG y bajos títulos de IgM, (3) la mayoría de las formas de TB extrapulmonar muestran patrones muy similares a los encontrados en TB pulmonar postprimaria⁵⁵. Julián *et al.* (2002)⁵⁶, revelaron que utilizando un glicolípido (sulfolípido I [SL-I]) como antígeno se obtuvieron mejores resultados al determinar anticuerpos IgA e IgG en pacientes adultos con TB pulmonar (n=58) y extrapulmonar (n=16). La IgG fue más reactiva, mostrando así valores altos de absorbancia y sensibilidad, mientras que IgA resultó más específica⁵⁶.

La detección serológica de anticuerpos (especie específicos) es muy común y benéfica en el sentido de que los anticuerpos reflejan la carga antigénica total en el cuerpo, mientras que la detección de anticuerpos en otros fluidos corporales no muestra una significativa asociación con los antígenos presentes en dichos fluidos⁵⁷. Existen reportes de que mediante ELISA-A60, en TB meníngea se obtuvieron niveles altos de IgG en líquido cefalorraquídeo (LCR) comparados con los encontrados en suero. Mientras que en TB pleural, los niveles de IgG tanto en líquido pleural como en suero fueron muy parecidos⁵⁵.

6.2.2 Heterogénea respuesta de anticuerpos en la tuberculosis

Los anticuerpos son producidos contra una variedad de antígenos en la mayoría de los pacientes con TB activa. El número y tipo de antígenos serológicamente reactivos varía considerablemente de individuo a individuo. El reconocimiento heterogéneo de los anticuerpos hacia los antígenos en la TB probablemente se deba a múltiples factores⁵⁸. Resultados inmunológicos han determinado que algunos pacientes reflejan una mejor respuesta celular y otros una fuerte

respuesta humoral. Un pequeño porcentaje de pacientes con tuberculosis, con predominio de respuesta inmunológica Th1, no puede producir anticuerpos hacia antígenos micobacterianos especie-específicos. Alternativamente, antígenos circulantes podrían hacer que los anticuerpos no estén disponibles para ser medidos debido a la formación de complejos inmunes (hipersensibilidad tipo III). Por lo cual, existe la sospecha de que anticuerpos y complejos inmunes participan como inmunosupresores en la tuberculosis^{52, 58}.

Se reportó que títulos bajos de anticuerpos hacia antígenos micobacterianos pueden estar asociados con una fuerte infección, y que los antígenos libres en circulación podrían causar una disminución temporal en la formación de anticuerpos⁵⁹.

Una de las mayores dificultades en la estimación de la respuesta de anticuerpos en tuberculosis es la presencia de epitopos que *M. tuberculosis* comparte con otras micobacterias ambientales cercanamente relacionadas, dando como resultado reacciones cruzadas que complican algunos intentos por desarrollar una prueba serodiagnóstica reactiva y específica para la enfermedad⁶⁰. Los sueros de sujetos sanos o no tuberculosos resultan ser falsos positivos cuando se analizan por un ELISA que emplea extractos micobacterianos semipurificados. Probablemente este resultado muestre niveles de anticuerpos hacia antígenos micobacterianos ambientales que también están presentes en la preparación de antígenos usados en el ELISA^{54, 61}, como las proteínas de choque térmico (*hsp*) que son abundantes en las micobacterias y son excelentes inductoras de respuestas inmunológicas. Se ha observado que las *hsp* son un blanco importante para la respuesta inmunológica en infecciones micobacterianas. Las principales proteínas de choque térmico están conservadas y son abundantes en diferentes organismos. La principal *hsp* reconocida por anticuerpos en infecciones bacterianas es la *hsp* 60⁶². El reconocimiento de los anticuerpos hacia ciertos antígenos (38 kDa, 19 kDa, LAM, BCG) se ha visto modificado por la carga bacilar, obteniéndose mejores resultados en aquellos pacientes con baciloscopía positiva que en quienes tienen baciloscopía negativa. Esto podría estar relacionado con una gran carga antigénica y la persistencia de la estimulación del sistema inmunológico^{58, 63, 64}.

6.2.3 El nivel de anticuerpos y su relación con:

A) La vacuna BCG:

Se reportaron resultados negativos tanto en pacientes no vacunados con BCG como en vacunados, mediante ELISA usando el antígeno A60, descartando así que la vacuna BCG contribuye en obtener resultados falsos positivos⁶⁵. El ELISA-P37 (ELISA que emplea el antígeno P37, ver Tabla 5) para casos vacunados recientemente con BCG, no reportó aumento en los niveles de anticuerpos⁶⁶. Cole *et al.* (citado en ref. 64) encontraron que 1 de 30 adultos sanos vacunados con BCG tuvo una ligera respuesta en la prueba inmunocromatográfica, la cual fue atribuida a una posible infección subclínica⁶⁴.

B) El órgano afectado por la tuberculosis

De acuerdo con los resultados de Sada *et al.*(1990)¹⁰, en un estudio de ELISA con el antígeno LAM en pacientes con tuberculosis (pulmonar, miliar, pleural y linfadenopatía tuberculosa), los pacientes con linfadenopatía tuberculosa tuvieron un índice de absorción significativamente más bajo que aquellos pacientes con TB pulmonar y TB miliar. La mayor sensibilidad se presentó en pacientes con tuberculosis miliar (82.3%) y la menor en los pacientes con TB pleural (42.8%)¹⁰. Las sensibilidades de la prueba de ELISA utilizando el anticuerpo monoclonal TB72 hacia la fracción antigénica de 38kDa (ELISA TB72 38kDa) fueron 81% en ganglio linfático, 79% en pleural/pericárdica, 75% para meníngea/cerebral, 71% en otras y 70% en huesos/articulaciones. Sin embargo, en la mayoría de los estudios donde se miden los títulos de anticuerpos no se reporta si existe el predominio en alguna de las formas de tuberculosis extrapulmonar⁶⁷.

c) Tratamiento

En pacientes con tratamiento previo, la sensibilidad del ELISA-P37 se incrementó en comparación con los casos no tratados. Se desconoce la razón de estos niveles altos de anticuerpos IgG obtenidos en pacientes tratados, pero puede explicarse por un incremento en la cantidad de antígenos liberados cuando las micobacterias están siendo destruidas por fármacos antituberculosos⁶⁶. Franco *et al.* (2001)⁶⁸, reportaron resultados similares en 5 pacientes con TB pulmonar, los

cuales mostraron reconocimiento total hacia cuatro fracciones antigénicas de 71, 65, 26-38 y 19 kDa por Inmunoelotransferencia (IET) hasta después de que se les administró tratamiento⁶⁸. Sin embargo, anteriormente Lyashchenko *et al.* (1998)⁵⁸, demostraron que la terapia antituberculosa es un factor poco probable del reconocimiento antigénico heterogéneo⁵⁸.

7. ENFERMEDAD TUBERCULOSA

La enfermedad tuberculosa se manifiesta por un gran polimorfismo con variadas localizaciones, bien pulmonares o extrapulmonares (renales, ganglionares, meníngeas, osteoarticulares, pericárdicas, entre otras, ver Tabla 3). La tuberculosis pulmonar se presenta en forma aguda, neumónica o bronconeumónica, ulcerocaseosa o infiltrativa. Podría causar una diseminación hematogena con afección miliar o meníngea, así como provocar complicaciones bronquiales. Algunos enfermos que suelen tener disminuida su resistencia pueden presentar formas extrapulmonares o destructivas consideradas como “complicaciones”⁶⁹. La frecuencia relativa de las distintas localizaciones extrapulmonares varía según la raza y el momento epidemiológico²¹.

Tabla 3. Clasificación de casos tuberculosos de acuerdo con la localización de la enfermedad⁷⁰

TUBERCULOSIS PULMONAR
TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR
Tuberculosis pleural
Tuberculosis linfática
Tuberculosis osteoarticular
Tuberculosis del sistema nervioso central
Tuberculosis genitourinaria
Tuberculosis digestiva / peritoneal
Tuberculosis miliar o diseminada
Otras tuberculosis

La confirmación del diagnóstico clínico de las formas extrapulmonares es fundamental para iniciar el tratamiento del caso y por consiguiente limitar la extensión del daño y la diseminación de *Mycobacterium tuberculosis*. En la tabla 4 se describen las características de algunos tipos de TBEP así como los métodos utilizados para su diagnóstico.

Tabla 4. Tipos de TBEP y características que incluyen al diagnóstico^{21, 39}

Tipo de TB Extrapulmonar	Características
<i>Tuberculosis pleural:</i> Pleuresía tuberculosa	Sintomatología: cuadro sistémico con fiebre y dolor pleural Examen físico: matidez hídrica, abolición de las vibraciones vocales y del murmullo vesicular y soplo pleurítico Radiología: opacidad por derrame pleural Punción pleural: líquido serofibrinoso Reacción de tuberculina: puede ser negativa Bacteriología: frecuentemente negativa Biopsia pleural con aguja: frecuentemente positiva
<i>Tuberculosis linfática:</i> Adenitis tuberculosa	Frecuentemente cervical (escrofulosis) Pocos síntomas sistémicos Evolución frecuentemente crónica (meses o años) Tendencia a la fistulización Diagnóstico depende de la biopsia quirúrgica Puede “reactivarse” en pleno tratamiento.
<i>Tuberculosis osteoarticular</i>	Compromiso monoarticular Signos inflamatorios articulares, con dolor e impotencia funcional Frecuentes abscesos fríos Diagnóstico se sospecha con la radiología Diagnóstico se confirma con cultivos o con la biopsia
Tuberculosis del SNC: <i>Meningitis tuberculosa</i>	Síntomas sistémicos inespecíficos Manifestaciones de hipertensión endocraneana Signos neurológicos variables Compromiso del sensorio en etapas tardías Meningitis de LCR claro Diagnóstico bacteriológico generalmente tardío Adenosina desaminasa (ADA) elevada en el LCR TAC y radiografía de cráneo, examen citoquímico de LCR Estudios inmunológicos del LCR
<i>Tuberculosis genitourinaria</i>	Tuberculosis renal Es la manifestación posprimaria más tardía Cuadro clínico crónico e indolente Hematuria a repetición o piurias asépticas Ultrasonido y urografía excretora con imagen compatible de ureteros rígidos. Diagnóstico se confirma con cultivos seriados de orina

Tipo de TB Extrapulmonar	Características
<i>Tuberculosis genitourinaria (continuación)</i>	<p>Tuberculosis genital masculina Compromete de preferencias el epidídimo Se asocia frecuentemente a tuberculosis renal Cuadro clínico puede ser crónico e indolente Tendencia a fistulización Diagnóstico depende de la biopsia quirúrgica</p> <p>Tuberculosis genital femenina Compromete de preferencia las trompas de Falopio Asociación infrecuente con tuberculosis renal Cuadro clínico crónico e indolente Es causa de esterilidad primaria Diagnóstico depende de biopsia de endometrio y de cultivos del flujo menstrual.</p>
<i>Tuberculosis digestiva /peritoneal</i>	<p>Peritonitis tuberculosa Síntomas sistémicos: inespecíficos Síntomas locales: dolor y ascitis Líquido ascítico: exudado linfocitario con ADA elevado Cultivos de líquido ascítico: frecuentemente positivo Diagnóstico: biopsia por laparoscopia o quirúrgica, ultrasonido o TAC.</p>
<i>Tuberculosis miliar o diseminada</i>	<p>Diseminación hematógena (a cualquier edad) Manifestaciones sistémicas y pulmonares variables Reacciones de tuberculina frecuentemente negativa Bacteriología frecuentemente negativa Diagnóstico se sospecha por radiografía de tórax Confirmación diagnóstica depende de técnicas invasivas</p>
<i>Otras formas de TB extrapulmonar: piel, ojo pericardio, oído, bazo, esófago, glándulas, etc.</i>	<p>El cuadro clínico es poco específico. En la mayoría de estas formas el diagnóstico puede establecerse con la biopsia el cultivo de las secreciones o exudados de los órganos afectados.</p>

7.1 Factores de riesgo

La tuberculosis es una enfermedad compleja, existen varios factores que favorecen su desarrollo, y la aparición de éstos varía entre individuos y entre grupos humanos, destacando los siguientes:

1. La virulencia del bacilo, que está dada por la capacidad de crecimiento, invasividad y la habilidad del microorganismo para evadir la respuesta inmunológica del hospedero.

2. La respuesta inmunitaria del hospedero, que a su vez depende de:

a) Constitución genética. Algunos individuos y grupos étnicos tienen una mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad, debido a la participación de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), estas moléculas son el producto de los genes estructurales del complejo genómico HLA, localizado en el brazo corto del cromosoma 6. Las regiones HLA se dividen en clase I, clase II y clase III, y contienen los *loci* DR, DP, DQ, DMA, DMB, DOA, entre otros.

Variaciones estructurales del MHC (sustituciones puntuales de algún aminoácido por otro con distinta carga), modifican la forma en que el antígeno es presentado a los linfocitos T cooperadores y en consecuencia la respuesta inmunológica, condicionando una mayor susceptibilidad o riesgo de contraer la enfermedad. Se demostró que en la población mestiza mexicana, la presencia de DR2 confiere susceptibilidad y está asociada a las formas graves de la enfermedad. Además se observó que los pacientes portadores de DR2 se comportan como anérgicos⁷¹.

b) Condiciones socioeconómicas. La incidencia de tuberculosis es mayor en las clases con menos recursos económicos; marginación, desnutrición, hacinamiento, falta de servicios sanitarios, agua y atención médica. Por lo tanto se encuentran en mayor riesgo de presentar tuberculosis los niños, los ancianos, los hombres de raza distinta a la blanca, los alcohólicos, los desnutridos, los infectados por VIH y los diabéticos⁷¹.

Los trastornos inmunitarios congénitos o adquiridos por enfermedades coexistentes o por tratamientos inmunosupresores, también conllevan al riesgo de tuberculosis. Diversos artículos señalan que la tuberculosis extrapulmonar tiene relación con leucemia, linfoma, diálisis y trasplante renal. La incidencia de tuberculosis miliar y extrapulmonar en pacientes con diálisis es de 50% de acuerdo a varios estudios⁷¹.

8. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Los métodos de diagnóstico para tuberculosis se dividen en dos tipos:

8.1 Diagnóstico directo

Pone en evidencia al bacilo de la tuberculosis en una baciloscopía que sólo demuestra la presencia de bacilos ácido-alcohol resistente (tinción de Ziehl-Neelsen). El cultivo en medio sólido de Lowenstein-Jensen que permite identificar género y especie. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que identifica secuencias genómicas mediante su amplificación con iniciadores específicos^{69, 72}.

Baciloscopía

La detección de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en un frotis teñido constituye la primera evidencia bacteriológica de la presencia de micobacterias en una muestra clínica (expectoración, lavado gástrico, líquido pleural, LCR y tejido) cuando existe sospecha de tuberculosis. Sin embargo, este hecho no debe ser considerado como sinónimo de tuberculosis ya que puede indicar, además de la presencia de *Mycobacterium tuberculosis*, la de micobacterias no tuberculosas e incluso de otros gérmenes con propiedades tintoriales de ácido-resistencia, como la *Nocardia spp*⁷³. Es un procedimiento rápido y sencillo, además provee al clínico con la confirmación preliminar de una micobacteriosis⁷³. Una baciloscopía positiva en conjunción con la clínica y hallazgos radiológicos puede utilizarse para un diagnóstico presuntivo de micobacteriosis⁶³.

De acuerdo con la NOM-006-SSA2-1993 la confirmación de la presencia de *M. tuberculosis* se llevará a cabo mediante bacteriología, principalmente por baciloscopía o cultivo y se debe realizar en cualquier muestra clínica (excepto orina), sin embargo en TBEP el diagnóstico es muy difícil por ser casos paucibacilares^{1, 71}. La no observación de BAAR en una muestra clínica no descarta el diagnóstico de tuberculosis, ya que es una técnica de sensibilidad limitada. Se ha demostrado que son necesarios de 5,000 a 10,000 bacilos por mililitro de expectoración para el reconocimiento en la microscopía directa^{16, 39, 73}.

La sensibilidad de la baciloscopía en tuberculosis es menor al 50% y, en particular, sólo el 37% de casos de TB meníngea son positivos⁶⁵, en LCR la sensibilidad es positiva en 10-90% de los pacientes, la sensibilidad podría mejorar si se utilizan grandes volúmenes de múltiples punciones lumbares. El BAAR en fluido pleural raramente es positivo⁷⁴, con muestras obtenidas por aspirado con aguja fina se detectaron hasta 60% de casos con linfadenopatía tuberculosa⁷⁵. En TB miliar, la baciloscopía en expectoración es positiva para el 30% de los casos y en otras secreciones fue generalmente bajo (7-22%)^{76, 77}. En orina tiene un bajo índice de positividad para el diagnóstico de TB genitourinaria. En TB espinal la bacioscopía puede ser positiva en el 50% de los casos⁷⁵.

Cultivo

Aún cuando la tinción microscópica y la valoración clínica juegan un papel importante, el cultivo positivo sigue siendo “el estándar de oro” para el diagnóstico de la tuberculosis, se emplea el medio sólido Lowenstein-Jensen tradicional, pero en ciertos casos es necesario esperar hasta 8 semanas o más para el crecimiento de los bacilos⁷⁸. El tiempo de incubación de muestras de tuberculosis paucibacilar es mucho más largo y el crecimiento puede llegar a ser negativo, debido al bajo número de bacilos en las muestras⁷⁹. El sistema radiométrico BACTEC 460 TB es un método alternativo de cultivo, requiere en promedio de 13 a 15 días para detectar especímenes verdaderos positivos. Sin embargo es muy costoso para usarse en forma rutinaria para primoaislamiento^{80, 81}.

En un estudio de casos de tuberculosis miliar, el cultivo de biopsias fue positivo hasta en 50% de las muestras mientras que el cultivo de expectoración y orina fue positivo en 52% y 67% respectivamente⁷⁷. De acuerdo con lo reportado por Hemal *et al.* (2000)⁸², el cultivo de bacilos a partir de muestras de orina para el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* fue positivo en 13 de 42 (30.95%) casos clínicos sospechosos de TB genitourinaria, esto debido a la baja carga bacilar⁸². En otro estudio mediante el cultivo de tres muestras de orina de la mañana, se estableció el diagnóstico de TB genitourinaria en el 90% de los pacientes⁷⁴.

El cultivo de fluido pleural es positivo en menos del 40% de los casos y frecuentemente se requiere de la biopsia pleural para la confirmación del diagnóstico de tuberculosis. Más del 80% de pacientes con artritis tuberculosa tienen resultados positivos en el cultivo de fluido sinovial⁷⁴, en los casos de osteomielitis se requiere de la biopsia del hueso para realizar el cultivo y el estudio histológico⁷⁵. Para el diagnóstico de TB en Sistema Nervioso Central (TB SNC), del 45 al 90% de los cultivos de *M tuberculosis* en LCR son positivos pero tienen el inconveniente de que se requieren de 4 a 6 semanas para esperar su crecimiento⁷⁴, el diagnóstico de TB peritoneal se puede realizar por cultivo de líquido de ascitis sin embargo, se reportó que su sensibilidad es menos de 10%⁷⁵, la centrifugación de 1 litro de fluido peritoneal aumenta el rendimiento⁷⁴, además el cultivo de la biopsia peritoneal es positivo en el 68%⁷⁵. El cultivo de biopsias de nodo linfático para el diagnóstico de linfadenitis tuberculosa fue positivo en 77-90% de los casos. En otros tipos de tuberculosis como la pericárdica el cultivo del fluido del pericardio usualmente es positivo en al menos el 30% de los casos y el cultivo de la biopsia reportó ser positivo en el 70-94%⁷⁵.

PCR

El uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) o amplificación de los ácidos nucleicos para la detección de *M. tuberculosis* en muestras respiratorias y otras muestras clínicas han reportado resultados prometedores. La identificación molecular para el complejo tuberculosis se realiza por medio de sondas comerciales, especialmente por la secuencia de inserción *IS6110*¹⁵.

A pesar de numerosas investigaciones, la PCR todavía no sustituye a las técnicas tradicionales de diagnóstico de tuberculosis, la sensibilidad varía entre 20 y 94% para ensayos de especímenes extrapulmonares⁷⁹. La identificación de secuencias genéticas exclusivas del agente mediante métodos basados en la tecnología de DNA recombinante, no distingue bacilos vivos de muertos⁸¹.

Además, la PCR y otros métodos moleculares son caros e inadecuados para pruebas de diagnóstico de rutina, especialmente en países en vías de desarrollo y se requiere de una cuidadosa obtención de la muestra del órgano involucrado. No obstante, los métodos moleculares superan la baja sensibilidad de la baciloscopía (60%) y el tiempo requerido para el cultivo⁵⁰.

8.2 Diagnóstico indirecto

En este apartado se incluyen métodos químicos e inmunológicos.

Medición de Adenosina desaminasa (ADA)

Este es un método químico de diagnóstico basado en la determinación de derivados del metabolismo del enfermo tuberculoso. La adenosina desaminasa es una enzima que participa en el metabolismo de las purinas y transforma a la adenosina en inosina y amoníaco. En los linfocitos T se encuentra elevada unas 30 veces con respecto a otras células, por lo cual su nivel en una muestra clínica es indicativo de la actividad de la respuesta inmunológica celular mediada por linfocitos CD4. Tiene valor diagnóstico cuando se reporta arriba de 40 unidades³⁹. Los niveles de ADA se encuentran elevados en los exudados provenientes de pleuresías, pericarditis, peritonitis y meningitis tuberculosa²¹.

Los métodos inmunológicos utilizan elementos de la respuesta inmunitaria (celular y humoral) del hospedero para inferir la presencia de infección o enfermedad y no se requiere de un espécimen del sitio de infección⁶⁴.

8.2.1 Métodos inmunológicos de tipo celular

Pruebas cutáneas

La respuesta inmunológica contra *M. tuberculosis* se puede demostrar mediante la reacción local a la aplicación intradérmica de un producto de la bacteria³⁹. La tuberculina vieja de Koch (*old tuberculin*: OT) es la elaborada mediante un filtrado de cultivo en medio líquido, esterilizado y concentrado. Contiene componentes micobacterianos y del medio de cultivo (donde crecieron los bacilos)⁶⁹. En 1939 Florense Siebert, desarrolló el PPD (Derivado Proteínico Purificado) en el Phipps Institute de Filadelfia, consiste en un precipitado de filtrados OT con sulfato de amonio (PPD-S americana) o ácido tricloroacético (PPD RT-23, de origen europeo)^{30, 69}. El diagnóstico de infección de la tuberculosis asintomática se apoya principalmente en la reacción de hipersensibilidad retardada hacia el PPD de *M. tuberculosis*. Probar la tuberculina en piel es virtualmente el único medio para identificar infección de TB latente³⁹.

Existen tres dosis diferentes de PPD disponibles, 1 unidad de tuberculina (UT), 5 UT y 250 UT. La prueba cutánea de PPD consiste en la aplicación intradérmica de 0.1 ml del derivado proteínico purificado equivalente a 2 UT de PPD RT-23 o 5 UT de PPD-S, en la región anteroexterna del antebrazo izquierdo, en la unión del tercio medio con el superior. Al cabo de 72 horas, se realiza la lectura, se observa y palpa la induración cutánea, que se mide en su diámetro mayor³⁹.

Interpretación de la prueba: En la población en general, se considera reactor al PPD a la persona que a las 72 horas de aplicar el PPD, presenta induración intradérmica de 10 mm o más, en el sitio de la aplicación de 2 UT de PPD-RT23. En menores de cinco años con o sin BCG, recién nacidos, niñas y niños desnutridos y personas inmunodeprimidas, se considera reactor a quien presente induración de 5 mm o más^{1, 39}. Si el resultado es positivo (reactor), es apoyo al diagnóstico. Si es negativo no se descarta el diagnóstico de TB. En caso de inmunodeficiencia, se requiere de un testigo en su aplicación³⁹. La prueba está indicada en estudio de contactos, apoyo al diagnóstico de tuberculosis y estudio epidemiológico en personal de salud. Algunos reportes indican que el PPD tiene muy poco valor diagnóstico, en países en vías de desarrollo, se observó un alto índice de resultados falsos-positivos en población sana y algunos pacientes con tuberculosis activa tuvieron pruebas negativas¹⁰. Los resultados falsos positivos se deben a que la tuberculina, incluso purificada, tiene una mezcla de antígenos micobacterianos que son comunes en *M. tuberculosis* y otras micobacterias atípicas⁶⁹. El 50% de una población con TB linfática mostró reactividad al PPD, mientras que en un grupo con enfermedad no tuberculosa el 13% fueron reactores⁸. En TB miliar menos del 50% de los casos resultaron positivos al PPD, en TB pleural dos tercios de los casos son PPD positivos⁷⁴.

Una reacción positiva al PPD no significa enfermedad; lo único que indica es que el individuo ha estado en contacto en algún momento de su vida con una micobacteria y que se ha sensibilizado a sus antígenos²¹. Los resultados falsos negativos pueden ser por varias causas: la caducidad del PPD, mala aplicación del PPD y/o la conservación inadecuada del biológico; que el paciente infectado

esté en el período prealérgico, que presente tuberculosis diseminada (meníngea o miliar) o enfermedades anergizantes (sarampión, rubéola, varicela, VIH, hepatitis y tosferina), que el paciente esté bajo tratamiento con inmunosupresores o esteroides, por desnutrición de tercer grado, ser menor de 3 meses de edad, cursar el primer trimestre de embarazo y por aplicación de vacunas hasta 3 meses anteriores a la prueba³⁹.

8.2.2 Métodos inmunológicos de tipo humoral

Desde 1898, se pudo demostrar que sueros de pacientes con tuberculosis podían aglutinar al bacilo. Con el desarrollo de otras metodologías inmunológicas, cada vez más simples y de fácil ejecución, se planteó la posibilidad de aplicarlas al diagnóstico serológico de la tuberculosis. El primer método con posibilidades de empleo a gran escala fue el de hemaglutinación pasiva, propuesto por Middlebrook y Dubos en 1948⁸¹.

Gran parte del éxito de un método inmunológico depende del antígeno o antígenos que se utilicen. Las moléculas purificadas resultan una mejor opción y constituyen una amplia lista en cuanto a variedades químicas y a pesos moleculares. Se han descrito moléculas predominantemente de origen proteínico pero también otras como carbohidratos, ácidos nucleicos, lípidos y moléculas combinadas⁸¹ (ver Tabla 5). Los componentes que forman parte de la pared celular de la micobacteria como son las peptidoglicanas, arabinogalactanas y lipoarabinomananas cuya complejidad les proporcionan alta inmunogenicidad son frecuentemente causa de reacciones cruzadas con otros géneros^{10, 81}.

Tabla 5. Algunos antígenos empleados en el diagnóstico serológico de TB

Antígeno	Características
Extractos solubles	Se han utilizado extractos de <i>M. tuberculosis</i> y <i>M. bovis</i> BCG en pacientes con TB activa, la sensibilidad y especificidad fue de 70.2% y 94.3% para el primer extracto y para el segundo de 91.5 % y 92.5% respectivamente ⁸³ .
Extractos de glicolípidos	Antígeno glicolípido de <i>M. tuberculosis</i> , fue usado para la detección de IgG en pacientes con TB pulmonar (baciloscopia positiva y negativa), la sensibilidad fue de 96% y la especificidad de 91%. En glicolípidos de <i>M. fortuitum</i> (di y tri-O-acil trehalosa) para detectar respuesta de anticuerpos, la sensibilidad en casos de TB activa fue > 80% y la especificidad 98% ⁶³ .
Derivado proteínico purificado (PPD)	Consta de proteínas extraídas de un cultivo de bacilos, habiéndose desechado lo que no son proteínas para evitar reacciones inespecíficas y aumentar su actividad. Existe una amplia variabilidad en los resultados del serodiagnóstico ⁸¹ .
Antígeno 5 (38 kDa)	Glicoproteína de 38 kDa, con una función de transporte de fosfatos y epítomos que han demostrado una especificidad alta y una sensibilidad variable ^{63, 81, 84} .
Antígeno A60	Antígeno citoplasmático y de naturaleza lipopolisacárida-proteínica, macromolecular termoestable, complejo activo presente en <i>M. bovis</i> o <i>M. tuberculosis</i> que se ha empleado en casos pulmonares y extrapulmonares donde mostró particular relevancia en casos de tuberculosis meníngea detectando los casos de difícil diagnóstico clínico y bacteriológico ⁸¹ .
Antígeno complejo 45/47-kDa	Proteína de secreción, antígeno purificado de cultivo filtrado de BCG y <i>M. tuberculosis</i> . Utilizado para detectar anticuerpos IgG en tuberculosis pulmonar y extrapulmonar se han obtenido valores de sensibilidad de 40% y especificidad de 98% sin considerar la clínica ⁵⁰ .
Antígeno Kp90	Antígeno de naturaleza proteínica, utilizado para medir anticuerpos IgA en pacientes con TB activa en suero y fluidos corporales, la sensibilidad fue de 82% y la especificidad de 90% ⁸¹ .
Antígeno 6 (30kDa)	Una proteína de secreción, con sensibilidad del 70% en casos pulmonares y del 14% al 22% en casos extrapulmonares ⁸¹ .
Antígeno P32	Proteína purificada de <i>M. bovis</i> BCG, este antígeno fue evaluado en pacientes con TB activa y en sujetos sanos para determinar los niveles de IgG e IgA, obteniéndose una sensibilidad de 47% ^{63, 66} .
Factor cuerda	(Trehalosa 6,6-dimicolato) purificado de <i>M. tuberculosis</i> , la sensibilidad del ELISA en pacientes con diagnóstico bacteriológico o clínico de una infección micobacteriana fue de 83% y la especificidad de 100%. En otro ELISA probado en pacientes con TB activa la sensibilidad fue de 81% y la especificidad de 96% ⁶³ .
Lipoarabinomanana	Es un inmunomodulador, la detección de anticuerpos IgG anti-LAM mostró resultados prometedores en el serodiagnóstico de TB activa ^{10, 63} .
Antígeno 85	Antígeno de secreción, compuesto multimolecular integrado por 4 moléculas de 31 kDa (85A), 30 kDa (85B), 31.5 kDa (85C) y de 27kDa ⁸¹ .

Prueba inmunocromatográfica

Este tipo de prueba serológica combina una reacción inmunoenzimática con la cromatografía en flujo lateral, ya que por capilaridad fluye el líquido biológico hasta encontrar su respectivo antígeno o anticuerpo y manifestarse como una reacción colorida. El uso que tiene esta prueba para diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar es aún muy limitado. La prueba inmunocromatográfica-Tuberculosis (ICT-TB) basada en la detección de anticuerpos contra el antígeno de 38 kDa mostró una especificidad del 83.3% pero no fue suficientemente predictiva para su aplicación clínica en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar⁸⁵.

Inmunolectrotransferencia (IET)

Su utilización más frecuente está orientada a la identificación de aquellos antígenos dentro de una mezcla que son reconocidos por los anticuerpos presentes en el suero de individuos afectados por padecimientos infecciosos³⁶.

Permite identificar antígenos inmunodominantes reconocidos por anticuerpos específicos provenientes del paciente. La IET combina el poder resolutivo de la electroforesis en geles de poliacrilamida, que separa moléculas de acuerdo a su peso molecular y carga, las cuales a su vez son electrotransferidas a papel de nitrocelulosa para posteriormente llevarse a cabo el reconocimiento antígeno-anticuerpo en la fase sólida. Esta reacción se hace evidente por la adición de un segundo anticuerpo marcado con una enzima y de un cromógeno que genere un producto coloreado e insoluble que conducirá a la formación de precipitados en forma de bandas coloreadas en la zona de interacción antígeno-anticuerpo^{36, 81, 86}.

En ésta metodología se han empleado diferentes antígenos desde los extractos crudos hasta las fracciones purificadas o antígenos recombinantes para el diagnóstico serológico de tuberculosis. El uso simultáneo de diferentes antígenos purificados puede mejorar la sensibilidad de tal ensayo⁵⁰. Fracciones individuales obtenidas por IET han sido utilizadas en el serodiagnóstico de TB. Diagbouga *et al.* (1997)⁵⁰, reportaron una sensibilidad de 40% y especificidad de 98% usando la proteína de secreción de *M. tuberculosis* de 45-47 kDa para detectar la presencia de anticuerpos IgG en sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar (n=67) y extrapulmonar (n=15)⁵⁰.

Franco *et al.* (2001)⁶⁸, mediante IET hacia cuatro fracciones antigénicas proteínicas de 71, 65, 26–38 y 19 kDa de un sonicado antigénico de *M. tuberculosis*, encontraron una respuesta completa en el 60% de pacientes con TB pleural (n=5) ⁶⁸. Hong *et al.* (1999)⁸⁷, utilizaron como antígenos proteínas recombinantes en IET y encontraron que los rangos de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN fueron 20-58%, 88-100%, 69-100% y 56-71% respectivamente, demostrando potencial en el diagnóstico de TB pulmonar y extrapulmonar⁸⁷.

Mediante IET se encontró una molécula inmunodominante de bajo peso molecular a partir de un extracto soluble de *M. tuberculosis* H37Rv que es reconocida por sueros de pacientes con TB pulmonar denominada fracción 4MT mostrando una sensibilidad de 72.4% y especificidad igual a 72.3% ⁸⁸. Sin embargo, para otros tipos de TBEP (excepto para TB meníngea) no se han hecho estudios, es por esto la importancia de este trabajo, en el que se evaluó a la IET como herramienta para el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar. Si bien, las investigaciones sobre la tuberculosis pulmonar son abundantes, se conoce poco sobre la prueba de IET realizada en muestras serológicas de pacientes con TBEP.

ELISA

El método más empleado en tuberculosis es sin duda el ELISA (del inglés *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) donde se emplean anticuerpos marcados con una enzima, los cuales reaccionan directamente con su antígeno presente en una muestra clínica (método directo, usado en la detección de antígenos) o con las inmunoglobulinas de una muestra problema que previamente se combinaron con su antígeno (método indirecto, empleado para la búsqueda de anticuerpos)⁸¹. La magnitud de la interacción antígeno-anticuerpo se manifiesta mediante una reacción colorida que depende de la reacción óxido-reducción de la enzima presente en el sistema. Como ejemplo de este método está el ELISA indirecto para la detección de anticuerpos contra *M. tuberculosis* que se utiliza en el Departamento de Investigaciones Inmunológicas del InDRE. Se parte de un extracto soluble de BCG (cepa danesa ATCC 1331 de 5-6 semanas de cultivo, rota por ultrasonido y extraída en solución salina amortiguada) que se adsorbe a la superficie de pozos en la placa de microtitulación; se adicionan diluciones de suero problema (o de otros materiales clínicos como es el líquido cefalorraquídeo) y si existen anticuerpos específicos, la reacción entre ambos se identifica con un conjugado anti-inmunoglobulinas humanas marcado con peroxidasa. Como sustrato se utiliza orto-feniléndiamina-peróxido de hidrógeno, la lectura se efectúa a longitud de onda de 492 nm y se reporta el resultado con respecto a un valor de corte. Si el valor obtenido en el problema es menor a ese valor de corte, entonces el resultado es negativo y si es igual o mayor se informa como positivo⁸¹. Los parámetros obtenidos para esta prueba fueron: sensibilidad 91.5% y especificidad 92.5%⁸³.

8.3 ELISA como prueba diagnóstica en TB Extrapulmonar

Se han realizado algunos estudios respecto al diagnóstico de la TBEP mediante ELISA, los cuales muestran algunas variantes, como la calidad del antígeno, el uso de anticuerpos secundarios y diferentes muestras biológicas con el fin de incrementar la sensibilidad y especificidad de la prueba para la detección oportuna de casos. Entre estos trabajos podemos citar un ELISA para determinar anticuerpos IgG en diferentes fluidos corporales (líquido pleural, ascitis y líquido cefalorraquídeo) que reconocen un antígeno de 43kDa de *M. tuberculosis*. Los

resultados muestran los mejores valores operativos al emplear líquido cefalorraquídeo (sensibilidad ~100% y especificidad 95.7%), para líquido pleural y ascitis especificidad del 98.1%⁶³.

La respuesta de los anticuerpos hacia el antígeno de 38kDa fue relevante en 73% de los pacientes con TB extrapulmonar, comparable con el 70% de casos con TB pulmonar baciloscopia negativa. En cuatro grupos de pacientes con estados variables de TB neurológica confirmada (examinados *post mortem*, clínicamente sospechosos, cultivo positivo y con presencia de tuberculoma), se detectaron anticuerpos en LCR contra el antígeno de 38kDa en el 60%, 80%, 62.5%, y 0% de los pacientes, respectivamente⁶³.

La detección del antígeno de 30kDa mediante ELISA usando un anticuerpo monoclonal fue hecha en el suero de 51 pacientes africanos con infección pericárdica tuberculosa diagnosticada clínicamente, de los cuales 25 tenía confirmado el cultivo en fluido pericárdico. La sensibilidad fue de 61% y la especificidad de 96%⁶³. Zou *et al.* (1994)⁵⁵, mostraron que la IgG contra el antígeno A60 estaba presente en 88.5% de los pacientes con TB reactiva y en el 69-86% de pacientes con TB extrapulmonar. Similarmente, Luch *et al.* (citado en ref. 63), encontraron que la sensibilidad para IgG anti-A60 fue de 76% para TB pulmonar y de 59% para pacientes con TB extrapulmonar. Comparando pacientes pediátricos positivos a TB pulmonar con otros con TB extrapulmonar, la respuesta de los anticuerpos IgG hacia glicolípidos fue significativamente menor en estos últimos⁶³. Gupta *et al.* (citado en ref. 63), revelaron que la sensibilidad de IgA e IgM contra el antígeno A60 fue 72.4% en pacientes con TB pulmonar y de 76.6% en pacientes con TB extrapulmonar. En pacientes hindúes con TB pulmonar y extrapulmonar el índice de sensibilidad de los anticuerpos IgA e IgG contra A60 fue 98.3% para TB pulmonar, 88% para TB pleural y 86% para TB extrapulmonar. En general los ensayos para anticuerpos contra antígenos micobacterianos en suero o fluidos corporales de pacientes con TB extrapulmonar tienen un gran potencial⁶³.

9. ASPECTOS IMPORTANTES DE LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS

El método serológico debe ser seleccionado de acuerdo con los propósitos de diagnóstico y los volúmenes esperados de muestras⁸¹. El resultado no depende solamente de la prueba sino también influyen las características de la población en la cual se propone su uso. En una población con baja prevalencia, la prueba no puede usarse para la identificación de casos. La mayoría de las pruebas de diagnóstico de enfermedades micobacterianas se realizan en población preseleccionada, usualmente en personas que presentan síntomas característicos⁶¹.

9.1 Ventajas de las pruebas serológicas en el diagnóstico

El uso de las pruebas serológicas es especialmente importante cuando fallan los demás métodos convencionales para el diagnóstico, tal como sucede en baciloscopías negativas y en la enfermedad extrapulmonar. También podrían complementar el diagnóstico de casos infecciosos (baciloscopía positiva), siempre y cuando los sujetos sanos no produzcan anticuerpos hacia los antígenos que se utilicen en las pruebas mencionadas⁵².

La serología es útil para monitorear el nivel de anticuerpos: en convivientes con el caso que conseguirían beneficiarse con quimioprofilaxis, en la evaluación de la eficiencia de nuevas vacunas contra la tuberculosis y en pacientes quienes recibieron un tratamiento, ya que podrían mostrar un aumento de la respuesta inmunitaria humoral contra antígenos micobacterianos debido a un incremento en el crecimiento de bacilos tuberculosos cuando fracasa el tratamiento o bien cuando se presenta farmacorresistencia⁵². Además estas pruebas son fáciles de implementar, su bajo costo las hace muy útiles en situaciones donde los recursos económicos y técnicos son limitados y permiten el diagnóstico temprano y oportuno que favorece la toma de decisión sobre el tratamiento en casos paucibacilares, pulmonares no productivos y en extrapulmonares⁸¹.

9.2 Desventajas de la serología en el diagnóstico

La presencia de anticuerpos contra *M. tuberculosis* implica el contacto con dicha bacteria en algún momento de la vida del sujeto que los posee. Esta situación no es igual en sujetos inmunodeficientes, especialmente si la causa es la infección con el VIH, en quienes la susceptibilidad a la tuberculosis se encuentra definitivamente aumentada por estar directamente afectada la respuesta mediada por células T. En estos casos el curso de la enfermedad generalmente es atípico y también puede verse alterada la respuesta de anticuerpos, de modo que el uso de métodos serológicos de diagnóstico debe ser tomado con mucha cautela⁸¹.

En la serología de la tuberculosis se han empleado una amplia gama de métodos. Tanto por limitaciones del formato como por la intención de los propios autores, en muchos métodos sólo se busca la respuesta total de anticuerpos, es decir de todos los isotipos de inmunoglobulinas por igual, en tanto que en otros si se hace deliberadamente la selección de alguno en particular, generalmente IgG y ocasionalmente IgA. Los resultados obtenidos varían mucho en su sensibilidad (porcentaje de sujetos con resultado positivo verdadero) y su especificidad (porcentaje de sujetos con resultado negativo verdadero) según las condiciones utilizadas por cada autor⁸¹. Un problema importante en el desarrollo de una prueba serodiagnóstica para tuberculosis es la identificación de un antígeno o colección de antígenos, que proporcionen la sensibilidad y especificidad deseada⁸¹. Especialmente en la cantidad de antígeno utilizado⁵⁶.

10. SOLUCIONES PARA ELEVAR LA CALIDAD DE LOS ANTÍGENOS UTILIZADOS

Por medio de técnicas específicas se purifican antígenos citoplásmicos, ribosomales, de la pared celular y antígenos secretados en cultivo filtrado de *M. tuberculosis* que son utilizados en pruebas serológicas de vanguardia ya que estas demandan el uso de antígenos altamente específicos y así ofrecer baja reactividad cruzada con otras micobacterias.

Algunos antígenos peptídicos purificados, sintetizados de alguna secuencia de proteínas conocida evitan exponer epitopos múltiples que son reconocidos por anticuerpos, los cuales originan la reacción cruzada que afecta la especificidad de la prueba serológica empleada. Sin embargo la pérdida de epítomos conformacionales afecta significativamente su sensibilidad⁵².

10.1 Anticuerpos monoclonales (AcMo)

El uso de anticuerpos monoclonales (AcMo) se ha incrementado para mejorar los métodos serodiagnósticos ya que son dirigidos hacia moléculas específicas de *M. tuberculosis*. Un AcMo proviene de la fusión de células plasmáticas antígeno específicas con líneas celulares inmortales, los hibridomas resultantes tienen la característica de ser homogéneos y altamente específicos. Algunos reportes muestran el uso de AcMo en ELISA para detectar anticuerpos o antígenos en fluidos biológicos^{52, 67}. La más inquietante innovación en la serología de tuberculosis ha sido el desarrollo de un ensayo competitivo, el cual puede medir títulos de anticuerpos que reconocen segmentos de un antígeno que coincide con el sitio de unión del anticuerpo monoclonal⁵².

10.2 Liposomas

Los liposomas son estructuras vesiculares cerradas (Figura 5) que forman algunos lípidos anfipáticos cuando se encuentran dispersos en un medio acuoso. Los liposomas se describieron por primera vez por Bangham en 1965, su tamaño varía de 25 nm a 5 µm de diámetro y se clasifican dependiendo del número de bicapas lipídicas que contienen: vesículas unilamelares (LUL) y multilamelares (LML), estas últimas miden de 1 a 5 µm. Las vesículas unilamelares se dividen en pequeñas de 25 a 50 nm, y en grandes de 150 a 900 nm. Se han empleado como transportadores de enzimas, hormonas, vitaminas, ácidos nucleicos, polinucleótidos, fármacos y plásmidos al interior de células, no sólo en cultivo sino en un animal íntegro. Para poder dirigir los liposomas en forma específica a un tejido u órgano en particular, se les han unido anticuerpos, glicoproteínas o glicolípidos específicos a su superficie^{89, 90}.

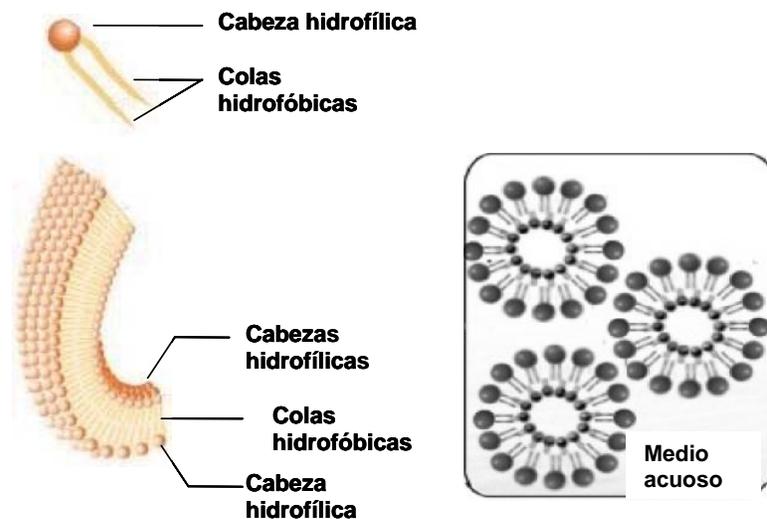


Figura 5. Representación de un liposoma.

Existen al menos dos tipos de direccionamiento a los órganos blanco con relación a los liposomas: el pasivo y el activo. En el modo pasivo, el liposoma no modificado es reconocido por células del sistema retículo endotelial, por ejemplo: los macrófagos. Al ser reconocidos, son eliminados pasivamente por estos macrófagos, resultando especialmente útiles en enfermedades que afectan el

sistema retículo endotelial precisamente. En cuanto al modo activo, se trata simplemente de ligar, de modo covalente o no, diferentes sustancias a la superficie del liposoma: lectinas, enzimas, proteínas, azúcares entre otras. De esta manera, se exhorta a la presentación de dichas sustancias a las células pertinentes, resultando en una enorme producción de anticuerpos⁹¹.

Asociaciones moleculares lipídicas diferentes a la bicapa

Estudios de difracción de rayos X de los fosfolípidos y glicolípidos membranales, han demostrado que los lípidos membranales tienen diferentes formas moleculares, es decir, tienen una geometría molecular característica⁸⁹ (Figura 6).

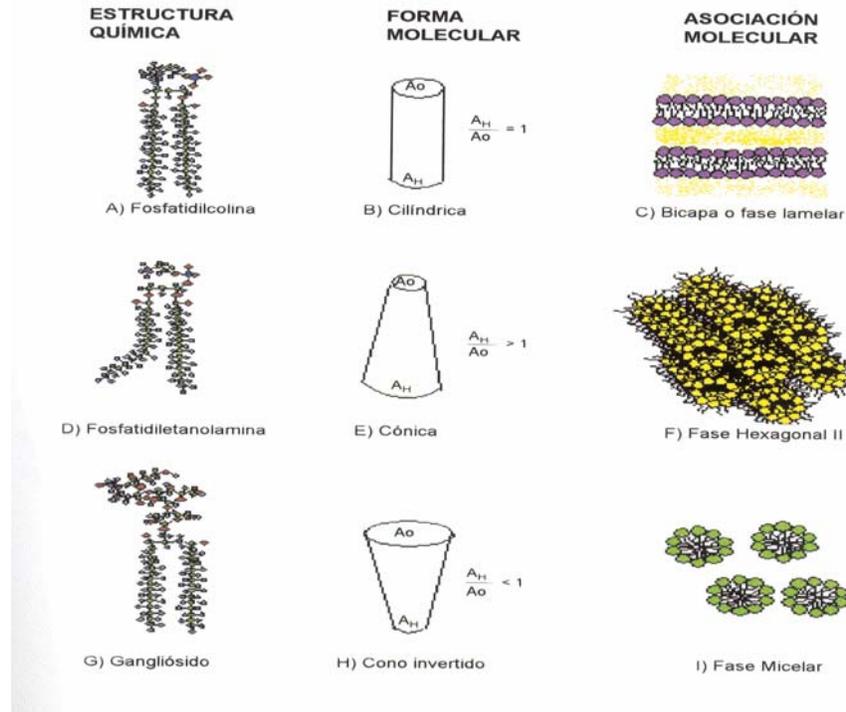


Figura 6. Clasificación de los fosfolípidos y los glicolípidos con base a su forma molecular. La forma molecular depende de la estructura química del lípido y determina su asociación molecular, o fase, en el medio acuoso (Baeza *et al*, 1998)⁸⁹.

Las formas moleculares resultantes son cilíndricas, cónica y de cono invertido. Los lípidos cilíndricos, como el fosfatidato, el fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, la fosfatidilcolina, la fosfatidilserina, y la cardiolipina, se asocian en el medio acuoso en bicapas cerradas o liposomas y constituyen del 60 al 70% de lípidos de la membrana celular. Las diferentes formas moleculares de los lípidos son dinámicas, es decir pueden cambiar entre sí bajo diferentes condiciones y al cambiar la forma molecular de los lípidos, cambia su asociación molecular en el medio acuoso. A la propiedad de asociarse en diferentes arreglos moleculares en virtud de su forma molecular se le conoce como polimorfismo lipídico^{89, 92}.

En general, los lípidos son moléculas poco inmunogénicas comparadas con las proteínas, los carbohidratos y los ácidos nucleicos. De las dos asociaciones moleculares que pueden presentar las membranas, se considera que la bicapa es la menos inmunogénica porque es precisamente la que constituye la matriz lipídica de las membranas celulares. Las asociaciones lipídicas diferentes a la bicapa también son poco inmunogénicas, debido a que son transitorias y por ello no son detectadas por el sistema inmunológico; sin embargo, es posible que al ser estabilizadas por un factor, se induzca la formación hacia estas estructuras lipídicas. En una serie de enfermedades humanas se ha descrito la presencia de anticuerpos antilípidos que origina el Síndrome anti-fosfolípido^{93, 94}.

10.3 La fracción 4MT

Es un complejo multimolecular de naturaleza lipídica, fue identificado por corrimiento electroforético de un extracto soluble de *Mycobacterium tuberculosis* (ESMTB) H37Ra en un gel de poliacrilamida al 18%, que al teñirse bien con Sudán negro y no con Azul de Coomassie se estableció su carácter lipídico. Se reveló como una banda de peso molecular aproximado a **4kDa**. La semipurificación de la fracción 4MT con solventes orgánicos a partir de masa bacilar de *M. tuberculosis* H37Ra ha sido de gran utilidad para usar a esta fracción como fuente de antígeno. Al analizar su composición bioquímica por cromatografía en capa fina con ayuda de diferentes reveladores se identificaron: lípidos totales (con yodo), lípidos asociados a grupos fosfato (con molibdato), lípidos neutros (con bismuto) y lípidos asociados a grupos amino (con ninhidrina), con diferente polaridad e hidrofobicidad⁹³. Esta fracción se propuso como marcador serológico de anticuerpos (IgG) en pacientes con tuberculosis pulmonar por Inmunolectrotransferencia mostrando una sensibilidad de 72.4% y especificidad igual a 72.3%⁸⁸.

Se construyeron liposomas con la fracción 4MT sola y asociada a fosfatidilcolina (lecitina), que fueron observados por medio de microscopía electrónica de transmisión. Los liposomas elaborados con fosfatidilcolina y 4MT (LPC-4MT) fueron utilizados como antígenos en ELISA para identificar la respuesta de anticuerpos IgG en sueros de pacientes con tuberculosis Pulmonar y se obtuvo para el ELISA liposomal una sensibilidad de 71.23% y especificidad de 94.52%, mientras que para el ELISA-4MT: 80.82% y 93.15% respectivamente^{93, 95}.

Dado que el uso del antígeno 4MT como marcador de enfermedad en casos pulmonares fue muy útil, se buscó determinar si lo era para la población de pacientes con tuberculosis extrapulmonar, donde se necesita identificar de manera oportuna a estos casos, empleando métodos serológicos de fácil empleo sin recurrir a técnicas invasivas como la biopsia o lavado broncoalveolar.

JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico clínico de casos con tuberculosis extrapulmonar es complejo debido a la presencia de sintomatología similar a otros padecimientos no infecciosos y que afectan a los mismos órganos, además es difícil la confirmación bacteriológica de *M. tuberculosis* debido a la baja carga bacilar en la zona afectada por lo que se requiere de procedimientos invasivos como biopsias para evidenciar la presencia de bacilos. Por lo tanto, en este estudio se desarrollaron técnicas serológicas que pueden proponerse como herramientas de apoyo para el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar, que permitan identificar de forma temprana posibles casos y así ofrecer un tratamiento oportuno.

HIPÓTESIS

La respuesta inmunológica humoral, en pacientes con tuberculosis extrapulmonar, reconoce antígenos de *M. tuberculosis* de tipo proteínico (ESMTB), lipídico (4MT) y en liposomas, útiles para la validación de una prueba de diagnóstico serológico.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar las técnicas Inmunoelectrotransferencia, ELISA anti-lípido 4MT y ELISA liposomal para su uso como herramientas de apoyo para el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Realizar un método inmunoenzimático (Inmunoelectrotransferencia) en papel que indique el reconocimiento de anticuerpos IgG en sueros de pacientes con tuberculosis extrapulmonar hacia la fracción 4MT presente en un extracto soluble de *M. tuberculosis*.
- ✓ Desarrollar un ELISA que identifique los anticuerpos IgG en sueros de pacientes con tuberculosis extrapulmonar hacia la fracción lipídica 4MT disuelta en etanol e incluida en liposomas con fosfatidilcolina.
- ✓ Obtener los parámetros operativos para cada técnica empleada utilizando una población que incluye sujetos aparentemente sanos y sujetos con TBEP (cultivo; BAAR confirmado; diagnóstico clínico).
- ✓ Analizar los resultados y proponer la mejor técnica para que sea utilizada como herramienta de apoyo en el diagnóstico de la enfermedad.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se estudiaron 267 sueros de individuos adultos:

- 73 sueros de donadores altruistas clínicamente sanos provenientes de un banco de sangre, a quienes se les aplicó un cuestionario y ninguno indicó antecedentes de infección micobacteriana.
- 194 sueros de pacientes provenientes del Hospital General de México determinados clínicamente como TBEP (pleural, linfática, osteoarticular, SNC, genitourinaria, digestiva/peritoneal, diseminada y TB otras).

Estos sueros se estratificaron de la siguiente manera:

Grupo 1. Consistió de 16 sueros de pacientes que mostraron cultivo positivo para *M. tuberculosis* confirmado. Estos fueron clasificados de acuerdo a la localización anatómica del padecimiento en: TB linfática (n=3), TB genitourinaria (n=8), TB diseminada (n=3) y TB otras (n=2). De los cuales 9 tuvieron también BAAR positivo.

Grupo 2. Formado por 21 sueros de sujetos con baciloscopía positiva, mismos que se clasificaron en los conjuntos de TB linfática (n=1), TB osteoarticular (n=2), TB genitourinaria (n=11, uno de ellos con cultivo negativo), TB digestiva/peritoneal (n=1), TB diseminada (n=2) y TB otras (n=4).

Grupo 3. Comprende 157 sueros de sujetos sólo con diagnóstico clínico de tuberculosis extrapulmonar (sin estudios bacteriológicos). Clasificados como: TB pleural (n=14), linfática (n=42), TB osteoarticular (n=5), TB SNC (n=8), TB genitourinaria (n=21), TB digestiva/peritoneal (n=9), TB diseminada (n=41) y TB otras (n=17).

MÉTODOS

A) Diseño de la investigación

Tipo de estudio: Observacional, transversal y retrospectivo.

Criterios de inclusión y exclusión

Inclusión

Sueros de sujetos adultos con sospecha de tener algún síntoma relacionado con tuberculosis extrapulmonar.

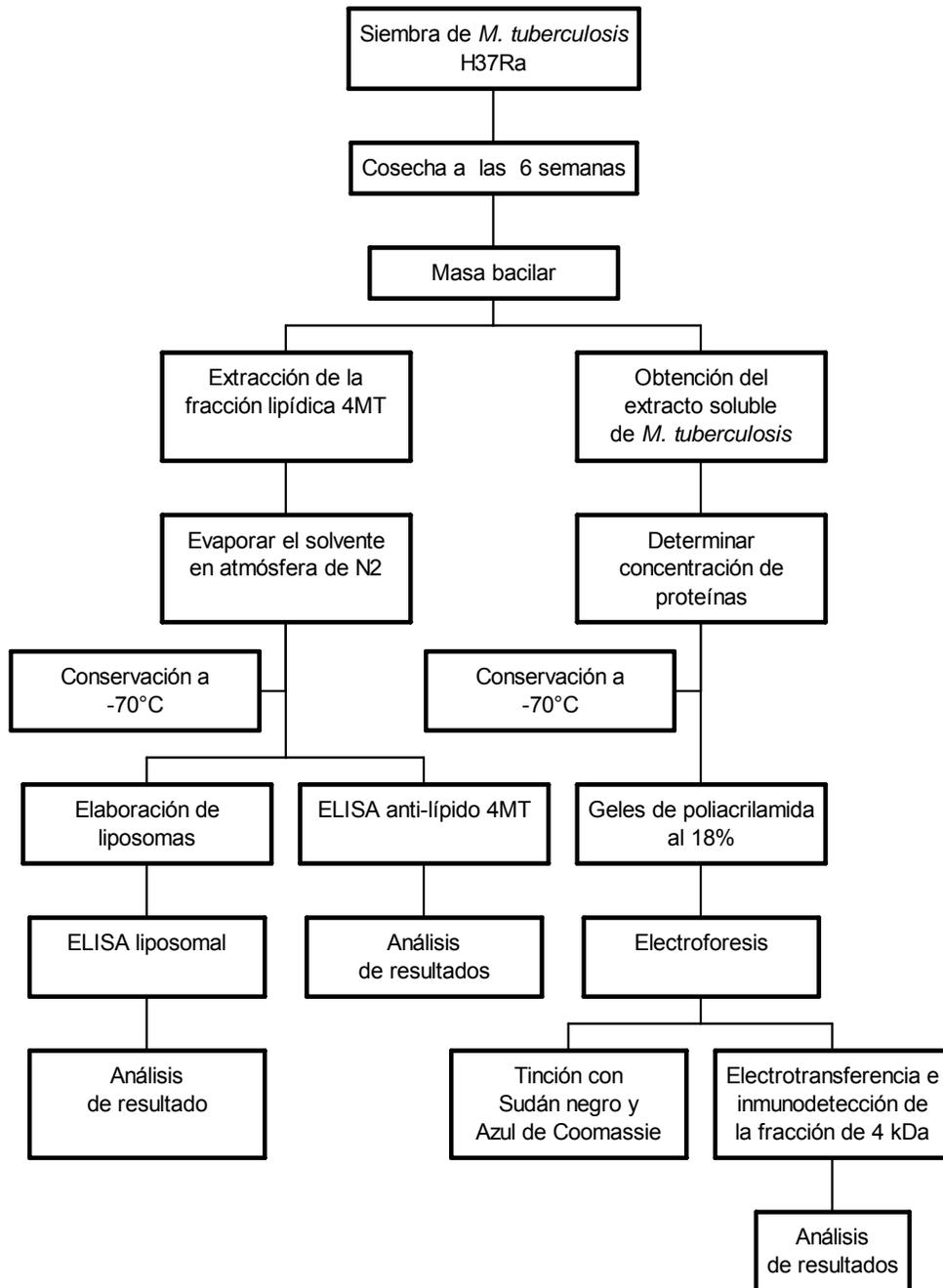
Exclusión

Sueros de sujetos VIH positivos y población infantil.

Variables

- ✓ Grupos de sueros en estudio clasificados de acuerdo a sus datos bacteriológicos reportados.
- ✓ Grupos de sueros en estudio según el tipo de tuberculosis.
- ✓ Presentación estructural o conformacional de la fracción 4MT de origen lipídico para ser utilizado en las dos variantes del ELISA.
- ✓ Reconocimiento de los anticuerpos humanos hacia antígenos con variable naturaleza bioquímica (ESMTB, la fracción lipídica 4MT (disuelta en etanol) e incluida en liposomas con fosfatidilcolina).

B) Diseño experimental



C) Procedimiento experimental

I. PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO

Debido a que el bacilo de *M. tuberculosis* es un patógeno de alto riesgo se deben tomar ciertas medidas de seguridad en el laboratorio (ver Anexo 1).

Obtención de los bacilos

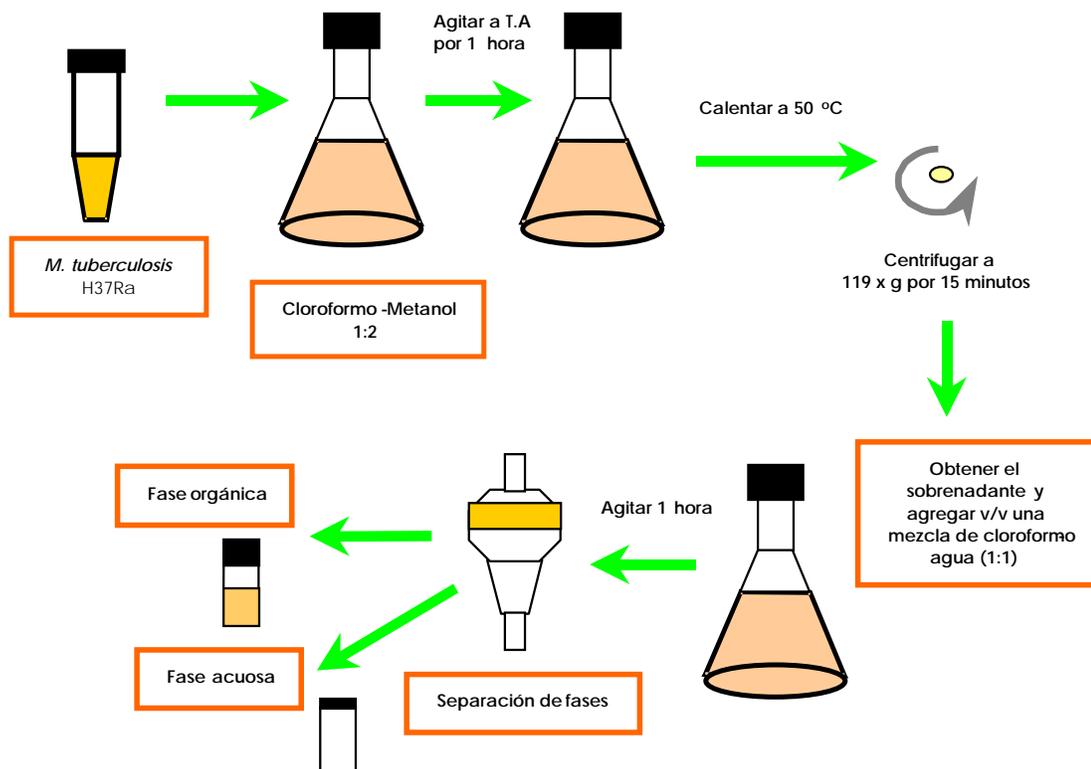
El antígeno se obtuvo a partir de *M. tuberculosis* cepa H37Ra (no virulenta) en medio de cultivo Sauton a pH 7.2 (ver Anexo 2), incubado por 6 semanas a 37 °C. Los bacilos cultivados se recolectaron mediante filtración con papel Wathman y se lavaron 3 veces con solución salina al 0.85%. Luego se hicieron alícuotas de aproximadamente 20 ml de la masa bacilar en tubos de poliestireno con tapa de rosca y se conservaron a -70 °C (Ultracongelador VWR) hasta su uso^{88, 93}.

Obtención del extracto soluble

Una alícuota de la masa bacilar fue sumergida en hielo y sonicada (Sonicador *Cell Disruptor Model W-370*, Heat Systems Ultrasonics) durante 10 minutos a 118 watts (en intervalos de 1 minuto de sonicación). Después se centrifugó a 948 x g (Microcentrífuga *HERMLE Z 252M*) durante 20 minutos a 4 °C. Se colectó el sobrenadante, desechando el precipitado, este sobrenadante se filtró en poro 0.8, 0.45 y 0.22 µm para obtener el extracto soluble de *M. tuberculosis* (ESMTB). Posteriormente se determinó la concentración de proteínas del extracto por el método de Lowry (ver anexo 3), en este caso en particular se obtuvo una concentración de 10 mg/mL. Luego se dividió en alícuotas y se conservaron a -70 °C hasta su uso^{88, 93}.

Obtención del extracto lipídico

Una alícuota de 20 mL de masa bacilar (previamente descongelada y centrifugada) se vertió en un matraz Erlenmeyer con tapa de baquelita y se le agregaron 75 mL de una mezcla de cloroformo (*Sigma-Aldrich*)-metanol (*Fisher Scientific*) (1:2), posteriormente se agitó (Agitador mecánico *VWR Scientific*) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubó en baño maría a 50 °C (Baño María *Fisher Scientific*) durante 18 horas y luego fue centrifugado a 119 x g por 15 minutos (Centrífuga *Damon/ IEC*). Se recuperó el sobrenadante y se le agregó un volumen equivalente de una mezcla de cloroformo-agua (1:1), luego se agitó una hora a temperatura ambiente, enseguida se vertió la mezcla en un embudo de separación manteniéndola en reposo (24 horas) hasta la obtención de las dos fases. La fase orgánica, rica en 4MT fue recuperada.



Formación de lotes del antígeno 4MT de *M. tuberculosis* H37Ra

El lote de antígeno 4MT se separó en viales previamente pesados para después agregarles 2 mL de la fracción disuelta en cloroformo. Se evaporó el solvente con atmósfera de nitrógeno (*Infra*), para luego determinar el peso seco de cada alícuota por diferencia de peso y así conservar la fracción lipídica a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso^{88, 93}. La cantidad de 4MT se expresó en miligramos por vial. Ejemplo:

No. de vial	Peso inicial	Peso final	Peso del antígeno 4MT
1	6.1822 g	6.2256 g	43.4 mg

Preparación de liposomas

Los liposomas se forman por un método de evaporación en fase inversa con agitación mecánica constante en un matraz de dos bocas, por una entra aire y por otra se hace vacío a 10 atmósferas de presión (Baeza *et al.*, 1998)⁸⁹.

Para preparar los liposomas LPC-4MT (formados por fosfatidilcolina y 4MT) se tomó una alícuota del extracto lipídico 4MT y se ajustó la concentración a 10mg/ml* con cloroformo (*Sigma-Aldrich*). Luego se tomaron 600 μL (6 mg) de esta mezcla y 20 μL (2 mg) de fosfatidilcolina (L- α lecitina *Sigma*) depositándose en el matraz y se agitó en un vórtex hasta evaporar el cloroformo, posteriormente los lípidos se disolvieron en 1000 μL de éter dietílico con agitación y se adicionaron 300 μL de PBS, se agitó por 45 segundos y se aplicó vacío para evaporar todo el éter dietílico, finalmente la suspensión de liposomas (de color blanco) se llevó a un volumen de 1000 μL con PBS.

La concentración final de liposomas en PBS fue de 8 mg/mL⁹⁵. Por lo general los liposomas se prepararon el mismo día en que se utilizaron o se conservaron en refrigeración durante períodos no mayores de 24 h.

* De acuerdo al peso en mg de la 4MT se le adicionó la cantidad en mL de cloroformo para lograr una concentración de 10 mg/ml.

II. TÉCNICAS

Electroforesis en geles de poliacrilamida al 18% (SDS-PAGE)

Se lavaron los vidrios de las cámaras de electroforesis (*BIORAD Protean II*) con detergente neutro líquido (extrán), secando al aire o con lavados de etanol. Se armaron los vidrios formando un “sándwich” con los separadores, se ajustaron y colocaron en sus respectivos soportes. Los reactivos para preparar geles (ver Anexo 2) se usaron a temperatura ambiente y el persulfato de amonio (*Sigma*) al 10% se preparó justo antes de usarse. Se agregaron los reactivos en un matraz limpio en el siguiente orden para formar el gel separador:

Componente del gel separador	Cantidad para dos geles chicos
Acrilamida (<i>BIORAD</i>) 37% T 0.5% C _{bis}	9.07 mL
Agua destilada	1.75 mL
Glicerol (<i>Sigma</i>) al 10%	1.7 mL
Amortiguador del gel separador	4.24 mL
SDS (<i>BIORAD</i>) al 10%	170 µL
Persulfato de amonio al 10%	48 µL
TEMED (<i>Sigma</i>)	24 µL

Una vez hecha la mezcla, se vertió en los compartimientos correspondientes. Después se agregaron ~200 µL de isopropanol, lo cual permitió observar la formación del límite superior del gel separador. El tiempo en gelificar para un gel chico fue de aproximadamente 20 minutos. Se lavó con agua para retirar el isopropanol y se secó con papel filtro. Luego se hizo la mezcla para formar el gel concentrador y se vertió hasta el borde superior de los vidrios colocando el peine deseado.

Componente del gel concentrador	Cantidad para dos geles chicos
Acilamida (<i>BIORAD</i>) 39.4% T 4.8% C _{bis}	2.52 mL
Agua destilada	3.82 mL
Glicerol al 10%	1.0 mL
Amortiguador del gel concentrador	2.5 mL
SDS (<i>BIORAD</i>) al 10%	100 µL
Persulfato de amonio al 10%	30 µL
TEMED (<i>Sigma</i>)	24 µL

Al término de la gelificación se retiraron los peines y se lavaron los geles con agua. Luego se ensamblaron los "sandwiches" de vidrio en el soporte que contiene los electrodos. Se agregó el regulador de corrimiento en los 2 tanques de la cámara, el regulador interior debe ser nuevo en cada corrida y el exterior puede usarse 3 veces.

Se prepararon las cantidades correspondientes del extracto antigénico (ESMTB H37Ra [10 mg/mL]) ajustando a una concentración de 200 µg/mL en un vial y se agregó un volumen igual de regulador de muestra. Posteriormente se colocó en una gradilla y se dejó hervir durante 90 segundos. Luego se colocaron 2.5 µL de los marcadores de peso molecular preteñidos *GIBCO* (2.9-44 kDa) y el extracto antigénico en el o los carriles deseados.

Se ajustó la corriente (Fuente de poder *BIORAD*) para un gel: en el gel concentrador 10 mA durante 1 hora y para el gel separador 20 mA durante el resto del corrimiento (aproximadamente 3 horas). Se procedió a teñir (con azul de Coomassie y/o Sudán negro) o bien a transferir (Equipo de electrotransferencia *BIORAD*), en papel de nitrocelulosa (*BIORAD*) (ver Anexo 2)⁸⁶.

Electrotransferencia

En un recipiente con una cantidad suficiente del regulador de transferencia a pH 8.3 se remojaron esponjas, papel filtro y el papel de nitrocelulosa, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se sacaron los geles de los vidrios y dentro de otro recipiente que contenía el mismo regulador se hizo el ensamblado de los cassettes de la siguiente manera: la esponja, papel filtro, el papel de nitrocelulosa y el gel. Se alineó el papel de nitrocelulosa con el gel, marcando con lápiz el papel para reconocer los límites y orientación del gel, revisando perfectamente que entre ellos no existieran burbujas y se cubrió con papel filtro y esponja, completando así el ensamblado de los cassettes. Cada uno de estos se incorporó al tanque de la cámara de transferencia el cual se llenó con el regulador de transferencia y un refrigerante previamente congelado. La transferencia se realizó durante 1 hora a 100 Volts o bien toda la noche a 80 mA. La cámara de transferencia se colocó sobre un agitador magnético para dispersar el calor generado por el voltaje⁸⁶.

Inmunodetección

Una vez realizada la transferencia, se sacaron los cassettes y se tomó el papel de nitrocelulosa transferido, se tiñó con rojo de Ponceau S (*Sigma*) para verificar la correcta transferencia y después se destiñó con agua. Posteriormente fueron colocados en un recipiente con PBS-Tween₂₀ 0.1% y se hicieron 2 lavados de 5 minutos cada uno. Se bloqueó la membrana con la mezcla PBS-leche 5%-Tween₂₀ 0.1% durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Se lavó 5 veces (5 min c/u) con PBS-Tween₂₀ de concentración 0.1%. Se cortaron las tiras de papel de nitrocelulosa según el número de sueros por probar, y se colocaron en bases con divisiones o carriles, se hizo la dilución 1:500 de cada uno de los sueros en PBS-leche 5%-Tween₂₀ 0.1% luego se adicionó a cada tira su correspondiente dilución del suero, tanto de los controles como de los sueros problema (cuando se tratan tiras individuales) y enseguida se incubaron 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente se lavaron 5 veces (6 minutos c/u) con PBS-Tween₂₀ 0.1%. Se agregaron 500 µL de la dilución del conjugado IgG cabra marcada con peroxidasa anti-IgG humana *PIERCE* (1:2000 en PBS-leche 5%-

Tween₂₀ 0.1%) para cada tira, incubando 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Después se lavó 5 veces (10 minutos c / lavado) con PBS-Tween₂₀ 0.1%. Se agregó el sustrato 500 µL en cada tira (cromógeno Tetracloruro de diamino bencidina (DAB) *Merck* en Tris pH 7.4 y H₂O₂ al 30%) que debe ser preparado al momento de usarse y se incubó 20 minutos en la estufa a 37°C. Una vez observadas las bandas se lavaron con suficiente agua destilada y se secó al aire para el posterior análisis. Los resultados fueron interpretados visualmente comparando el patrón antigénico revelado por cada suero problema con el de los sueros testigos (negativo y positivo) y se identificó la banda que discriminaba los casos positivos de los negativos a la enfermedad.

ELISA anti-lípido 4MT

Se sensibilizó una placa de alta afinidad (*Costar 3590*) con 100 µL de la solución del antígeno (5µg fracción 4MT /mL etanol absoluto *Merck*) a cada pozo dejando secar la placa 2 horas a 37 °C. Posteriormente se bloqueó con 200 µL/pozo de la solución PBS -albúmina 1% y se incubó 1 hora a 37 °C. Se descartó la solución anterior y después se depositaron 100 µL de la dilución (1:500) de los sueros controles y los sueros problema en PBS-albúmina 1% (por duplicado), incubando 1 hora a 37 °C. Se lavó 5 veces con 200 µL/pozo con solución de PBS-albúmina 1%, posteriormente se depositaron 100 µL/pozo del conjugado IgG cabra marcada con peroxidasa anti-IgG humana (1:4000) e incubó 1 hora a 37 °C. Se lavó 5 veces con 200 µL/pozo de PBS pH 7.2. Se añadieron 100 µL/pozo de la solución de sustrato (5 mg OPD en 12.5 mL PBS, 10 µL H₂O₂ al 30%) y se incubó por 30 minutos a 37 °C. Finalmente se detuvo la reacción agregando 50 µL por pozo de H₂SO₄ 4N y se leyó en un lector de placas de ELISA (*Labsystems*) a 492 nm.

ELISA Liposomal

Se sensibilizó una placa de poliestireno de mediana afinidad (*Costar 3591*) con la solución de antígeno LPC-4MT ajustando a 500 µg/mL en PBS, depositando 100 µL/pozo y se incubó la placa una hora a temperatura ambiente. Para bloquear la placa se agregaron 200 µL/pozo de PBS-albúmina sérica bovina al 1% (*Sigma*) y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Se descartó la solución y sin lavar, se depositaron 100 µL de la dilución (1:500) de los sueros control y de los sueros problema (por duplicado) en PBS - albúmina 1% y se incubó 1 hora a 37 °C.

La placa se lavó 4 veces con 200 µL/pozo de PBS pH 7.4-albúmina 1% y luego se depositaron 100 µL/ pozo del conjugado IgG cabra marcada con peroxidasa anti-IgG humana (1:4000) y se incubó 1 hora a 37 °C. Luego se lavó 4 veces con 200 µL/pozo de PBS pH 7.4. Se colocaron 100 µL/pozo de la solución de sustrato (5 mg OPD en 12.5 mL PBS, 10 µL H₂O₂ al 30%) y se incubó por 30 minutos a 37 °C. Finalmente se detuvo la reacción con 50 µL de H₂SO₄ 4N y se leyó en un lector de placas de ELISA (*Labsystems*) a 492 nm.

D) Procedimiento estadístico

En la prueba de ELISA (para sus dos variantes) los resultados se reportaron con respecto a un valor de corte (VC). Éste se obtuvo al calcular el promedio de los valores de densidad óptica \pm (sumar o restar) 2 veces la desviación estándar del grupo de sujetos sanos. Si el valor obtenido en el problema es menor a ese valor de corte, entonces el resultado es negativo y si es igual o mayor se informa como positivo.

Los resultados de la IET se reportaron como positivos o negativos a la enfermedad. Se calcularon los parámetros operativos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos así como tasas de falsos positivos y negativos para las técnicas: IET y ELISA. Para realizar un mejor análisis, los resultados de pacientes se clasificaron en 3 grupos: confirmados por cultivo; con baciloscopía positiva; y aquellos que sólo fueron diagnosticados clínicamente (sospechosos clínicos) . El grupo de sueros con cultivo sirvió como testigo para evaluar las pruebas realizadas. Posteriormente se ratificaron estos mismos parámetros en el grupo de pacientes con BAAR positivo y al final con el grupo carente de estudios bacteriológicos. Los parámetros operativos fueron calculados con una tabla de 2x2. Además se calculó el Índice de Younden que es una medida de la eficiencia del método diagnóstico, sin considerar la prevalencia de la enfermedad, el análisis fue realizado usando un paquete estadístico de computadora (Win scapate 2.0).

RESULTADOS

Las imágenes de la electroforesis en gels de poliacrilamida al 18% del extracto soluble de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (ESMTB) y de los marcadores de bajo peso molecular se muestran en el anexo 5 (Figuras 7 y 8) así como algunas tablas relacionadas con ellos (Tablas 6 y 7). Todos los sueros estudiados se procesaron bajo las condiciones estándares establecidas para las técnicas: ELISA liposomal, ELISA anti-lípido 4MT e Inmunolectrotransferencia.

Grupo testigo negativo: comprende 73 sueros de sujetos aparentemente sanos.

Tabla. 8 Resumen de resultados de las pruebas realizadas al grupo testigo negativo

Testigos sanos	ELISA Liposomal	ELISA anti-lípido 4MT	IET	Cultivo	BAAR
Positivo	4	20	0	—	—
Negativo	69	53	0	—	—
Total	73	73	73	—	—
% de positividad	5.48%	27.4%	0%	—	—

Los resultados ampliados para este grupo se muestran en el Anexo 5 (Tabla 8-A), el cual incluye el número de muestra y las densidades ópticas obtenidas en el ELISA (en sus dos variantes). Algunos de los resultados obtenidos por IET se muestran en la Figura 9. El total de muestras del grupo fueron negativas.



Figura 9. IET de algunos sueros de sujetos sanos. El antígeno utilizado es ESMTB. Aquí se señala la banda de 4 kDa, los marcadores de peso molecular (MPM) en Daltones, el control positivo (+) y el control negativo (-). Todos sueros resultaron negativos.

Grupo 1. Formado por 16 sueros de verdaderos casos de TBEP confirmados por cultivo. Los resultados se reportaron de acuerdo a la siguiente relación:

0= resultado negativo 1= resultado positivo x= no se realizó

Tabla 9. Resultados de pruebas realizadas al grupo con TBEP confirmada por cultivo (n=16).

No. Muestra	Tipo de TBEP	ELISA Liposomal (VC= 0.144)		ELISA anti-lípido 4MT (VC= 0.160)		IET	Cultivo	BAAR
		Densidad óptica	Resultado	Densidad óptica	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado
22	Linfática	0.307	1	0.142	0	0	1	x
57	Linfática	0.237	1	0.056	0	1	1	1
58	Linfática	0.194	1	0.106	0	0	1	1
80	Genitourinaria	0.112	0	0.184	1	0	1	1
81	Genitourinaria	0.368	1	0.362	1	0	1	1
88	Genitourinaria	0.175	1	0.182	1	0	1	x
93	Genitourinaria	0.176	1	0.344	1	0	1	x
95	Genitourinaria	0.149	1	0.158	0	0	1	1
96	Genitourinaria	0.232	1	0.193	1	0	1	x
110	Genitourinaria	0.086	0	0.082	0	0	1	1
111	Genitourinaria	0.561	1	0.126	0	1	1	1
130	Diseminada	0.533	1	1.191	1	0	1	x
133	Diseminada	0.174	1	0.138	0	0	1	1
136	Diseminada	0.71	1	0.957	1	1	1	x
190	Otras	0.338	1	0.471	1	0	1	x
193	Otras	0.813	1	1.109	1	0	1	1
% de positividad			(14/16) 87.50%		(9/16) 56.25%	(3/16) 18.75%	(16/16) 100%	(9/16) 56.25%

Únicamente algunos tipos de TBEP (Linfática, Genitourinaria, Diseminada y TB Otras) reportaron cultivo positivo confirmado. Las muestras son: 22, 57, 58, 80, 81, 88, 93, 95, 96, 110, 111, 130, 133, 136, 190 y 193.

Las imágenes de la IET del grupo con cultivo confirmado se presentan en la Figura 10.



Figura 10. IET de sueros que corresponden a verdaderos casos de TBEP confirmada por cultivo. El antígeno utilizado fue ESMTB. Aquí se muestra la banda de 4 kDa, los marcadores de peso molecular (MPM) en Daltones, el testigo positivo (+) y el testigo negativo (-). Las muestras 57, 111 y 136 resultaron con IET positiva.

Estimación de la calidad diagnóstica de las técnicas empleadas

Se calcularon 6 parámetros en los casos confirmados por cultivo para evaluar la calidad diagnóstica de las técnicas desarrolladas:

Sensibilidad (S), Especificidad (E), Valor Predictivo Positivo (VPP), Valor Predictivo Negativo (VPN), Tasa de Falsos Positivos (TFP) y Tasa de Falsos Negativos (TFN), ver Anexo 6.

Mediante el ELISA liposomal se obtuvieron 14 positivos de un total de 16 casos con TBEP confirmada por cultivo y del grupo de sanos 4 de un total de 73 fueron positivos. Estos últimos no reportaron resultados bacteriológicos (cultivo y baciloscopia) (Tabla 10).

Tabla 10. Tabla de contingencia para el cálculo de los parámetros operativos del ELISA liposomal

ELISA Liposomal	Casos TB Extrapulmonar (cultivo +)	Sanos	Total
Positivo	14	4	18
Negativo	2	69	71
Total	16	73	89

S= 87.50% VPP= 77.78% TFP= 5.48%
E= 94.52% VPN= 97.18% TFN= 12.5%

En el ELISA anti-lípido 4MT se obtuvieron 9 positivos de un total de 16 casos con TBEP confirmada por cultivo y 20 de los clasificados como sanos resultaron positivos en esta prueba (Tabla 11).

Tabla 11. Tabla de contingencia para cálculo de los parámetros operativos del ELISA anti-lípido 4MT

ELISA Anti-lípido 4 MT	Casos TB Extrapulmonar (cultivo +)	Sanos	Total
Positivo	9	20	29
Negativo	7	53	60
Total	16	73	89

S= 56.25% VPP= 31.03% TFP= 27.4%
E= 72.60% VPN= 88.33% TFN= 43.8%

Mediante IET sólo 3 casos resultaron positivos de un total de 16 con TBEP confirmada por cultivo y del grupo de sanos ninguno fue positivo (Tabla 12).

Tabla 12. Tabla de contingencia para cálculo de los parámetros operativos de IET

IET	Casos TB Extrapulmonar (cultivo +)	Sanos	Total
Positivo	3	0	3
Negativo	13	73	86
Total	16	73	89

S= 18.75% VPP= 100% TFP= 0%
E= 100% VPN= 84.88% TFN= 81.3%

Grupo 2. Sueros de sujetos con baciloscopia confirmada (n=21). Los resultados se reportaron de acuerdo a la siguiente relación:

0= resultado negativo 1= resultado positivo x= no se realizó

Tabla 13. Resultados de las pruebas realizadas al grupo con baciloscopia positiva (n= 21)

No. Muestra	Tipo de TBEP	ELISA Liposomal (VC= 0.144)		ELISA anti-lipido 4MT (VC= 0.160)		IET	Cultivo	BAAR
		Densidad óptica	Resultado	Densidad óptica	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado
20	Linfática	0.234	1	0.146	0	0	x	1
62	Osteoarticular	0.429	1	0.193	1	0	x	1
63	Osteoarticular	0.154	1	0.132	0	0	x	1
76	Genitourinaria	0.517	1	0.18	1	0	x	1
78	Genitourinaria	0.223	1	0.548	1	0	x	1
79	Genitourinaria	0.269	1	0.265	1	0	x	1
83	Genitourinaria	0.178	1	0.068	0	0	x	1
84	Genitourinaria	0.188	1	0.196	1	0	x	1
85	Genitourinaria	0.153	1	0.065	0	0	x	1
86	Genitourinaria	0.214	1	0.319	1	0	x	1
89	Genitourinaria	0.059	0	0.057	0	0	x	1
90	Genitourinaria	0.272	1	0.555	1	1	x	1
94	Genitourinaria	0.456	1	0.807	1	1	x	1
109	Genitourinaria	0.081	0	0.11	0	0	0	1
117	Digestiva/Peritoneal	0.376	1	0.296	1	0	x	1
126	Diseminada	0.266	1	0.268	1	0	x	1
135	Diseminada	0.154	1	0.214	1	0	x	1
177	Otras	0.068	0	0.128	0	0	x	1
178	Otras	0.189	1	0.036	0	0	x	1
187	Otras	0.407	1	0.149	0	0	x	1
191	Otras	0.713	1	0.846	1	0	x	1
% de positividad			(18/21) 85.71%		(12/21) 57.14%	(2/21) 9.52%	—	21/21 100%

Únicamente algunas muestras de TBEP: Linfática (n=1), Osteoarticular (n=2), Genitourinaria (n=11), Digestiva (n=1), Diseminada (n=2) y TB Otras (n=4) reportaron baciloscopia positiva.

Las imágenes de IET para este grupo se muestran en el anexo 5, en las Figuras 11 y 12.

Grupo 3. Comprendió 157 sueros de sujetos con sólo diagnóstico clínico de tuberculosis extrapulmonar.

Tabla 14. Porcentaje de positividad de las pruebas realizadas al grupo con sospecha clínica de TBEP (n=157)

	ELISA Liposomal	ELISA anti-lípido 4MT	IET	Cultivo	BAAR
% de positividad	137/157 87.26%	(74/157) 47.13%	7/157 4.46%	—	—

Este grupo sólo tenía diagnóstico clínico de tuberculosis extrapulmonar (sin estudios bacteriológicos). Incluye los tipos de TBEP: Pleural (n=14), Linfática (n=42), Osteoarticular (n=5), SNC (n=8), Genitourinaria (n=21), Digestiva/Peritoneal (n=9), Diseminada (n=41) y TB Otras (n=17).

Los resultados en extenso de este grupo se muestran en el anexo 5 (Tabla 14-A), donde se incluye: el número de muestra, tipo de TBEP al que corresponden, las densidades ópticas obtenidas en el ELISA así como algunas de las imágenes de la IET (Figura 12).

En la Tabla 15 se presenta la relación entre las densidades ópticas del ELISA liposomal y el resultado de la IET.

Tabla 15. Relación entre las densidades ópticas del ELISA liposomal y el resultado de IET

No. Muestra	Tipo de TBEP	ELISA Liposomal (VC= 0.144)		ELISA anti-lípido 4MT (VC= 0.160)		IET Resultado	Cultivo Resultado	BAAR Resultado
		Densidad óptica	Resultado	Densidad óptica	Resultado			
57*	Linfática	0.237	1	0.056	0	1	1	1
64***	Osteoarticular	0.181	1	0.041	0	1	x	x
71***	SNC	0.154	1	0.086	0	1	x	x
90**	Genitourinaria	0.272	1	0.555	1	1	x	1
94**	Genitourinaria	0.456	1	0.807	1	1	x	1
107***	Genitourinaria	0.438	1	0.881	1	1	x	x
111*	Genitourinaria	0.561	1	0.126	0	1	1	1
113***	Genitourinaria	0.111	0	0.279	1	1	x	x
134***	Diseminada	0.882	1	1.23	1	1	x	x
136*	Diseminada	0.71	1	0.957	1	1	1	x
176***	Otras	0.098	0	0.098	0	1	x	x
179***	Otras	0.458	1	0.782	1	1	x	x

Aquí se presentan las muestras que coinciden en ser positivas al IET, * representa a las muestras que forman parte del grupo con cultivo positivo, ** son las muestras del grupo con baciloscopia y *** las muestras que sólo fueron diagnosticadas clínicamente. Como se puede observar en 3/5 muestras de TB genitourinaria (94, 107, 111) la densidad óptica es alta y en 2/2 muestras de TB diseminada ocurre lo mismo.

En la tabla 16 se muestra el porcentaje de positividad obtenido en las técnicas empleadas

Tabla 16. Porcentaje de positividad de las técnicas para cada uno de los grupos estudiados

Grupo	ELISA liposomal	ELISA anti-lípido 4MT	IET
Sanos n=73	4/73 5.48%	20/73 27.4%	0/73 0%
Cultivo n=16	14/16 87.5%	9/16 56.25%	3/16 18.75%
BAAR n=21	18/21 87.71%	12/21 57.14%	2/21 9.52%
Clinica n=157	137/157 87.26%	74/157 47.13%	7/157 4.46%

El porcentaje de positividad en el grupo de sanos fue de 0% con IET, mientras que por ELISA anti-lípido 4MT el porcentaje fue mayor al obtenido por IET y ELISA liposomal. En los tres grupos de estudio (Cultivo +, BAAR+, diagnóstico clínico) se obtuvieron porcentajes de positividad similares con el ELISA liposomal.

Los parámetros operativos obtenidos (ver Tabla 17) en cada una de las pruebas realizadas a los tres grupos de casos diagnosticados como TBEP demostraron que para los casos con **cultivo positivo**, los resultados del ELISA liposomal fueron los mejores porque determinaron una alta sensibilidad (87.5%) y especificidad (94.5%), seguida del ELISA anti-lípido 4MT que mostró menor sensibilidad y especificidad (56.25% y 72.6% respectivamente). En el caso de la IET los resultados definitivamente son muy bajos en comparación con los obtenidos por ELISA (sensibilidad 18.75% y especificidad 100%). Al validar estas mismas pruebas y calcular los parámetros operativos en el grupo con **BAAR positivo** nuevamente la mejor sensibilidad y especificidad se encontró por ELISA liposomal. Comparando los resultados obtenidos en los dos grupos anteriores (1 y 2) se descubrió que utilizando el ELISA liposomal no existe diferencia entre los parámetros. Respecto al grupo 3, con **identificación clínica** de TBEP, también se encontró que por ELISA liposomal se determinaron valores altos de sensibilidad y especificidad (87.26 y 94.52% respectivamente) que además son muy parecidos a los encontrados en los grupos (1 y 2) que poseen estudios bacteriológicos.

En la tabla 17 se muestra el desempeño de las técnicas realizadas.

Tabla 17. Parámetros operativos obtenidos de las técnicas a evaluar, en los tres grupos (cultivo+, BAAR+, diagnóstico clínico)

Clasificación de casos	ELISA liposomal	ELISA anti-lípido 4MT	IET
Cultivo L-J (grupo 1)	S= 87.5 (71.29-100)	S= 56.25 (31.9-80.5)	S= 18.75 (0.0-37.8)
	E= 94.52 (89.3-99.7)	E= 72.6 (62.3-82.8)	E= 100 (100-100)
	VPP= 77.78	VPP= 31.03	VPP=100
	VPN= 97.18	VPN=88.33	VPN=84.88
	TFP= 5.48	TFP= 27.4	TFP= 0
	TFN= 12.5	TFN= 43.8	TFN= 81.3
	I. Youden= 82 (65-99)	I. Youden= 28.8 (2.48-55.23)	I. Youden= 18.75 (0.0-37.9)
BAAR (grupo 2)	S= 85.71 (70.7-100)	S= 57.14 (35.9-78.3)	S= 9.52 (0-22)
	E= 94.52 (89.3-99.7)	E= 72.60 (62.3-82.8)	E= 100 (100-100)
	VPP=81.82	VPP=37.5	VPP=100
	VPN=95.83	VPN=85.48	VPN=79.35
	TFP= 5.48	TFP= 27.4	TFP= 0
	TFN= 14.29	TFN= 42.86	TFN= 90.48
	I. Youden= 80.23 (64.38-96.09)	I. Youden= 29.7 (6.29-53.25)	I. Youden= 9.5 (0-22)
Clínica (grupo 3)	S= 87.26 (82-92.4)	S= 47.13 (39.3-54.9)	S= 4.46 (1.2-7.7)
	E= 94.52 (89.3-99.7)	E= 72.60 (63.2-82.8)	E= 100 (100-100)
	VPP=97.16	VPP= 78.72	VPP= 100
	VPN= 77.53	VPN= 38.97	VPN= 32.73
	TFP= 5.48	TFP= 27.4	TFP= 0
	TFN= 12.74	TFN= 52.87	TFN= 95.54
	I. Youden= 81.7 (74.4-89.2)	I. Youden= 19.7 (6.8-32.6)	I. Youden= 4.5 (1.23-7.69)

Los resultados del ELISA liposomal determinaron una alta sensibilidad y especificidad además las tasas de falsos positivos y negativos son las más bajas y el índice de Youden es mayor respecto a los resultados obtenidos por ELISA anti-lípido 4MT y la IET.

En la tabla 18 se muestra en forma de resumen el porcentaje de positividad de los resultados obtenidos en las técnicas empleadas para cada tipo de TBEP.

Tabla 18. Resumen de porcentajes de positividad de las pruebas aplicadas a los casos de TBEP, agrupados según localización de la enfermedad

Tipo de TBEP	Clasificación bacteriológica de casos	ELISA Liposomal	ELISA anti-lípido 4MT	IET
TB Pleural n=14	Cultivo (n= 0)	—	—	—
	c/BAAR (n= 0)	—	—	—
	s/Cultivo ni BAAR (n= 14)	92.86	42.86	0
TB SNC n=8	Cultivo (n= 0)	—	—	—
	c/BAAR (n= 0)	—	—	—
	s/Cultivo ni BAAR (n= 8)	87.5	12.5	12.5
TB Osteoarticular n=7	Cultivo (n= 0)	—	—	—
	c/BAAR (n= 2)	100	50	0
	s/Cultivo ni BAAR (n= 5)	100	60	20
TB Digestiva/ Peritoneal n=10	Cultivo (n= 0)	—	—	—
	c/BAAR (n= 1)	100	100	0
	s/Cultivo ni BAAR (n= 9)	77.78	44.44	0
TB Diseminada n=46	Cultivo (n= 3)	100	66.67	33.33
	c/BAAR (n= 2)	100	100	0
	s/Cultivo ni BAAR (n= 41)	95.12	51.22	2.44
TB Linfática n=46	Cultivo (n= 3)	100	0	33.33
	c/BAAR (n= 1)	100	0	0
	s/Cultivo ni BAAR (n= 42)	92.86	47.62	0
TB Genitourinaria n=40	Cultivo (n= 8)	75	62.5	12.5
	c/BAAR (n= 11)	81.82	63.64	18.18
	s/Cultivo ni BAAR (n= 21)	71.43	47.62	9.52
TB Otras n=23	Cultivo (n= 2)	100	100	0
	c/BAAR (n= 4)	75	25	0
	s/Cultivo ni BAAR (n= 17)	70.59	52.94	11.76
Total = 194				

En los tres grupos de sueros en estudio (cultivo positivo, BAAR positivo, con diagnóstico clínico) el porcentaje de positividad con la técnica de ELISA liposomal fue muy similar en los casos de TB diseminada, TB linfática y TB genitourinaria. Para los casos con tuberculosis sin registro de cultivo: TB osteoarticular y TB digestiva/peritoneal, los de TB osteoarticular tuvieron el mismo porcentaje de positividad en el ELISA liposomal considerando los datos de baciloscopía positiva y diagnóstico clínico. En TB digestiva/peritoneal se observaron ciertas diferencias en la positividad, lo mismo sucedió con TB otras (“poco comunes”). Por ELISA anti-lípido 4MT e IET los porcentajes de positividad obtenidos fueron bajos y variables.

DISCUSIÓN

El reciente incremento de nuevos casos de tuberculosis muestra una necesidad urgente de contar con métodos de diagnóstico rápidos y específicos para identificar al *Mycobacterium tuberculosis* y por lo tanto la detección de individuos infectados⁸⁰. A pesar de que la baciloscopía y la evaluación clínica tienen un importante papel, “el estándar de oro” para el diagnóstico de la tuberculosis es todavía el cultivo positivo^{63,96}. Sin embargo, el análisis microbiológico (cultivo y la baciloscopía) de tuberculosis extrapulmonar es difícil, tardado y poco exitoso debido a la baja carga bacilar en las muestras estudiadas⁶⁷. El diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar plantea problemas especiales, ya que la combinación de poblaciones bacilares reducidas asentadas en órganos relativamente inaccesibles hace más difícil la confirmación bacteriológica, esto obliga frecuentemente a realizar biopsias y otros procedimientos invasivos para obtener especímenes apropiados⁹⁶.

Clínicamente, existe una diversidad de signos y síntomas para cada uno de los padecimientos a nivel extrapulmonar y generalmente no son consistentes^{8, 77, 82, 85, 96}. Los síntomas clínicos son sugestivos, frecuentemente no específicos, y las técnicas disponibles para confirmar el diagnóstico distan de ser satisfactorias⁵⁰. A pesar de que los resultados clínicos no son diagnósticos estos pueden dar indicios para sospechar de TB⁹⁶. Los pacientes de países en vías de desarrollo como México, con una importante prevalencia de infección causada por *M. tuberculosis* y con sintomatología característica de la enfermedad deben manejarse con la inmediata sospecha de ser tuberculosos⁸. Las pruebas serológicas son una buena opción como herramientas para el apoyo en el diagnóstico de TB, por ser rápidas y de bajo costo pero debido a la variabilidad de los antígenos utilizados, muestran diferentes parámetros en cuanto a especificidad y sensibilidad, por lo que se sigue buscando el antígeno ideal para usarlo como referencia en el diagnóstico de la tuberculosis⁹³.

Estudios previos demostraron que existe un reconocimiento importante de anticuerpos en suero de pacientes con tuberculosis pulmonar hacia una fracción antigénica de bajo peso molecular (4kDa) denominada 4MT contenida en un extracto crudo de *Mycobacterium tuberculosis* e identificada por Inmunoelectrotransferencia. La fracción 4MT es principalmente de naturaleza lipídica (demostrado por tinción específica para lípidos con Sudán Negro B)^{88, 93}. Mediante una extracción con solventes orgánicos se realizó la semipurificación de 4MT a partir de masa bacilar de *M. tuberculosis* H37Ra y se analizó por cromatografía en capa fina donde se identificaron lípidos asociados a grupos fosfato, lípidos neutros y lípidos asociados a grupos amino⁹³. *M. tuberculosis* tiene antígenos de diferente naturaleza los cuales han sido empleados en otras metodologías^{88, 93}. Hasta ahora los lípidos no son reconocidos como antígenos de relevancia inmunológica, sin embargo, en la tuberculosis es primordial considerar que un 60% del total de los componentes de la pared micobacteriana con importancia en su patogenicidad, son lípidos⁹⁴.

Por Inmunoelectrotransferencia, la fracción 4MT fue utilizada como marcador serológico de tuberculosis pulmonar, mostrando una sensibilidad de 72.4% y especificidad de 72.3%⁸⁸. Cuando se empleó como antígeno en el ELISA anti-lípido 4MT la sensibilidad fue 80.82% y la especificidad de 93.15%, y utilizando este mismo antígeno incluido en liposomas por ELISA liposomal, la sensibilidad fue 71.2% y la especificidad de 94.5%, considerándose así como pruebas complementarias para el diagnóstico de TB pulmonar^{93, 95}.

Es importante comentar que este antígeno (4MT) reportó reacción cruzada en sueros con otros padecimientos infecciosos semejantes a tuberculosis como lepra lepromatosa en la prueba de ELISA anti-lípido 4MT y ELISA liposomal respectivamente (71.4% y 42.8%), histoplasmosis (53.3% y 13.3%), micetoma (9.09% y 72.7%) y neurocisticercosis (33.3% y 5.5%). Filogenéticamente el género *Mycobacterium* está muy cercano a *Histoplasma* y *Nocardia*, por lo que el antígeno 4MT o fracciones de ésta pueden compartirse entre sí^{63, 93}.

Dada la dificultad para realizar el diagnóstico de TB extrapulmonar y la relevancia de la fracción lipídica 4MT, en este estudio se planteó estandarizar y evaluar las técnicas de Inmunoelectrotransferencia, ELISA anti-lípido 4MT y ELISA liposomal

para luego determinar la presencia de anticuerpos IgG en una población de sujetos clasificados como casos de TBEP provenientes del mismo centro hospitalario que contaban con hallazgos clínicos de la enfermedad y algunos con datos bacteriológicos.

Para evaluar estas técnicas se hizo un primer análisis utilizando dos grupos: sueros testigos negativo, proveniente de sujetos sanos y sueros de casos con TBEP confirmados por cultivo. Se encontró que en el grupo testigo negativo, 5.48% (4/73) fue positivo al ELISA liposomal, el 27.40% (20/73) al ELISA anti-lípido 4MT y el 100% negativo a la IET (ver Tablas 8 y 8-A). Los resultados falsos positivos podrían explicarse porque a) posiblemente estos sujetos estuvieron en contacto con la micobacteria en alguna etapa de su vida, b) provienen de un área geográfica donde muchos tipos de infecciones micobacterianas son endémicas o c) estaban infectados pero no enfermos en el momento en que fueron seleccionados como donadores en el banco de sangre^{10, 52}.

Los 16 casos de TBEP confirmados por cultivo [TB linfática (n=3), TB genitourinaria (n=8), TB diseminada (n=3) y TB otras (n=2)] se consideraron como verdaderos positivos para estimar la calidad diagnóstica de las pruebas aplicadas. Mediante el ELISA liposomal se obtuvieron altos parámetros de sensibilidad (87.5%) y especificidad (94.52%), lo que le dio relevancia para ser utilizada como herramienta en el diagnóstico de TBEP, mientras que el ELISA anti-lípido 4MT resultó menos sensible (56.25%) y específica (72.60%) que el ELISA liposomal. Por IET se observó una alta especificidad (100%) pero muy baja sensibilidad (18.75%), (Ver Tablas 10,11 y 12).

Para confrontar los resultados obtenidos en el grupo confirmado por cultivo se realizó una segunda clasificación del total de muestras en estudio, de acuerdo con los datos bacteriológicos de BAAR positivo. Al calcular la eficiencia diagnóstica de las pruebas, se determinó que los resultados más altos de sensibilidad y especificidad fueron obtenidos al utilizar ELISA liposomal: 85.71% y 94.52% respectivamente. Por el contrario, se encontraron valores más bajos por ELISA anti-lípido 4MT y por IET. En este grupo con BAAR positivo se destaca un caso de TB genitourinaria (muestra 109) que fue negativo tanto al cultivo como a las otras pruebas aplicadas; esto podría explicarse como falso positivo para TBEP, debido

a que mediante la baciloscopía en orina se pudieron observar micobacterias no tuberculosas (MNT) (ver Tabla 13).

La eficiencia diagnóstica (sensibilidad y especificidad) de las pruebas evaluadas reflejó valores similares en los grupos confirmados por cultivo y BAAR, por lo que se comparó con otro grupo de enfermos diagnosticados solamente por hallazgos clínicos muy sugerentes de TBEP (ver Tablas 14, 14-A). Los resultados obtenidos para este último grupo fueron: 87.26% de sensibilidad y 94.52% de especificidad en ELISA liposomal. Mediante ELISA anti-lípido 4MT e IET se tuvieron bajos valores de sensibilidad.

Examinando los tres grupos de sueros en estudio (cultivo positivo; BAAR positivo; con diagnóstico clínico) se observó que sus porcentajes de positividad con la técnica de ELISA liposomal fueron muy similares (ver Tablas 16 y 17). Al determinar la tasa de falsos positivos y falsos negativos se encontró que mediante esta ELISA el porcentaje promedio fue el menor, 5.48% y 13.18% respectivamente, lo que le da mayor importancia a esta prueba, pues dar tratamiento antituberculoso a los casos falsos positivos ocasionan serios perjuicios al paciente o bien se estaría enmascarando otra enfermedad y por otro lado un resultado falso negativo en algunos tipos de tuberculosis podría dejar secuelas o conducir a la muerte, lo cual puede evitarse porque la tuberculosis es una enfermedad curable si se detecta a tiempo.

Considerando que los pacientes provenían del mismo centro hospitalario y que fueron clasificados bajo los mismos criterios clínicos, se puede decir que el ELISA liposomal es una prueba que sirve como herramienta para el diagnóstico de casos con TB diseminada, TB linfática, TB genitourinaria, TB otras (poco comunes) y con cierta reserva TB osteoarticular y TB digestiva/peritoneal (porque reportaron únicamente baciloscopía, ver Tabla 18), y así inferir que casos de estos tipos de tuberculosis, que no posean estudios bacteriológicos puedan ser identificados con ELISA liposomal, pues su calidad diagnóstica fue constante para los tres grupos estudiados. En los casos de TB pleural y TB SNC es difícil juzgar la sensibilidad de la prueba en ausencia del resultado del cultivo y la baciloscopía, pues debido a la naturaleza paucibacilar de la enfermedad es complicado obtener la muestra

adecuada y no siempre se puede lograr el cultivo⁹⁷. La sensibilidad del cultivo de *M. tuberculosis* para diagnosticar TB pleural es menor al 40% y el examen microscópico regularmente es negativo, además se requiere del líquido pleural o bien de la biopsia⁷⁴. La biopsia pleural es un método útil para el diagnóstico de TB pleural y aunque 60% de los casos pueden ser diagnosticados en la primera biopsia, este índice se incrementa a 80% después de tres biopsias⁹⁸. Por otro lado en TB del SNC, la observación del bacilo mediante la tinción de Ziehl-Neelsen o cultivo de líquido cefalorraquídeo (LCR), lavado gástrico o expectoración es posible en 30 % de los casos y debido a que no se debe esperar hasta tener los resultados bacteriológicos por las probables secuelas neurológicas y la mortalidad que este tipo de tuberculosis puede causar sino es tratada rápidamente, se utilizan otros métodos de diagnóstico alternativos (estudios citoquímicos del LCR, tomografía axial computarizada contrastada de cráneo (TACC) y otras pruebas como ADA, y PCR en LCR, lavado gástrico o expectoración)³⁹.

Los resultados obtenidos confirman que 4MT incluida en liposomas puede ser útil como antígeno en ELISA liposomal aplicada al diagnóstico de TBEP ya que es mayormente reconocida por anticuerpos tuberculosos humanos cuando se presenta en un arreglo conformacional formando bicapas, lo que le confiere mayor especificidad y sensibilidad a la prueba⁹³. Para analizar la capacidad diagnóstica que tiene esta prueba, se calculó el Índice de Youden en los tres grupos (cultivo positivo, BAAR positivo, con diagnóstico clínico) resultando un promedio mayor al 80%, lo que muestra que el ELISA liposomal podría ser una prueba eficiente y por lo tanto de utilidad en el diagnóstico de TBEP.

Los resultados de ELISA liposomal podrían orientar y ayudar al médico a decidir el comienzo de la quimioterapia en pacientes adultos sospechosos clínicos de TBEP, de quienes los resultados de baciloscopía o cultivo son difíciles de establecer y cuando la obtención de la muestra no es posible. Como lo demuestra un estudio realizado en el Hospital General de México acerca del comportamiento de la TBEP de enero de 2001 a junio de 2005 en un grupo de 311 casos, donde se reportó que sólo el 13.5% fue diagnosticado por cultivo, 7.7% por BAAR, 52% con biopsia, 8% por ADA, y 6.8% utilizando PCR⁹⁹.

Los resultados del ELISA anti-lípido 4MT reflejaron que en los tres grupos (cultivo positivo, BAAR positivo, con diagnóstico clínico) la sensibilidad (56.25%, 57.14%, 47.13% respectivamente) y especificidad (72.6%) fue baja e inferior a la obtenida por ELISA liposomal (ver Tabla 17). El valor promedio del índice de Youden fue de 26.1%. Entonces, de acuerdo con los datos anteriores, se consideró al ELISA anti-lípido 4MT poco sensible y no eficiente para identificar como enfermos a verdaderos positivos en la población estudiada. Esto debido a la naturaleza lipídica de 4MT y a la disponibilidad que ésta presenta al adherirse a la placa de poliestireno, lo que hace poco probable su reconocimiento por los anticuerpos de pacientes con TBEP. La escasa reactividad de los anticuerpos en muestras de pacientes con este tipo de tuberculosis se explica si consideramos que los resultados de cualquier estudio serológico en enfermedades infecciosas dependen de la calidad del antígeno usado y de las condiciones empleadas en la metodología (tipo y concentración del antígeno, dilución del suero, tiempos de incubación, lavados, entre otras).

Se ha reportado que títulos bajos de anticuerpos contra antígenos micobacterianos pueden estar asociados con una fuerte infección y que estos mismos antígenos se liberan a la circulación sanguínea y provocan la temporal supresión de la formación de anticuerpos^{10,52,59}. En casos sospechosos de tuberculosis que presentan bajos títulos de anticuerpos se recomienda, por lo tanto, hacer un seguimiento y, si es posible, examinar antígenos micobacterianos en circulación y complejos inmunes^{10, 44}. Además al utilizar cualquier ELISA como prueba diagnóstica se debe tomar en cuenta que si el título de anticuerpos es elevado, es sugerente de enfermedad pero un resultado negativo no descarta la posibilidad de estar enfermo, siempre se deben complementar y comparar con otros parámetros clínicos⁹³.

Los resultados de IET demostraron baja sensibilidad (18.75% en casos confirmados por cultivo), y alta especificidad (100%), el valor del índice de Youden fue 18.75% calificándola como una prueba no confiable y con poca capacidad diagnóstica para casos de TBEP, esto posiblemente debido a múltiples factores como las distintas formas de localización y manifestación de la enfermedad, así

como a la naturaleza compleja de la misma y a que cada individuo muestra diferentes patrones de respuesta serológica contra fracciones de antígenos micobacterianos en diversas etapas de la infección y de la enfermedad, originando resultados poco exitosos como los encontrados por Franco *et al.* (2001)⁶⁸, alcanzando una respuesta completa en sólo 60% de pacientes con TB pleural mediante IET hacia cuatro fracciones antigénicas proteínicas de 71, 65, 26–38 y 19 kDa de un sonicado antigénico de *M. tuberculosis*^{57, 58, 68}. Además, examinando las densidades ópticas registradas en el ELISA liposomal se encontró que 3 de los 5 casos de TB genitourinaria que reportaron IET positivo también tuvieron alta densidad óptica, lo mismo sucedió con 2 casos de TB diseminada con IET positivo (ver Tabla 15), por lo que se cree que para que se dé el reconocimiento de la fracción 4MT en estos dos tipos de TB se requiere de un nivel alto de anticuerpos. También es necesario investigar el posible uso de otros fluidos como fluido pleural, peritoneal y sinovial para evaluar el desempeño de la prueba.

Las limitaciones en este trabajo fueron 1) la falta de datos microbiológicos en la colección de muestras estudiadas, los cuales son necesarios para realizar un mejor análisis y así poder dar mayor confiabilidad a los resultados obtenidos, 2) antecedentes de reacción cruzada de los antígenos utilizados, 3) existen pocos reportes sobre estudios serológicos para el diagnóstico de TBEP, se han realizado pruebas utilizando otros líquidos o secreciones corporales como el LCR para estudios de TB meníngea las cuales han mostrado diferentes resultados.

A pesar del progreso en el entendimiento de la biología molecular, del desarrollo de técnicas de vanguardia y la rápida detección de agentes resistentes a fármacos anti-tuberculosos, el cultivo de organismos es todavía obligatorio para las pruebas de sensibilidad de rutina y la identificación de especies^{63, 80}. Por lo tanto, cualquier prueba basada en la detección de enfermedad tuberculosa en muestras clínicas debe ser usada como un procedimiento adjunto a la confirmación de la presencia del bacilo. El diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar es complejo por lo que se requiere de un trabajo multidisciplinario, a este respecto las técnicas serológicas son útiles, además de rápidas, de fácil ejecución y de bajo costo.

CONCLUSIONES

- Por Inmunoelctrotransferencia se determinó un escaso reconocimiento de anticuerpos IgG en la población de sujetos con TBEP (cultivo positivo confirmado; BAAR positivo; diagnóstico clínico) hacia la fracción 4MT presente en el ESMTB H37Ra. Considerando sólo el resultado en pacientes con tuberculosis extrapulmonar confirmada por cultivo, se obtuvo una sensibilidad de 18.75%, especificidad de 100%, VPP de 100%, VPN de 84.88%, TFP de 0% y TFN de 81.3%. Estos resultados indican que no es útil para el diagnóstico.
- Se desarrolló el ELISA anti-lípido 4MT (disuelto en etanol) que identificó un limitado reconocimiento de anticuerpos IgG en sueros de pacientes con tuberculosis extrapulmonar (cultivo positivo confirmado; BAAR positivo; diagnóstico clínico). Los mejores parámetros operativos (sensibilidad 56.25%, especificidad 72.60%, VPP 31.03%, VPN 88.33%, TFP 27.4% y TFN 43.8%) se presentaron en el grupo con cultivo positivo.
Al emplear un ELISA de variedad liposomal que utilizó como antígeno a 4MT incluido en liposomas con fosfatidilcolina, se determinó una calidad diagnóstica alta y similar en los pacientes con tuberculosis extrapulmonar (cultivo positivo confirmado; BAAR positivo; diagnóstico clínico) mostrando una sensibilidad promedio de 86.82% y especificidad de 94.52%.
- De acuerdo con los parámetros operativos e índice de Youden (>80%) se consideró que el ELISA liposomal puede ser una prueba confiable y complementaria para apoyar al diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar en la identificación de casos que provengan del mismo centro hospitalario donde fueron diagnosticados.

- Conforme con los resultados del ELISA liposomal, los anticuerpos de pacientes con TBEP reconocieron mejor al antígeno lipídico 4MT en liposomas lo que demuestra que este arreglo conformacional formando bicapas confiere mayor especificidad y sensibilidad a la prueba.
- Las técnicas serológicas, como el ELISA son simples, convenientes y aplicables como pruebas rápidas de laboratorio en la identificación de anticuerpos contra algunos antígenos de *M tuberculosis* y en ocasiones resultan ser más sensibles que la baciloscopía.
- El ELISA liposomal sólo se considera una prueba complementaria a los métodos convencionales de diagnóstico y de tamizaje que podría ser usada en aquellos pacientes con tuberculosis de quienes los especímenes son difíciles de obtener, en los pacientes con baciloscopía negativa y en pacientes con sintomatología clínica sugerente de TBEP para ayudar a la pronta identificación de enfermos tuberculosos.

ANEXO 1

MEDIDAS DE SEGURIDAD DE LOS LABORATORIOS DE MICOBACTERIOLOGÍA¹⁶

Las medidas de seguridad incluyen la puesta en práctica de las recomendaciones de todo laboratorio microbiológico como son las siguientes:

1.1. - Recomendaciones generales

Educación para realizar el trabajo seguro, prohibición de comer, beber, fumar y aplicarse cosméticos o crema de manos, lavado de manos al abandonar el laboratorio, uso de bata (o pijama), dispositivo de protección facial ante el riesgo de salpicaduras o formación de aerosoles y uso de guantes cuando se trabaje con muestras clínicas o medios de cultivo con crecimiento.

Sería aconsejable que el personal al ingreso (y al finalizar) en el área de micobacterias se haga un estudio de infección tuberculoso (Prueba de tuberculina en el caso de ser previamente negativo, con o sin radiografía de tórax, y valoración clínico-terapéutica sí es positiva).

1.2. - Precauciones de los trabajadores

Utilizar siempre bata larga de trabajo, de mangas largas y preferentemente que se cierre por la espalda. La bata debe ser de uso personal exclusivo, quedar en el laboratorio y esterilizarse en autoclave o hervirse antes de lavarse.

Utilizar cubreboca.

Realizar actividades atrás de la flama del mechero

Desinfección frecuente de las manos: lavado con abundante agua, jabón y cepillo.

En caso de accidente por derrame de una muestra, vaciar sobre el derrame fenol al 5%, cubrir con papel periódico y humedecerlo con la misma solución desinfectante. Dejar actuar 30 minutos como mínimo antes de limpiar el área.

1.3. - Medidas para reducir la formación de aerosoles

Manejo adecuado de centrifugas (no frenar para terminar antes, motores con tapa), no llenar en exceso los tubos, preferencia de tubos con rosca, no verter líquidos bruscamente, precauciones al abrir las ampollas y agitar los cultivos, uso de asas de plástico desechable o incineradores de asas biológicas y trabajar en cabinas biológicas de seguridad.

1.4. - Operaciones de mayor riesgo

- Trasvasar suspensiones de bacilos por medio de la pipeta.
- Centrifugar líquidos que puedan contener bacilos.
- Decantar el líquido sobrenadante después de la centrifugación.
- Destapar tubos después de centrifugar o agitar.
- Agitar con la mano o en agitador mecánico tubos que contengan líquidos probablemente con bacilos.

1.5. - Precauciones específicas en el trabajo

- No pipetear con la boca, no encapuchar agujas, proteger heridas o erosiones con las medidas de barrera ya comentadas.
- Antes de esterilizar un asa de alambre que contiene material infectante en la llama del mechero, se deberá introducir en un frasco con arena y alcohol de 95%, el alcohol debe impregnar la arena y quedar a un nivel de 2 cm por encima de ella.
- Nunca se abrirá la tapa de la centrífuga mientras está funcionando.

1.6. - Condiciones generales de trabajo

- Estos laboratorios son áreas de circulación restringida y debe contar con carteles de advertencia en las puertas de acceso.
- La centrifuga y el agitador mecánico deben estar en un área exclusiva dentro del laboratorio y con buena ventilación.
- Es importante que las operaciones de mayor riesgo se efectúen en una cabina de bioseguridad.

- En las áreas de trabajo donde no existan cabinas de bioseguridad se recomienda la instalación de lámparas de luz ultravioleta, colocadas en la pared a no más de 40 cm de distancia de la mesa de trabajo. Sin embargo, debe aclararse que el empleo de estas lámparas solamente constituye una medida complementaria de la desinfección química empleada para reducir el número de microorganismos en el aire y en las superficies. El tiempo mínimo de exposición debe ser de dos horas. Su efectividad disminuye con el tiempo y con la acumulación de polvo, por lo que deben limpiarse semanalmente con algodón embebido en alcohol. Las lámparas sólo deben encenderse cuando no trabaja el personal, ya que los rayos ultravioleta son nocivos para la salud. Se debe tener también en cuenta que los rayos ultravioleta deterioran el látex, el caucho y los plásticos.

1.7. - Limpieza o eliminación de residuos adecuadas

Limpieza de la superficie de trabajo al menos una vez al día y desinfección si existe salpicadura en la superficie. Esterilización o desinfección antes de la eliminación del material potencialmente infeccioso.

Para los laboratorios o zonas de trabajo de nivel 2 se requiere el denominado nivel 2 de seguridad: llevar guantes para hacer las extensiones, lavarse las manos, evitar la generación de aerosoles, prohibición de manipular fuera de las campanas de seguridad muestras clínicas, manejo adecuado de agujas y eliminación en contenedores resistentes.

Para los laboratorios o zonas de trabajo de nivel 3 y 4 se precisaría un nivel de seguridad 3: cabina con filtros HEPA (*high-efficiency particulate air*) que si el aire recircula dentro del laboratorio deben de revisarse anualmente. Si se utilizan grandes inóculos de micobacterias, como en los laboratorios de nivel 4, se aconseja disponer de una habitación con presión negativa. No estará permitido manipular fuera de las campanas de seguridad medios de cultivo con crecimiento de microorganismos.

ANEXO 2

PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES⁸⁶

CULTIVO

Medio Sauton

L- Asparagina	4.0 g
Ácido cítrico- H ₂ O	2.0 g
Sulfato de magnesio	0.5 g
Fosfato dipotásico	0.5 g
Citrato de amonio férrico	0.05 g
Glicerol	60 g
H ₂ O destilada	Aforar a 1000 mL

ELECTROFORESIS

1. - Solución de acrilamida para el gel separador (37.7% T 0.5% C_{bis})

Acrilamida	37.5 g
Bisacrilamida	0.1875 g
Agua destilada c. b. p	100 mL

2. - Solución de acrilamida para el gel concentrador (39.4% T 4.8% C_{bis})

Acrilamida	37.5 g
Bisacrilamida	1.875 g
Agua destilada c. b. p	100 mL

3. - Solución amortiguadora para el gel separador (Tris 3.0 M, pH 9.3)

Tris-base	16.1 g
Tris-HCl	2.7 g
Agua destilada c. b. p	50 mL

4. - Solución amortiguadora para el gel concentrador (Tris 0.5 M, pH 6.8)

Tris-base	0.075 g
Tris-HCl	3.85 g
Agua destilada c. b. p	50 mL

5. - Dodecil sulfato de sodio al 10%

SDS	1 g
Agua destilada c. b. p	10 mL

6. - Persulfato de amonio (psa) al 10%

Persulfato de amonio	0.1g
Agua destilada c. b. p	1.0 mL

7. - Azul de bromofenol (0.5% p/v en etanol al 10%)

Azul de bromofenol	0.05 g
Etanol al 10%	10 mL

8. - Glicerol al 10%

9. - Regulador de corrimiento

Glicina	57.08 g
Tris-Base	10.26 g
Tris-HCl	2.45 g
SDS	2 g
Agua destilada	Aforar a 2 L

10. - Regulador de muestra

Regulador del gel concentrador (4)	1.25 mL
SDS al 10%	1.0 mL
Glicerol	1.5 mL
Ditiotreitol (DTT)	0.023g
Agua destilada c.b.p	10 mL

TINCIÓN DE PROTEÍNAS

1. - Solución madre para la tinción de proteínas con azul de Coomassie

Azul de Coomassie R-250	2 g
Agua destilada	200 mL

Disolver en agua caliente, filtrar en papel Wathman No.1 y conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

2. - Colorante de trabajo azul de Coomassie

Solución madre de azul de Coomassie	31.3 mL
Metanol	125 mL
Ácido acético glacial	25 mL
Agua destilada c.b.p	250 mL

Mezclar, y filtrar con papel Wathman No.1, conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

3. -Solución decolorante de geles teñidos con azul de Coomassie

Metanol	500 mL
Ácido acético glacial	100 mL
Agua destilada	400 mL

ELECTROTRANSFERENCIA

1. -Regulador de transferencia

Tris-base	6.04 g
Glicina	28.8 g
Agua destilada	1400 mL
Metanol	400 mL

Se ajusta el pH a 8.3 con hidróxido de sodio 1 M, aforar a 2 litros con agua destilada, conservar en refrigeración, puede ser usado 3 veces.

2. -Colorante rojo de Ponceau S

Ácido tricloroacético	3 g
Agua tridestilada	100 ml
Rojo de Ponceu S	0.0200 g

INMUNODETECCION

1. -PBS 0.01M pH 7.4

NaCl	0.06 g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	3.0 g
Na ₂ HPO ₄ anhidro	12.8 g
Agua destilada	

Se ajusta el pH a 7.4 y aforar a 1 litro con agua destilada.

2. - PBS-Tween₂₀ 0.1%

PBS 0.01M pH 7.4	1 L
Tween ₂₀	1 mL

3.- Solución de bloqueo para la IET:

PBS-leche 5%-Tween₂₀ 0.1%

Leche	5.0 g
PBS-Tween ₂₀ 0.1%	100 mL

4.- Sueros problema y testigos

Dilución 1:500 en PBS- leche 5%- Tween₂₀ 0.1%

5.- Conjugado IgG cabra marcada con peroxidasa anti-IgG humana (*PIERCE*)

Dilución 1:2000 en PBS-leche 5%-Tween₂₀ 0.1%

6.- Sustrato

Tetracloruro de diamino bencidina (DAB)	0.005g
Tris 0.05 M pH 7.4	10 mL
H ₂ O ₂ al 30%	3 µL

ELISA

1. Solución de bloqueo albúmina bovina fracción V al 1% en PBS pH 7.4

Albúmina sérica bovina	1.0 g
Amortiguador de PBS pH 7.4	100 mL

2. Sueros problema y testigos

Diluidos 1:500 en solución PBS- albúmina 1%

3. Solución de Conjugado IgG cabra marcada con peroxidasa anti-IgG humana (*PIERCE*)

Dilución 1:4000, en solución de bloqueo.

4. Solución de sustrato de la peroxidasa

Ortofenilendiamina (OPD)	0.005 g
Regulador PBS	12.5 mL
Peróxido de hidrógeno al 30%	10 μ L
Preparar al momento de su uso	

5. Solución para detener la reacción: H₂SO₄ 4N.

ANEXO 3

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY

SOLUCIONES

1. Carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 2% en NaOH 0.1N
2. Tartrato de sodio al 2%
3. Sulfato de cobre (CuSO_4) al 1%

Solución A (estable 1 día): 50 mL de Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1N
 0.5 mL de tartrato de sodio al 2%
 0.6 mL de sulfato de cobre al 1%

Solución B: Reactivo de Folin Ciocalteu 1:1 en H_2O destilada

Solución C: Solución estándar de proteínas: albúmina sérica bovina (BSA) 0.2 mg/mL = 20 mg/100 mL

Procedimiento:

Preparar una curva de calibración con las siguientes concentraciones: 5, 10, 20, 40, 80, 100 y 200 μg de BSA por mL y las diluciones problema como se indica en el siguiente cuadro:

Tubo	0	1	2	3	4	5	6	7	8*	9**
μL de proteína	—	25	50	100	200	400	500	1000	—	—
μg de proteína	—	5	10	20	40	80	100	200	—	—
mL de H_2O destilada	1.0	0.975	0.950	0.9	0.8	0.6	0.5	—	—	—
mL problema	—	—	—	—	—	—	—	—	1.0	1.0
mL solución A	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Mezclar e incubar 10 minutos a temperatura ambiente										
mL solución B	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Mezclar e incubar de 30 minutos a 2 horas a temperatura ambiente										

Preparar diluciones del problema (antígeno) en H_2O destilada (*1/50 y **1/100).
 Leer a $\lambda = 500\text{nm}$

ANEXO 4

TINCIONES PARA GELES DE POLIACRILAMIDA

TINCION PARA LIPIDOS CON SUDAN NEGRO B⁸⁸.

Preparar una solución saturada de Sudán Negro B en etanol al 60 % a 37°C.

Enfriar la solución a temperatura ambiente y filtrar.

Antes de usarse, se filtra otra vez y se agrega 0.1 mL de hidróxido de sodio al 25 % por cada 50 mL de colorante. El gel se tiñe por 24 horas y se lava con etanol al 50 % (30 minutos).

TINCIÓN PARA PROTEÍNAS AZUL DE COOMASSIE⁸⁸.

Colocar en un recipiente limpio aproximadamente 200 mL del colorante de trabajo de azul de Coomassie y el gel chico, si se quiere de una tinción rápida, cubrir el recipiente e incubar 1 hora a 37°C, si no es así, incubar a temperatura ambiente 4 horas y en agitación continua. Luego retirar el colorante y agregar la solución decolorante cambiando las veces necesarias hasta observar la nitidez de las bandas. El colorante de trabajo puede usarse hasta 5 veces al igual que la solución decolorante pues ésta se filtra en carbón activado y se vuelve a utilizar.

ANEXO 5

RESULTADOS AMPLIADOS

Al realizar la electroforesis del extracto soluble de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (ESMTB), en geles de poliacrilamida al 18% se separaron por carga y por peso molecular sus componentes. Mediante la tinción con azul de Coomassie se observó el patrón antigénico proteínico y con Sudán Negro B se hizo evidente la fracción lipídica de aproximadamente 4 kDa denominada 4MT.

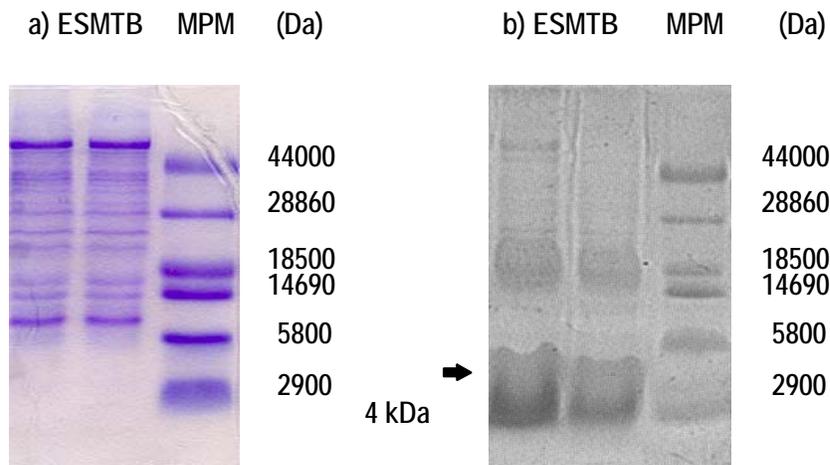


Figura 7. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 18% y glicerol al 1% con extracto soluble de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (ESMTB):

a) Tinción Azul de Coomassie, b) Tinción Sudán Negro B aquí se identificó el carácter lipídico de la molécula 4MT al teñirse solamente con este último.

Los marcadores de peso molecular comerciales utilizados están integrados por seis componentes proteínicos que sirvieron como estándar para establecer el peso aproximado de la fracción lipídica.

Tabla 6. Marcadores de bajo peso molecular (MPM) preteñidos (GIBCO)

Componente	Peso molecular reportado (Da)
Insulina	2900
Inhibidor de tripsina bovina	5800
Lisozima	14690
β -lactoglobulina	18500
Anhidrasa carbónica	28860
Ovoalbúmina	44000

El cálculo del peso molecular de la banda lipídica de interés (4MT) se realizó calculando el Rf (relación de frentes) de cada marcador proteínico así como de la 4MT tomando en cuenta la distancia total del corrimiento.

Finalmente, se elaboró una curva estándar con los Rf (eje x) y el logaritmo del peso molecular de cada marcador proteínico (eje y), la cual se muestra en la Figura 8.

Tabla 7. Datos para la curva estándar

Distancia recorrida por el MPM (cm)	Eje X: Rf de cada MPM (distancia/5.35 cm)	Eje Y (log del peso molecular)
4.1	0.7663	3.4624
3.4	0.6355	3.7634
2.85	0.5327	4.1670
2.6	0.4860	4.2672
1.95	0.3645	4.4603
1.4	0.2617	4.6435
3.9**	0.729	3.5985

** Distancia recorrida por la fracción lipídica 4MT

Curva estándar

$$y = mx + b; \quad \log_{10} \text{PM} = m (\text{Rf}) + b$$

$$\text{Donde } b = 5.3410; m = -2.3902; r^2 = 0.9707$$

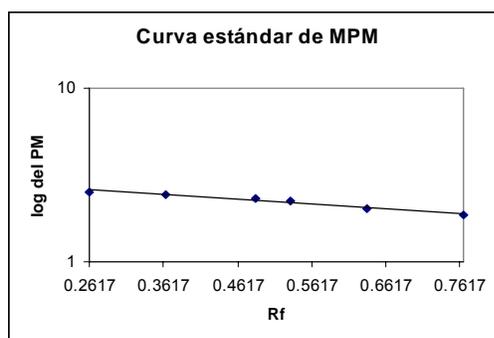


Figura 8. Curva estándar de marcadores de bajo peso molecular.

Se interpoló el valor del Rf de la banda de en la curva estándar y al calcular el antilog, el peso molecular obtenido fue aproximadamente 3.6 kDa.

Los sueros estudiados fueron procesados bajo las condiciones estándares establecidas para las técnicas: Inmunoelctrotransferencia, ELISA anti-lípido 4MT y ELISA liposomal.

Se realizó la prueba de inmunoelctrotransferencia a la población de: sueros testigos negativos casos de TBEP confirmados por cultivo (grupo 1), casos con baciloscopía positiva, (grupo 2) y a los casos diagnosticados sólo clínicamente (grupo 3), utilizando como antígeno el extracto soluble de *Mycobacterium tuberculosis* (ESMTB) cepa H37Ra.

Del grupo 2, formado por los casos con baciloscopía positiva únicamente dos (muestras 90 y 94) fueron positivas con IET. En las figuras 11 y 12 se muestran los resultados de pacientes con baciloscopía positiva. En la figura 12 también se incluyó a parte del grupo 3 (casos diagnosticados sólo clínicamente), los sueros 64, 71, 107, 113, 134, 176 y 179 resultaron positivos por IET.



Figura 11. El total de sueros corresponden a sujetos con baciloscopía positiva (n=21). El antígeno utilizado es ESMTB. Aquí se muestra la banda de 4 kDa, los marcadores de peso molecular (MPM) en Daltones, el testigo positivo (+) y el testigo negativo (-). Las muestras 90 y 94 dieron resultados positivos por IET.



Figura 12. El antígeno utilizado es ESMTB. Aquí se muestra la banda de 4 kDa, los marcadores de peso molecular (MPM) en Daltones, el testigo positivo (+) y el testigo negativo (-). Los tiras 117, 126, 135, 177, 178, 187, 191, corresponden a pacientes con baciloscopía positiva y ninguno tuvo resultados positivo por IET. Del grupo diagnosticado clínicamente (n=157) únicamente las muestras: 64, 71, 107, 113, 134, 176, 179 tuvieron IET positivo.

En la Tabla 8-A se muestran los resultados obtenidos de ELISA e Inmunoelctrotransferencia para la población de sujetos sanos que sirvieron como controles negativos. Cada muestra sérica se procesó por ELISA liposomal, ELISA anti-lípido 4MT e Inmunoelctrotransferencia. En la prueba de ELISA (para sus dos variantes) la densidad óptica (DO) fue leída a 492 nm en cada muestra. Una vez establecido el VC, se consideraron como positivas (1) aquellas muestras que su DO fue mayor al VC calculado, y negativas (0) aquellas que resultaron por debajo de este valor. El grupo control no contó con los resultados de cultivo ni de baciloscopía por lo que se reportó con una (x) que indica que no se realizaron dichas pruebas.

Los resultados se reportaron de acuerdo a la siguiente relación:

0= resultado negativo 1= resultado positivo x= no se realizó

Tabla 8-A. Resultados de pruebas realizadas a sujetos sanos (n=73)

No. Muestra	ELISA Liposomal (VC=0.144)		ELISA anti-lípido 4MT (VC=0.160)		IET	Cultivo	BAAR
	Densidad óptica	Resultado	Densidad óptica	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado
1	0.048	0	0.228	1	0	x	x
2	0.046	0	0.045	0	0	x	x
3	0.088	0	0.081	0	0	x	x
4	0.047	0	0.116	0	0	x	x
5	0.071	0	0.201	1	0	x	x
6	0.21	1	0.154	0	0	x	x
7	0.162	1	0.071	0	0	x	x
8	0.073	0	0.134	0	0	x	x
9	0.057	0	0.057	0	0	x	x
10	0.065	0	0.068	0	0	x	x
11	0.065	0	0.131	0	0	x	x
12	0.072	0	0.105	0	0	x	x
13	0.064	0	0.056	0	0	x	x
14	0.045	0	0.062	0	0	x	x
15	0.059	0	0.068	0	0	x	x
16	0.05	0	0.124	0	0	x	x
17	0.049	0	0.08	0	0	x	x
18	0.072	0	0.257	1	0	x	x
19	0.061	0	0.062	0	0	x	x
20	0.1	0	0.042	0	0	x	x
21	0.049	0	0.098	0	0	x	x
22	0.131	0	0.069	0	0	x	x
23	0.085	0	0.313	1	0	x	x

Únicamente las muestras 6 y 7 fueron positivas al ELISA liposomal y negativas al ELISA anti-lípido 4MT mientras que las muestras 1, 5, 18 y 23 fueron positivas al ELISA anti-lípido 4MT y negativas al ELISA liposomal. El total de muestras de sujetos sanos fue negativo a la prueba de IET y no tienen reportado la realización de cultivo y baciloscopía.

Resultados de pruebas realizadas en sujetos sanos (continuación)

No. Muestra	ELISA Liposomal (VC=0.144)		ELISA anti-lípido 4MT (VC=0.160)		IET	Cultivo	BAAR
	Densidad óptica	Resultado	Densidad óptica	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado
24	0.105	0	0.076	0	0	x	x
25	0.091	0	0.036	0	0	x	x
26	0.08	0	1.09	1	0	x	x
27	0.102	0	0.161	1	0	x	x
28	0.055	0	0.061	0	0	x	x
29	0.077	0	0.027	0	0	x	x
30	0.1	0	0.038	0	0	x	x
31	0.084	0	0.121	0	0	x	x
32	0.146	1	0.112	0	0	x	x
33	0.121	0	0.178	1	0	x	x
34	0.085	0	0.058	0	0	x	x
35	0.092	0	0.17	1	0	x	x
36	0.082	0	0.442	1	0	x	x
37	0.125	0	0.133	0	0	x	x
38	0.079	0	0.105	0	0	x	x
39	0.084	0	0.221	1	0	x	x
40	0.101	0	0.059	0	0	x	x
41	0.076	0	0.062	0	0	x	x
42	0.135	0	0.151	0	0	x	x
43	0.13	0	0.078	0	0	x	x
44	0.106	0	0.325	1	0	x	x
45	0.056	0	0.148	0	0	x	x
46	0.061	0	0.097	0	0	x	x
47	0.082	0	0.334	1	0	x	x
48	0.058	0	0.145	0	0	x	x
49	0.093	0	0.223	1	0	x	x
50	0.083	0	0.216	1	0	x	x
51	0.035	0	0.169	1	0	x	x
52	0.091	0	0.197	1	0	x	x
53	0.062	0	0.074	0	0	x	x
54	0.1	0	0.054	0	0	x	x
55	0.089	0	0.154	0	0	x	x
56	0.061	0	0.395	1	0	x	x
57	0.047	0	0.143	0	0	x	x
58	0.089	0	0.076	0	0	x	x
59	0.077	0	0.175	1	0	x	x
60	0.041	0	0.08	0	0	x	x
61	0.09	0	0.182	1	0	x	x
62	0.124	0	0.045	0	0	x	x
63	0.056	0	0.086	0	0	x	x
64	0.05	0	0.077	0	0	x	x
65	0.045	0	0.12	0	0	x	x
66	0.157	1	0.042	0	0	x	x

Las muestra 32 y 66 fueron positivas al ELISA liposomal, las muestras 26, 27, 33, 35, 36, 39, 44, 47, 49-52, 56, 59, 61 fueron ELISA anti-lípido 4MT positivo. El total de muestras de sujetos sanos fue negativo a la IET y no tienen reportado la realización de cultivo y baciloscopia.

Resultados de pruebas realizadas en sujetos sanos (continuación)

No. Muestra	ELISA Liposomal (VC=0.144)		ELISA anti-lípido 4MT (VC=0.160)		IET	Cultivo	BAAR
	Densidad óptica	Resultado	Densidad óptica	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado
67	0.06	0	0.101	0	0	x	x
68	0.085	0	0.076	0	0	x	x
69	0.061	0	0.098	0	0	x	x
70	0.062	0	0.071	0	0	x	x
71	0.038	0	0.121	0	0	x	x
72	0.07	0	0.078	0	0	x	x
73	0.033	0	0.205	1	0	x	x
% de positividad		4/73 5.48%		20/73 27.4%	0/73 0%	—	—

La muestra 73 fue positiva sólo al ELISA anti-lípido 4MT. El total de muestras de sujetos sanos fue negativo a la prueba de IET. Se incluyó el % de positividad obtenido en cada una de las pruebas realizadas al grupo 1.

Los resultados de las pruebas realizadas (ELISA e IET) para la población de sujetos sólo diagnosticados clínicamente (grupo 3) se despliegan en la Tabla 14-A, las muestras se agruparon de acuerdo a la localización de la enfermedad. En la prueba de ELISA (para sus dos variantes) la densidad óptica (DO) fue leída a 492 nm.

Los resultados se reportaron de acuerdo a la siguiente relación:

0= resultado negativo 1= resultado positivo x= no se realizó

Tabla 14-A. Resultados del grupo diagnosticado clínicamente como TBEP (n=157)

TB Pleural 1-14 (n= 14)

No. Muestra	ELISA Liposomal (VC= 0.144)		ELISA anti-lípido 4MT (VC= 0.160)		IET	Cultivo	BAAR
	Densidad óptica	Resultado	Densidad óptica	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado
1	0.263	1	0.281	1	0	x	x
2	0.253	1	0.260	1	0	x	x
3	0.263	1	0.338	1	0	x	x
4	0.044	0	0.097	0	0	x	x
5	0.533	1	0.970	1	0	x	x
6	0.197	1	0.107	0	0	x	x
7	0.256	1	0.116	0	0	x	x
8	0.252	1	0.077	0	0	x	x
9	0.301	1	0.112	0	0	x	x
10	0.234	1	0.047	0	0	x	x
11	0.279	1	0.144	0	0	x	x
12	0.265	1	0.073	0	0	x	x
13	0.325	1	0.380	1	0	x	x
14	0.223	1	0.177	1	0	x	x

En este grupo, las muestras que resultaron positivas tanto al ELISA liposomal como al ELISA anti-lípido 4MT: 1- 3, 5, 13, 14. Las muestras 6-12 fueron únicamente positivas al ELISA liposomal. El total de muestras de este grupo fue negativo a la IET. Ninguna de las muestras de TB Pleural reportó que se le haya realizado cultivo ni baciloscopia.

TB Linfática 15-19, 21, 23-56, 59, 60 (n= 42)

No. Muestra	ELISA Liposomal (VC= 0.144)		ELISA anti-lípido 4MT (VC= 0.160)		IET	Cultivo	BAAR
	Densidad óptica	Resultado	Densidad óptica	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado
15	0.702	1	1	1	0	x	x
16	0.136	0	0.276	1	0	x	x
17	0.355	1	0.579	1	0	x	x
18	0.219	1	0.097	0	0	x	x
19	0.626	1	0.939	1	0	x	x
21	0.258	1	0.077	0	0	x	x
23	0.543	1	0.169	1	0	x	x
24	0.144	0	0.116	0	0	x	x
25	0.242	1	0.465	1	0	x	x
26	0.251	1	0.167	1	0	x	x
27	0.156	1	0.204	1	0	x	x
28	0.246	1	0.204	1	0	x	x
29	0.245	1	0.209	1	0	x	x
30	0.333	1	0.174	1	0	x	x
31	0.105	0	0.071	0	0	x	x
32	0.169	1	0.157	0	0	x	x
33	0.22	1	0.051	0	0	x	x
34	0.18	1	0.085	0	0	x	x
35	0.373	1	0.024	0	0	x	x
36	0.381	1	0.2	1	0	x	x
37	0.282	1	0.044	0	0	x	x
38	0.512	1	0.505	1	0	x	x
39	0.442	1	0.078	0	0	x	x
40	0.539	1	0.092	0	0	x	x
41	0.247	1	0.05	0	0	x	x
42	0.288	1	0.051	0	0	x	x
43	0.225	1	0.118	0	0	x	x
44	0.241	1	0.062	0	0	x	x
45	0.499	1	0.243	1	0	x	x
46	0.686	1	0.348	1	0	x	x
47	0.364	1	0.091	0	0	x	x
48	0.541	1	0.051	0	0	x	x
49	0.277	1	0.06	0	0	x	x
50	0.321	1	0.165	1	0	x	x
51	0.485	1	0.187	1	0	x	x
52	0.778	1	0.901	1	0	x	x
53	0.783	1	0.396	1	0	x	x
54	0.376	1	0.114	0	0	x	x
55	0.289	1	0.081	0	0	x	x
56	0.536	1	0.09	0	0	x	x
59	0.197	1	0.135	0	0	x	x
60	0.39	1	0.263	1	0	x	x

Las muestras del grupo que resultaron positivas tanto al ELISA liposomal como a la ELISA anti-lípido 4MT fueron: 15, 17, 19, 23, 25-30, 36, 38, 45, 46, 50-53 y 60. Las muestras 18, 21, 32-35, 37, 39-44, 47-49, 54-56 y 59 fueron solamente positivas al ELISA liposomal, mientras que la 16 exclusivamente fue positiva al ELISA anti-lípido 4MT. El total de muestras de este grupo fue negativo a la IET.

TB Osteoarticular 61, 64-67 (n= 5)

No. Muestra	ELISA Liposomal (VC= 0.144)		ELISA anti-lípido 4MT (VC= 0.160)		IET	Cultivo	BAAR
	Densidad óptica	Resultado	Densidad óptica	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado
61	0.383	1	0.354	1	0	x	x
64	0.181	1	0.041	0	1	x	x
65	0.189	1	0.175	1	0	x	x
66	0.187	1	0.056	0	0	x	x
67	0.333	1	0.289	1	0	x	x

Las muestras 61, 65 y 67 fueron positivas en ambos ELISA, el total de muestras de TB osteoarticular fue positivo para ELISA liposomal sin embargo, ninguna de ellas reportó que se le haya realizado cultivo. La 64 solamente mostró reconocimiento a la 4MT por IET.

TB del SNC 68-75 (n= 8)

No. Muestra	ELISA Liposomal (VC= 0.144)		ELISA anti-lípido 4MT (VC= 0.160)		IET	Cultivo	BAAR
	Densidad óptica	Resultado	Densidad óptica	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado
68	0.171	1	0.068	0	0	x	x
69	0.153	1	0.110	0	0	x	x
70	0.109	0	0.098	0	0	x	x
71	0.154	1	0.086	0	1	x	x
72	0.166	1	0.134	0	0	x	x
73	0.246	1	0.163	1	0	x	x
74	0.145	1	0.085	0	0	x	x
75	0.220	1	0.095	0	0	x	x

Siete muestras de este grupo fueron positivas al ELISA liposomal, mientras que la 73 fue positiva en ambos ELISA y la muestra 71 resultó positiva por IET. Cabe señalar que ninguna de las muestras de TB SNC reportó que se les haya realizado cultivo ni BAAR.

TB Genitourinaria 77, 82, 87, 91, 92, 97- 108, 112- 115 (n=21)

No. Muestra	ELISA Liposomal (VC= 0.144)		ELISA anti-lípido 4MT (VC= 0.160)		IET	Cultivo	BAAR
	Densidad óptica	Resultado	Densidad óptica	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado
77	0.213	1	0.198	1	0	x	x
82	0.145	1	0.069	0	0	x	x
87	0.31	1	0.518	1	0	x	x
91	0.123	0	0.083	0	0	x	x
92	0.279	1	0.485	1	0	x	x
97	0.362	1	0.418	1	0	x	x
98	0.329	1	0.17	1	0	x	x
99	0.151	1	0.081	0	0	x	x
100	0.263	1	0.103	0	0	x	x
101	0.19	1	0.079	0	0	x	x
102	0.129	0	0.143	0	0	x	x

Las muestras 77, 87, 92, 97, 98 fueron positivas en ambos ELISA y las muestras 82, 99-101 resultaron positivas únicamente al ELISA liposomal.

Continuación

No. Muestra	ELISA Liposomal (VC= 0.144)		ELISA anti-lípido 4MT (VC= 0.160)		IET	Cultivo	BAAR
	Densidad óptica	Resultado	Densidad óptica	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado
103	0.357	1	0.354	1	0	x	x
104	0.244	1	0.201	1	0	x	x
105	0.13	0	0.136	0	0	x	x
106	0.229	1	0.34	1	0	x	x
107	0.438	1	0.881	1	1	x	x
108	0.192	1	0.053	0	0	x	x
112	0.095	0	0.107	0	0	x	x
113	0.111	0	0.279	1	1	x	x
114	0.064	0	0.052	0	0	x	x
115	0.254	1	0.123	0	0	x	x

Las muestras 103, 104, 106, 107 fueron ELISA liposomal y ELISA anti-lípido 4MT positivas. Las muestras 108 y 115 sólo fueron positivas al ELISA liposomal mientras que la 113 fue ELISA anti-lípido 4MT e IET positiva. Se destaca la muestra 107 fue positiva por ambos ELISA y por IET.

TB Digestiva / Peritoneal 116, 118-125 (n=9)

No. Muestra	ELISA Liposomal (VC= 0.144)		ELISA anti-lípido 4MT (VC= 0.160)		IET	Cultivo	BAAR
	Densidad óptica	Resultado	Densidad óptica	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado
116	0.041	0	0.060	0	0	x	x
118	0.366	1	0.074	0	0	x	x
119	0.368	1	0.082	0	0	x	x
120	0.232	1	0.127	0	0	x	x
121	0.089	0	0.269	1	0	x	x
122	0.653	1	1.104	1	0	x	x
123	0.191	1	0.340	1	0	x	x
124	0.193	1	0.085	0	0	x	x
125	0.443	1	0.726	1	0	x	x

Las muestras 122, 123 y 125 coincidieron en ser positivas en ambos ELISA y las muestras 118-120 y 124 únicamente fueron positivas al ELISA liposomal. Estas nueve muestras fueron negativas a la IET. Ninguna de las muestras de TB Digestiva/Peritoneal reportó que se le haya realizado cultivo.

TB Diseminada 127-129, 131, 132, 134, 137-171 (n=41)

No. Muestra	ELISA Liposomal (VC= 0.144)		ELISA anti-lípido 4MT (VC= 0.160)		IET	Cultivo	BAAR
	Densidad óptica	Resultado	Densidad óptica	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado
127	0.553	1	0.621	1	0	x	x
128	0.317	1	0.158	0	0	x	x
129	0.225	1	0.171	1	0	x	x
131	0.175	1	0.239	1	0	x	x
132	0.402	1	0.845	1	0	x	x
134	0.882	1	1.23	1	1	x	x
137	0.276	1	0.175	1	0	x	x
138	0.214	1	0.164	1	0	x	x
139	0.214	1	0.116	0	0	x	x
140	0.392	1	0.38	1	0	x	x
141	0.197	1	0.059	0	0	x	x
142	0.309	1	0.055	0	0	x	x
143	0.348	1	0.223	1	0	x	x
144	0.195	1	0.097	0	0	x	x
145	0.219	1	0.357	1	0	x	x
146	0.157	1	0.205	1	0	x	x
147	0.164	1	0.041	0	0	x	x
148	0.133	0	0.15	0	0	x	x
149	0.361	1	0.079	0	0	x	x
150	0.199	1	0.047	0	0	x	x
151	0.198	1	0.181	1	0	x	x
152	0.6	1	0.966	1	0	x	x
153	0.219	1	0.079	0	0	x	x
154	0.306	1	0.366	1	0	x	x
155	0.528	1	0.661	1	0	x	x
156	0.225	1	0.131	0	0	x	x
157	0.265	1	0.126	0	0	x	x
158	0.393	1	0.136	0	0	x	x
159	0.2	1	0.123	0	0	x	x
160	0.257	1	0.067	0	0	x	x
161	0.396	1	0.238	1	0	x	x
162	0.426	1	0.909	1	0	x	x
163	0.223	1	0.079	0	0	x	x
164	0.114	0	0.126	0	0	x	x
165	0.349	1	0.13	0	0	x	x
166	0.282	1	0.284	1	0	x	x
167	0.21	1	0.353	1	0	x	x
168	0.229	1	0.105	0	0	x	x
169	0.191	1	0.16	1	0	x	x
170	0.421	1	0.181	1	0	x	x
171	0.228	1	0.088	0	0	x	x

La mayoría de estas muestras excepto la 148 y la 164 fueron positivas al ELISA liposomal. Las muestras 127, 129, 131, 132, 134, 137, 138, 140, 143, 145, 146, 151, 152, 154, 155, 161, 162, 166, 167, 169, 170 también fueron positivas al ELISA anti-lípido 4MT. Se destaca que la muestra 134 fue positiva por ambos ELISA e IET.

TB Otras 172-176, 179-186, 188, 189, 192, 194 (n=17)

No. Muestra	ELISA Liposomal (VC= 0.144)		ELISA anti-lípido 4MT (VC= 0.160)		IET	Cultivo	BAAR
	Densidad óptica	Resultado	Densidad óptica	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado
172	0.119	0	0.213	1	0	x	x
173	0.148	1	0.159	0	0	x	x
174	0.142	0	0.221	1	0	x	x
175	0.404	1	0.926	1	0	x	x
176	0.098	0	0.098	0	1	x	x
179	0.458	1	0.782	1	1	x	x
180	0.257	1	0.09	0	0	x	x
181	0.272	1	0.25	1	0	x	x
182	0.539	1	0.407	1	0	x	x
183	0.087	0	0.351	1	0	x	x
184	0.262	1	0.082	0	0	x	x
185	0.156	1	0.034	0	0	x	x
186	0.211	1	0.086	0	0	x	x
188	0.141	0	0.119	0	0	x	x
189	0.191	1	0.141	0	0	x	x
192	0.361	1	0.197	1	0	x	x
194	0.229	1	0.219	1	0	x	x

Las muestras 173, 175, 179-182, 184-186, 189, 192 y 194 fueron positivas al ELISA liposomal, mientras las muestras 172, 174, 175, 179, 181-183, 192 y 194 fueron positivas al ELISA anti-lípido 4MT. Las muestras que coincidieron en ser positivas en ambos ELISA fueron 175, 179, 181, 182, 192 y 194. Sólo dos muestras la 176 y la 179 fueron positivas a la IET, se destaca que esta última fue positiva a las tres pruebas.

ANEXO 6

CÁLCULO DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALORES PREDICTIVOS⁹³.

Para determinar estos parámetros se hace un cuadro de correlación:

	Enfermedad presente	Enfermedad ausente	Total
Prueba positiva	A	B	A+B
Prueba negativa	C	D	C+D
Total	A+C	B+D	A+B+C+D

Donde:

A= verdaderos positivos

B= falsos positivos

C= falsos negativos

D= verdaderos negativos

A+C= total de personas enfermas o prevalencia de la enfermedad

B+D= total de personas no enfermas

A+B+C+D= población total

1. **Sensibilidad:** es la capacidad de la prueba de identificar correctamente en una población, los individuos que presentan la enfermedad estudiada, es decir, los “verdaderos positivos”. Se expresa dando la proporción de los sujetos correctamente clasificados como positivos con relación al conjunto de enfermos (A+C).

$$S = A / (A+C) \times 100$$

2. **Especificidad:** es la capacidad de la prueba de identificar correctamente aquellos que no presentan la enfermedad estudiada, es decir, los “verdaderos negativos”. Se expresa dando la proporción de los verdaderos negativos (D) con relación al conjunto de no enfermos (B+D).

$$E = D / (B+D) \times 100$$

3. **Valor predictivo de positividad (VPP):** probabilidad de identificar los enfermos en un grupo de sujetos considerados como positivos.

$$VPP = A / (A+B) \times 100$$

4. **Valor predictivo de negatividad (VPN):** Probabilidad de que la enfermedad no exista en un grupo de sujetos considerados como negativos.

$$VPN = D / (C+D) \times 100$$

5. **Tasa de Falsos Positivos (TFP):** Aquellos pronosticados como enfermos que fueron sanos entre el número total de sanos.

$$TFP = B / (B+D) \times 100$$

6. **Tasa de Falsos Negativos (TFN):** Aquellos pronosticados como sanos que fueron enfermos entre el total de enfermos.

$$TFN = C / (A+C) \times 100$$

REFERENCIAS POR ORDEN DE APARICIÓN

1. SECRETARÍA DE SALUD (2005). Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2 1993, para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud. México, pp 7, 20-22.
2. SHARMA SK and A MOHAN (2004). Extrapulmonary tuberculosis, *Indian J Med Res*, **120**:316-353.
3. CARPENTIER E, B DROUILLARD, M DAILLOUX, D MOINARD, E VALLEE, B DUTILH, J MAUGEIN, E BERGOGNE-BEREZIN and B CARBONNELLE (1995). Diagnosis of tuberculosis by amplicor *Mycobacterium tuberculosis* test: a multicenter study. *J Clin Microbiol*, **33**(12):3106-3110.
4. SECRETARÍA DE SALUD. SUBSECRETARIA DE PREVENCIÓN Y PROMOCIÓN DE LA SALUD. CENTRO NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA Y CONTROL DE ENFERMEDADES (2004). Guía para la atención de pacientes con tuberculosis multifarmacorresistente. México, pg 7.
5. DEANGELIS C and A FLANAGIN (2005). Tuberculosis – a global problem requiring a global solution. [Editorial]. *JAMA*, **293**(22):2793-2794.
6. GARCÍA GARCÍA ML, A PONCE DE LEÓN, ME JIMÉNEZ CORONA, L FERREIRA REYES, M BOBADILLA DEL VALLE, B CANO ARELLANO, S CANIZALES QUINTERO, A MARTÍNEZ GAMBOA y J SIFUENTES OSORNIO (2006). Epidemiología molecular de la tuberculosis en México. Presentado en el Simposio Fronteras del conocimiento en tuberculosis y otras micobacteriosis. Memorias; 2006 Marzo 8-10; D. F, México, pp 47-48.
7. SECRETARIA DE SALUD (2004), Tuberculosis, reto por resolver en las poblaciones más pobres del país, [En línea] Comunicado de prensa No. 322, 25 nov. 2004<http://www.salud.gob.mx/ssa_app/noticias/datos/2004-11-25_1111.html>[consulta febrero 2005].
8. HERNÁNDEZ SOLÍS A, R CICERO SABIDO, H OLIVERA, V RIVERO, E RAMÍREZ, A ESCOBAR GUTIÉRREZ (2003). Tuberculosis is still a major cause of cervical lymphadenopathies in adults from developing countries. *Epidemiol Infect*, **131**:1-6.
9. LLACA DÍAZ JM, A FLORES ARÉCHIGA, MG MARTÍNEZ GUERRA, PC CANTÚ MARTÍNEZ. La baciloscopia y el cultivo en el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar. *RESPYN* [En línea] 2002;4(3). Disponible en: URL: <http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/iv/3/articulos/tbexp_co.htm> [consulta febrero 2005].

10. SADA E, PJ BRENNAN, T HERRERA, and M TORRES (1990). Evaluation of Lipoarabinomannan for the serological diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, **28**(12):2587-2590.
11. HERNÁNDEZ SOLÍS A, H OLIVERA, V RIVERO, E RAMÍREZ, J TRUJILLO CHÁVEZ, A ESCOBAR GUTIÉRREZ, R CICERO SABIDO (2004). Identificación por análisis del pleomorfismo de fragmentos de restricción (RFLP) de *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes con tuberculosis extrapulmonar y SIDA [Resumen]. *Neumología y cirugía del Tórax*, **63**(1):22.
12. ROOK GAW and R HERNÁNDEZ PANDO (1996). The pathogenesis of tuberculosis. *Annu Rev Microbiol*, **50**:259-284.
13. ONG A, J CREASMAN, PC HOPEWELL, LC GONZALEZ, M WONG, RM JASMER and CL DALEY (2004). A molecular epidemiological assessment of extrapulmonary tuberculosis in San Francisco. *Clin Inf Dis*, **38**:25-31.
14. HERNÁNDEZ PANDO R, M JEYANATHAN, G MENGISTU, D AGUILAR, H OROZCO, M HARBOE, GAW ROOK and G BJUNE (2000). Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. *Lancet*, **356**:2133-2137.
15. NIEMANN S, E RICHTER, and S RUSCH-GERDES (2000). Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. *J Clin Microbiol*, **38**(1):152-157.
16. BALANDRANO CAMPOS S, G ANZALDO FLORES, GP PEÑA FLORES y X BETANCOURT-MORILLO (1996). Manual de procedimientos de laboratorio InDRE/SAGAR: Tuberculosis. México, Secretaría de Salud, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Organización Panamericana de la Salud, pp 15-24, 50-77.
17. GARCÍA RAMOS E y NR PARRA MALDONADO (1984). Manual para aislamiento e identificación de *M. tuberculosis* y otras micobacterias, 2.ed., México, ENCB-IPN, pp 1.320-1.339.
18. TORALES TORALES AN y N GONZÁLEZ SALDAÑA (1997). Tuberculosis. En: *Infectología clínica pediátrica*, 3.ed. González Saldaña N, AN Torres Torres y D Gómez Barreto, editores. México, Trillas, pp 105-145.
19. JAWETZ E, J MELNICK y E ADELBERG (2002). *Microbiología médica*, 17. ed., México, El manual moderno, pp 345-356.
20. WARREN L and E JAWETZ (2000). *Medical Microbiology & Immunology: Examination & Board Review*, 6.ed., U.S.A, Mc Graw-Hill. LANGE Medical book, pp 134-137.
21. FARGA CV (1992). *Tuberculosis*, 2.ed., Santiago de Chile, Mediterráneo, pp 17-26, 43-45, 67-93.

22. TORRES ROJAS M (1992) Reconocimiento de antígenos de *M. tuberculosis* por pacientes con diagnóstico de Tuberculosis y sus convivientes. México. Tesis [Maestría en Ciencias con especialidad en Inmunología], IPN, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas., pp 1-6.
23. COWAN ST y KJ STEEL 'S (1979). Manual para la identificación de bacterias de importancia médica, 2.ed., México, Editorial Continental, pp 112-115.
24. GOROCICA P, M del C JIMÉNEZ MARTÍNEZ, Y GARFIAS, I SADA y R LASCURAIN (2005). Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*, **18**(2):142-153.
25. STOKES RW, R NORRIS JONES, DE BROOKS, TJ BEVERIDGE, D DOXSEE and LM THORSON (2004). The glycan-rich outer layer of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis* acts as an antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages. *Infect Immun*, **72**:5676-5686.
26. FENTON MJ and MW VERMEULEN (1996). Immunopathology of tuberculosis: Roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun*, **64**:683-690.
27. MURRAY P, KS ROSENTHAL, GS KOBAYASHI, MA PFALLER. (2003). Microbiología médica, 4. ed., Madrid, Mosby-Doyma, pp 361-372.
28. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (2006), ¿Qué es la tuberculosis?. [En línea] <<http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/tb-boletin.htm>>[consulta julio 2007].
29. YOUMANS GP (1984). Infectología Clínica, 2. ed., México, Interamericana, pp 418-439.
30. SCHLOSSER D (2000). Tuberculosis e infecciones por micobacterias no tuberculosas, 4. ed., México, Mc Gram-Hill Interamericana, pp 54-75.
31. ANÓNIMO (1997). Does *Mycobacterium paratuberculosis* cause Crohn's Disease? [En línea] Disponible en: <<http://alan.kennedy.name/crohns/welcome.htm>>[consulta enero 2007]
32. VON REYN CF and JM VUOLA (2002). New vaccines for the prevention of tuberculosis. *Clin Infect Dis*, **35**:465-474.
33. DÍAZ SOBERANES M de la L, J NOVALES SANTA COLOMA, CR GONZÁLEZ BONILLA (2001). Aspectos generales de la respuesta inmune ante *Mycobacterium tuberculosis*. *Dermatología Rev Mex*, **45**(2):82-87.

34. HERNÁNDEZ PANDO R, H OROZCO E, A SAMPIERI, L PAVÓN, C VELASQUILLO, J LARRIVA-SAHM, JM ALCOCER, MV MADRID (1996). Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*, **89**:26-33.
35. SPELLBERG B and JE EDWARDS Jr (2001). Type 1/Type 2 Immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis*, **32**:76-102.
36. ROJAS ESPINOSA O (2001), Inmunología (de memoria), 2. ed., México, Panamericana, pp 86,117-121, 202-207, 212-216.
37. WEINER HL (2001). The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and T_R1 and T_H3 regulatory cells. *Nature Immunol*, **2**:671-672.
38. GARCÍA SANCHO FIGUEROA MCE (2001). Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Una revisión de la literatura. *Rev Ins Nal Enf Resp Mex*, **14**(2):114-128.
39. SECRETARÍA DE SALUD (2006). Guía práctica para la atención de la Tuberculosis en niños, niñas y adolescentes. México, Programa Nacional de Tuberculosis, pp 23-27, 43-66, 69-80.
40. ROITT I, J BROSTOFF, D MALE (2000). Inmunología, 5.ed., Madrid, Harcourt, pp 341-350.
41. Abbas AK, AH Lichtman (2004). Inmunología celular y molecular, 5.ed., Madrid, Elsevier, pp 311-323.
42. FLYNN JAL and J CHAN (2001). Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol*, **19**:93-129.
43. BENJAMINI E, R COICO and G SUNSHINE (2000). Immunology: A short course, 4. ed., USA, Wiley-Liss, pp 198-200.
44. COLLINS HL, SH KAUFMANN (2001). The many faces of host responses to tuberculosis. *Immunology*, **103**:1-9.
45. THOMSEN H, J IVANYI, C ESPITIA, A ARYA and M LONDEI (1995). Human CD4-CD8- $\alpha\beta$ + T-cell receptor T cells recognize different mycobacteria strains in the context of CD1b. *Immunology*, **85**:33-40.
46. INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS InDRE (2006). Manual del Taller Internacional de producción de anticuerpos monoclonales contra agentes infecciosos y otras moléculas. México, pp 21-25.
47. WILSHER ML, C HAGAN, R PRESTIDGE, AU WELLS, G MURISON (1999). Human *in vitro* immune responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc Lung Dis*, **79**:371-377.

48. HERNÁNDEZ PANDO R (2004), Inmunopatología de la tuberculosis pulmonar experimental, [En línea] Mensaje Bioquímico, Vol XXVIII. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, México. Disponible en: <<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>> [consulta abril 2007].
49. PRABHA C, KV JALAPATHY, RP MATSA, SD DAS (2007). Differential T helper cell response in tuberculous pleuritis. *Ind J Med Microb.* 25(1):18-23.
50. DIAGBOUGA S, F FUMOUX, A ZOUBGA, P THOMAS SANOU, and G MARCHAL (1997). Immunoblot analysis for serodiagnosis of tuberculosis using a 45/47-kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 4(3):334-338.
51. BECK ST, OM LEITE, RS ARRUDA and AW FERREIRA (2005). Combined use of western blot/ELISA to improve the serological diagnosis of human tuberculosis. *BJID*, 9(1):35-43
52. BOTHAMLEY GH (1995). Serological diagnosis of tuberculosis. *Eur Respir J*, 8 Suppl 20:676-688.
53. RASOFO RAZANAMPARANY V , D MÉNARD, G AURÉGAN, B GICQUEL, and S CHANTEAU (2002). Extrapulmonary and pulmonary tuberculosis in Antananarivo (Madagascar): High clustering rate in female patients. *J Clin Microbiol*, 40:3964-3969.
54. DEMKOW U, J ZIÓLKOWSKI, M FILEWSKA, B BIALAS-CHROMIEC, T ZIELONKA, D MICHALOWSKA-MITCZUK, J KUS, E AUGUSTYNOWICZ, Z ZWOLSKA, E SKOPINSKA-ROZEWSKA, E ROWINSKA-ZAKRZEWSKA (2004). Diagnostic value of different serological tests for tuberculosis in Poland. *J Physiol and Pharm*, 55 Suppl 3:57-66.
55. ZOU YL, JD ZHANG, MH CHEN, GQ SHI, J PRIGNOT and C COCITO (1994) Serological analysis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis with Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for anti-A60 immunoglobulins. *Clin Inf Dis*, 19:1084-1091.
56. JULIÁN E, L MATAS, A PÉREZ, J ALCAIDE, MA LANÉELLE and M LUQUIN (2002). Serodiagnosis of tuberculosis: comparison of immunoglobulin A (IgA) response to sulfolipid I with IgG and IgM responses to 2,3-Diacyltrehalose, 2,3,6-Triacyltrehalose, and cord factor antigens. *J Clin Microbiol*, 40(10) 3782-3788.
57. CHATURVEDI V and HP GUPTA (2001). Evaluation of integral membrane antigens of *Mycobacterium habana* for serodiagnosis of extrapulmonary tuberculosis: association between levels of antibodies and *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *FEMS*, 33:1-7.

58. LYASHCHENKO K, R COLANGELI, M HOUDE, HA JAHDALI, D MENZIES, and ML GENNARO (1998). Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infect Immun*, **66**(8):3936-3940.
59. THONGKRAJAI P, V LULITANON and C CHAMNANVANAKIT (1989). Improved ELISA with immunoabsorbent-purified mycobacterial antigen for serodiagnosis of tuberculosis. *J Med Microbiol*, **30**:101-104.
60. AFFRONTI LF (1996). Mycobacterial antigens: Reagents for tuberculin skin testing and serodiagnosis of tuberculosis. In: Infectious agents and pathogenesis, *Mycobacterium tuberculosis* interactions with the immune system. Bendinelli M, H Friedman, editores. Nueva York, Plenum Press, pp 1-37.
61. DANIEL TM and SM DEBANNE (1987). The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Am Rev Respir Dis*, **135**:1137-1151.
62. YOUNG RA. Stress proteins and immunology (1990). *Annu Rev Immunol*, **8**:401-420.
63. CHAN ED, L HEIFETS, MD ISEMAN (2000). Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review. *Tuberc Lung Dis*, **80**:131-140.
64. POTTUMARTHY S, VC WELLS and AJ MORRIS (2000). A comparison of seven tests for serological diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, **38**(6):2227-2231.
65. ALIFANO M, R DE PASCALLIS, M SOFIA, S FARAONE, M DEL PEZZO, I COVELLI (1998). Detection of IgG and IgA against the mycobacterial antigen A60 in patients with extrapulmonary tuberculosis. *Thorax*, **53**:377-380.
66. TURNEER M, JP VAN VOOREN, J DE BRUYN, E SERRUYS, P DIERCKX and JC YERNAULT (1988) Humoral immune response in human tuberculosis: Immunoglobulins G, A, and M directed against the purified P32 protein antigen of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin. *J Clin Microbiol*, **26**(9):1714-1719.
67. WILKINS EGL and J IVANYI (1990). Potential value of serology for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Lancet*, **336**:641-644.
68. FRANCO J, JJ CAMARENA, JM NOGUEIRA, R BLANQUER, MJ RUIZ, J MARÍN (2001). Serological response (Western blot) to fractions of *Mycobacterium tuberculosis* sonicate antigen in tuberculosis patients and contacts. *Int J Tuberc Lung Dis*, **5**(10):958-962.

69. CASAL ROMÁN M (1992). *Mycobacterium tuberculosis*. En: Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Perea Pérez EJ, editor. 2v. Barcelona, Ediciones Doyma, pp 754-766.
70. CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGÍA (2001). Protocolos de las enfermedades de declaración obligatoria, [En línea] 2.ed., Madrid. Disponible en: <<http://193.146.50.130/htdoes/ve/modificacion-protocolo-TBC.pdf>> [consulta febrero 2005].
71. ESCOBEDO JAIMES, LE (2005) Diagnóstico de Tuberculosis miliar, México, Tesis [Maestría en Ciencias Medicas], UNAM, Facultad de Medicina. División de estudios de postgrado e investigación. Hospital General de México. Ssa., pp 3-5, 11-13.
72. DE WIKIPEDIA, la enciclopedia libre. *Mycobacterium tuberculosis*, [En línea] de <http://es.wikipedia.org/wiki/Mycobacterium_tuberculosis> [consulta febrero 2007].
73. LANIADO LABORÍN R y N CABRALES VARGAS (2005). No siempre una baciloscopía positiva indica tuberculosis. Otra razón para solicitar cultivos rutinariamente. *Rev Inst Enf Resp Mex*, **18**(4):286-289.
74. GOLDEN MP and HR VIKRAM (2005). Extrapulmonary tuberculosis: An overview. *Am Fam Phys*, **72**(9):1761-1768.
75. DINNES J, J DEEKS, H KUNST, A GIBSON, E CUMMINS, N WAUGH, F DROBNIEWSKI and A LALVANI (2007). A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technology Assessment*, **11**(3):2-12.
76. TENORIO G, L ESCOBEDO JAIMES, R SÁNCHEZ SANTIAGO, G CUETO ROBLEDO (2002). Manifestaciones oculares de la tuberculosis miliar. Consideraciones sobre cinco casos. *Rev Inst Natl Enf Resp Mex*, **15**(3):166-171.
77. HUSSAIN SF, M IRFAN, M ABBASI, SS ANWER, S DAVIDSON, R HAQQEE, JA KHAN, M ISLAM (2004). Clinical characteristics of 110 military tuberculosis patients from a low HIV prevalence country. *Int J Tuberc Lung Dis*, **8**(4):493-499.
78. BOER AS DE, B BLOMMERDE, PEW DE HAAS, MMGG SEBEK, KSB LAMBREGTS-VAN WEEZENBEEK, M DESSENS and D VAN SOOLINGEN (2002). False-Positive *Mycobacterium tuberculosis* cultures in 44 laboratories in the Netherlands (1993 to 2000): incidence, risk factors, and consequences. *J Clin. Microbiol*, **40**(11):4004-4009.

79. HONORÉ BOUAKLINE S, JP VINCENSINI, V GIACUZZO, PH LAGRANGE and JL HERRMANN (2003). Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction. *J Clin Microbiol*, **41**(6):2323-2329.
80. GAMBOA F, J DOMINGUEZ, E PADILLA, JM MANTEROLA, E GAZAPO, J LONCA, L MATAS, A HERNANDEZ, PJ CARDONA and V AUSINA (1998). Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by ligase chain reaction amplification. *J Clin Microbiol*, **36**(5):1324-1329.
81. ESCOBAR GUTIÉRREZ A y S GONZÁLEZ M (2002). Manual de diagnóstico de tuberculosis. México, Secretaria de salud. InDRE, pp 7-14.
82. HEMAL AK, NP GUPTA, TP RAJEEV, RAJEEV KUMAR, L DAR and P SETH (2000). Polymerase chain reaction in clinically suspected genitourinary tuberculosis: comparison with intravenous urography, bladder biopsy, and urine acid fast bacilli culture. *Urology*, **56**:570-574.
83. ESCOBAR-GUTIERREZ A, ME AMEZCUA-CHAVARRIA, S PASTENSANCHEZ, E RAMIREZ-CASANOVA, JV CAZARES, G GRANADOS, E LOO-MENDEZ and R CICERO SABIDO (1995). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) with Mycobacterial crude antigens for the sero-epidemiological diagnosis of active tuberculosis. *Int J Lepr*, **64**(4):417-427.
84. UMA DEVI KR, B RAMALINGAM, PJ BRENNAN, PR NARAYANAN, A RAJA (2001). Specific and early detection of IgG, IgA and IgM antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* 38kDa antigen in pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*, **81**(3):249-253.
85. CHIERAKUL N, P DAMRONGCHOKPIPAT, A CHAIPRASERT, W ARJRATANAKUL (2001). Antibody detection for the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Int J Tuberc Lung Dis*, **5**(10):968-972.
86. GONZÁLEZ MS, F CÁZARES, Y GONZÁLEZ, R ESCOBAR y G TORRES. (2003) Manual de prácticas de laboratorio. México, Ssa. InDRE, Dpto. de investigaciones inmunológicas, pp 19-23, 27-35.
87. HONG LIM RL, L KIANG TAN, W FUN LAU, M CHING MING CHUNG, R DUNN, H PHON TOO, and LILY CHAN (2000) Cloning and expression of immunoreactive antigens from *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol*, **7**(4):600-606.
88. OROS SALINAS A (1999) Evaluación de la respuesta inmune humoral hacia antígenos de bajo peso molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes con tuberculosis activa utilizando la técnica de Western blot. México. Tesis [Licenciatura Q. F. B], UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán., pp 34-36,42-45.

89. BAEZA I, L AGUILAR, M IBÁÑEZ, C WONG. (1998) Papel estructural y funcional de los lípidos en las membranas biológicas. En: Mensaje Bioquímico. Vol. XXII. México, IPN, pp 51-78.
90. MARROQUÍN EG, CR WONG, A ESCOBAR GUTIÉRREZ, IR BAEZA (1985). El método ELISA para determinar proteína unida a liposomas. *Rev Lat-amer Microbiol*, **27**:163-168.
91. YUNES R (2002). Liposomas y farmacología. [En línea] <<http://www.elergonomista.com/galenica/liposomas.htm>>[consulta marzo 2005]
92. LEYVA SALGADO ER (2005). Diseño y síntesis de un análogo de la cloroquina inhibidor de la formación de partículas lipídicas para el tratamiento de Lupus experimental. México. Tesis [Doctoral con especialidad en Inmunología], IPN, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas., pp 4-12.
93. CRUZ HERNÁNDEZ M (2002) Comparación de dos técnicas inmunoenzimáticas utilizando la fracción 4MT de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra para diagnóstico serológico de tuberculosis pulmonar. México. Tesis [Licenciatura Q. F. B]. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza., pp 32, 51-53, 77-80.
94. LUNA HERRERA J (1991). Lípidos de *Mycobacterium leprae*, aspectos químicos y biológicos. Tesis [Doctoral con especialidad en inmunología]. México, IPN, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
95. CÁZARES SOSA FR (2004) Caracterización de la fracción 4MT de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra e inducción de la respuesta inmune en ratones Balb/c. México. Tesis [Maestría en Biomedicina molecular], IPN, Escuela Superior de Medicina y Homeopatía., pp 54-57.
96. MCNAUGHTON CM and GH STOLLERMAN (1993). Disseminated tuberculosis: A presumptive diagnosis. *Hospital Practice*, **15**:73-78.
97. CHAKRAVORTY S, M KAMAL SEN and J SIVASWAMI TYAGI (2005). Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by smear, culture, and PCR using universal sample processing technology. *J Clin Microbiol*, **43**(9):4357-4362.
98. ILGAZLI A, H BOYACI, I BASYIGIT and F YILDIZ (2004). Extrapulmonary tuberculosis: clinical and epidemiologic spectrum of 636 cases. *Arch Med Res* **35**:435-441.
99. GUZMÁN DÍAZ E (2005) Comportamiento de la tuberculosis Extrapulmonar en el Hospital General de México de enero de 2001 a junio de 2005. México. Tesis [Postgrado con especialidad en Neumología], UNAM, Facultad de Medicina. Hospital General de México. Ssa., pp 19-21, 26-31.

REFERENCIAS EN ORDEN ALFABÉTICO

- ABBAS AK, AH LICHTMAN (2004). *Inmunología celular y molecular*, 5.ed., Madrid, Elsevier, pp 311-323.
- AFFRONTI LF (1996). Mycobacterial antigens: Reagents for tuberculin skin testing and serodiagnosis of tuberculosis. In: *Infectious agents and pathogenesis, Mycobacterium tuberculosis interactions with the immune system*. Bendinelli M, H Friedman, editores. Nueva York, Plenum Press, pp 1-37.
- ALIFANO M, R DE PASCALLIS, M SOFIA, S FARAONE, M DEL PEZZO, I COVELLI (1998). Detection of IgG and IgA against the mycobacterial antigen A60 in patients with extrapulmonary tuberculosis. *Thorax*, **53**:377-380.
- ANÓNIMO (1997). Does *Mycobacterium paratuberculosis* cause Crohn's Disease? [En línea] Disponible en: <<http://alan.kennedy.name/crohns/welcome.htm>>[consulta enero 2007]
- BAEZA I, L AGUILAR, M IBÁÑEZ, C WONG. (1998) Papel estructural y funcional de los lípidos en las membranas biológicas. En: *Mensaje Bioquímico*. Vol. XXII. México, IPN, pp 51-78.
- BALANDRANO CAMPOS S, G ANZALDO FLORES, GP PEÑA FLORES y X BETANCOURT-MORILLO (1996). Manual de procedimientos de laboratorio InDRE/SAGAR: Tuberculosis. México, Secretaría de Salud, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Organización Panamericana de la Salud, pp 15-24, 50-77.
- BECK ST, OM LEITE, RS ARRUDA and AW FERREIRA (2005). Combined use of western blot/ELISA to improve the serological diagnosis of human tuberculosis. *BJID*, **9**(1):35-43.
- BENJAMINI E, R COICO and G SUNSHINE (2000). *Immunology: A short course*, 4. ed., USA, Wiley-Liss, pp 198-200.
- BOER AS DE, B BLOMMERDE, PEW DE HAAS, MMGG SEBEK, KSB LAMBREGTS-VAN WEEZENBEEK, M DESSENS and D VAN SOOLINGEN (2002). False-Positive *Mycobacterium tuberculosis* cultures in 44 laboratories in the Netherlands (1993 to 2000): incidence, risk factors, and consequences. *J Clin. Microbiol*, **40**(11):4004-4009.
- BOTHAMLEY GH (1995). Serological diagnosis of tuberculosis. *Eur Respir J*, **8** Suppl 20:676-688.
- CARPENTIER E, B DROUILLARD, M DAILLOUX, D MOINARD, E VALLEE, B DUTILH, J MAUGEIN, E BERGOGNE-BEREZIN and B CARBONNELLE (1995). Diagnosis of tuberculosis by amplicor *Mycobacterium tuberculosis* test: a multicenter study. *J Clin Microbiol*, **33**(12):3106-3110.

- CASAL ROMÁN M (1992). *Mycobacterium tuberculosis*. En: Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Perea Pérez EJ, editor. 2v. Barcelona, Ediciones Doyma, pp 754-766.
- CÁZARES SOSA FR (2004) Caracterización de la fracción 4MT de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra e inducción de la respuesta inmune en ratones Balb/c. México. Tesis [Maestría en Biomedicina molecular], IPN, Escuela Superior de Medicina y Homeopatía., pp 54-57.
- CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGÍA (2001). Protocolos de las enfermedades de declaración obligatoria, [En línea] 2.ed., Madrid. Disponible en:
<<http://193.146.50.130/htdoes/ve/modificacion-protocolo-TBC.pdf>> [consulta febrero 2005].
- COLLINS HL, SH KAUFMANN (2001). The many faces of host responses to tuberculosis. *Immunology*, **103**:1-9.
- COWAN ST y KJ STEEL'S (1979). Manual para la identificación de bacterias de importancia médica, 2.ed., México, Editorial Continental, pp 112-115.
- CRUZ HERNÁNDEZ M (2002) Comparación de dos técnicas inmunoenzimáticas utilizando la fracción 4MT de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra para diagnóstico serológico de tuberculosis pulmonar. México. Tesis [Licenciatura Q. F. B], UNAM, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza., pp 32, 51-53, 77-80.
- CHAKRAVORTY S, M KAMAL SEN and J SIVASWAMI TYAGI (2005). Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by smear, culture, and PCR using universal sample processing technology. *J Clin Microbiol*, **43**(9):4357-4362.
- CHAN ED, L HEIFETS, MD ISEMAN (2000). Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review. *Tuberc Lung Dis*, **80**:131-140.
- CHATURVEDI V and HP GUPTA (2001). Evaluation of integral membrane antigens of *Mycobacterium habana* for serodiagnosis of extrapulmonary tuberculosis: association between levels of antibodies and *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *FEMS*, **33**:1-7.
- CHIERAKUL N, P DAMRONGCHOKPIPAT, A CHAIPRASERT, W ARJRATANAKUL (2001). Antibody detection for the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Int J Tuberc Lung Dis*, **5**(10):968-972.
- DANIEL TM and SM DEBANNE (1987). The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Am Rev Respir Dis*, **135**:1137-1151.

- DEANGELIS C and A FLANAGIN (2005). Tuberculosis – a global problem requiring a global solution. [Editorial]. *JAMA*, **293**(22):2793-2794.
- DIAGBOUGA S, F FUMOUX, A ZOUBGA, P THOMAS SANOU, and G MARCHAL (1997). Immunoblot analysis for serodiagnosis of tuberculosis using a 45/47-kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol*, **4**(3):334-338.
- DÍAZ SOBERANES M de la L, J NOVALES SANTA COLOMA, CR GONZÁLEZ BONILLA (2001). Aspectos generales de la respuesta inmune ante *Mycobacterium tuberculosis*. *Dermatología Rev Mex*, **45**(2):82-87.
- DEMKOW U, J ZIÓLKOWSKI, M FILEWSKA, B BIALAS-CHROMIEC, T ZIELONKA, D MICHALOWSKA-MITCZUK, J KUS, E AUGUSTYNOWICZ, Z ZWOLSKA, E SKOPINSKA-ROZEWSKA, E ROWINSKA-ZAKRZEWSKA (2004). Diagnostic value of different serological tests for tuberculosis in Poland. *J Physiol and Pharm*, **55** Suppl 3:57-66.
- DE WIKIPEDIA, la enciclopedia libre. *Mycobacterium tuberculosis*, [En línea] de <http://es.wikipedia.org/wiki/Mycobacterium_tuberculosis>[consulta febrero 2007].
- DINNES J, J DEEKS, H KUNST, A GIBSON, E CUMMINS, N WAUGH, F DROBNIIEWSKI and A LALVANI (2007). A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technology Assessment*, **11**(3):2-12.
- ESCOBAR-GUTIERREZ A, ME AMEZCUA-CHAVARRIA, S PASTENSANCHEZ, E RAMIREZ-CASANOVA, JV CAZARES, G GRANADOS, E LOO-MENDEZ and R CICERO SABIDO (1995). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) with Mycobacterial crude antigens for the sero-epidemiological diagnosis of active tuberculosis. *Int J Lepr*, **64**(4):417-427.
- ESCOBAR GUTIÉRREZ A y S GONZÁLEZ M (2002). Manual de diagnóstico de tuberculosis. México, Secretaria de salud. InDRE, pp 7-14.
- ESCOBEDO JAIMES, LE (2005) Diagnóstico de Tuberculosis miliar, México, Tesis [Maestría en Ciencias Médicas], UNAM, Facultad de Medicina. División de estudios de postgrado e investigación. Hospital General de México. Ssa., pp 3-5,11-13.
- FARGA CV (1992). Tuberculosis, 2.ed., Santiago de Chile, Mediterráneo, pp 17-26, 43-45, 67-93.
- FENTON MJ and MW VERMEULEN (1996). Immunopathology of tuberculosis: Roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun*, **64**:683-690.

- FLYNN JAL and J CHAN (2001). Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol*, **19**:93-129.
- FRANCO J, JJ CAMARENA, JM NOGUEIRA, R BLANQUER, MJ RUIZ, J MARÍN (2001). Serological response (Western blot) to fractions of *Mycobacterium tuberculosis* sonicate antigen in tuberculosis patients and contacts. *Int J Tuberc Lung Dis*, **5**(10):958-962.
- GAMBOA F, J DOMINGUEZ, E PADILLA, JM MANTEROLA, E GAZAPO, J LONCA, L MATAS, A HERNANDEZ, PJ CARDONA and V AUSINA (1998). Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by ligase chain reaction amplification. *J Clin Microbiol*, **36**(5):1324-1329.
- GARCÍA GARCÍA ML, A PONCE DE LEÓN, ME JIMÉNEZ CORONA, L FERREIRA REYES, M BOBADILLA DEL VALLE, B CANO ARELLANO, S CANIZALES QUINTERO, A MARTÍNEZ GAMBOA y J SIFUENTES OSORNIO (2006). Epidemiología molecular de la tuberculosis en México. Presentado en el Simposio Fronteras del conocimiento en tuberculosis y otras micobacteriosis. Memorias; 2006 Marzo 8-10; D. F, México, pp 47-48.
- GARCÍA RAMOS E y NR PARRA MALDONADO (1984). Manual para aislamiento e identificación de *M. tuberculosis* y otras micobacterias, 2.ed., México, ENCB-IPN, pp 1.320-1.339.
- GARCÍA SANCHO FIGUEROA MCE (2001). Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Una revisión de la literatura. *Rev Ins Nal Enf Resp Mex*, **14**(2):114-128.
- GOLDEN MP and HR VIKRAM (2005). Extrapulmonary tuberculosis: An overview. *Am Fam Phys*, **72**(9):1761-1768.
- GONZÁLEZ MS, F CÁZARES, Y GONZÁLEZ, R ESCOBAR y G TORRES. (2003) Manual de prácticas de laboratorio. México, Ssa. InDRE, Dpto. de investigaciones inmunológicas, pp 19-23, 27-35.
- GOROCICA P, M del C JIMÉNEZ MARTÍNEZ, Y GARFIAS, I SADA y R LASCURAIN (2005). Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*, **18**(2):142-153.
- GUZMÁN DÍAZ E (2005) Comportamiento de la tuberculosis Extrapulmonar en el Hospital General de México de enero de 2001 a junio de 2005. México. Tesis [Postgrado con especialidad en Neumología], UNAM, Facultad de Medicina. Hospital General de México. Ssa., pp 19-21, 26-31.
- HEMAL AK, NP GUPTA, TP RAJEEV, RAJEEV KUMAR, L DAR and P SETH (2000). Polymerase chain reaction in clinically suspected genitourinary tuberculosis: comparison with intravenous urography, bladder biopsy, and urine acid fast bacilli culture. *Urology*, **56**:570-574.

- HERNÁNDEZ PANDO R, H OROZCO E, A SAMPIERI, L PAVÓN, C VELASQUILLO, J LARRIVA-SAHAD, JM ALCOCER, MV MADRID (1996). Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*, **89**:26-33.
- HERNÁNDEZ PANDO R, M JEYANATHAN, G MENGISTU, D AGUILAR, H OROZCO, M HARBOE, GAW ROOK and G BJUNE (2000). Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. *Lancet*, **356**:2133-2137.
- HERNÁNDEZ PANDO R (2004), Inmunopatología de la tuberculosis pulmonar experimental, [En línea] Mensaje Bioquímico, Vol XXVIII. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, México. Disponible en: <<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>> [consulta abril 2007].
- HERNÁNDEZ SOLÍS A, R CICERO SABIDO, H OLIVERA, V RIVERO, E RAMÍREZ, A ESCOBAR GUTIÉRREZ (2003). Tuberculosis is still a major cause of cervical lymphadenopathies in adults from developing countries. *Epidemiol Infect*, **131**:1-6.
- HERNÁNDEZ SOLÍS A, H OLIVERA, V RIVERO, E RAMÍREZ, J TRUJILLO CHÁVEZ, A ESCOBAR GUTIÉRREZ, R CICERO SABIDO (2004). Identificación por análisis del pleomorfismo de fragmentos de restricción (RFLP) de *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes con tuberculosis extrapulmonar y SIDA [Resumen]. *Neumología y cirugía del Tórax*, **63**(1):22.
- HONG LIM RL, L KIANG TAN, W FUN LAU, M CHING MING CHUNG, R DUNN, H PHON TOO, and LILY CHAN (2000) Cloning and expression of immunoreactive antigens from *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immun*, **7**(4):600-606.
- HONORÉ BOUAKLINE S, JP VINCENSINI, V GIACUZZO, PH LAGRANGE and JL HERRMANN (2003). Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction. *J Clin Microbiol*, **41**(6):2323-2329.
- HUSSAIN SF, M IRFAN, M ABBASI, SS ANWER, S DAVIDSON, R HAQQUEE, JA KHAN, M ISLAM (2004). Clinical characteristics of 110 military tuberculosis patients from a low HIV prevalence country. *Int J Tuberc Lung Dis*, **8**(4):493-499.
- ILGAZLI A, H BOYACI, I BASYIGIT and F YILDIZ (2004). Extrapulmonary tuberculosis: clinical and epidemiologic spectrum of 636 cases. *Arch Med Res* **35**:435-441.

- INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS InDRE (2006). Manual del Taller Internacional de producción de anticuerpos monoclonales contra agentes infecciosos y otras moléculas. México, pp 21-25.
- JAWETZ E, J MELNICK y E ADELBERG (2002). Microbiología médica, 17. ed., México, El manual moderno, pp 345-356.
- JULIÁN E, L MATAS, A PÉREZ, J ALCAIDE, MA LANÉELLE and M LUQUIN (2002). Serodiagnosis of tuberculosis: comparison of immunoglobulin A (IgA) response to sulfolipid I with IgG and IgM responses to 2,3-Diacyltrehalose, 2,3,6-Triacyltrehalose, and cord factor antigens. *J Clin Microbiol*, **40**(10) 3782-3788.
- LANIADO LABORÍN R y N CABRALES VARGAS (2005). No siempre una baciloscopia positiva indica tuberculosis. Otra razón para solicitar cultivos rutinariamente. *Rev Inst Enf Resp Mex*, **18**(4):286-289.
- LEYVA SALGADO ER (2005). Diseño y síntesis de un análogo de la cloroquina inhibidor de la formación de partículas lipídicas para el tratamiento de Lupus experimental. México. Tesis [Doctoral con especialidad en Inmunología], IPN, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas., pp 4-12.
- LUNA HERRERA J (1991). Lípidos de *Mycobacterium leprae*, aspectos químicos y biológicos. Tesis [Doctoral con especialidad en inmunología]. México, IPN, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
- LYASHCHENKO K, R COLANGELI, M HOUDE, HA JAHDALI, D MENZIES, and ML GENNARO (1998). Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infec Immun*, **66**(8):3936-3940.
- LLACA DÍAZ JM, A FLORES ARÉCHIGA, MG MARTÍNEZ GUERRA, PC CANTÚ MARTÍNEZ. La baciloscopia y el cultivo en el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar. RESPYN [En línea] 2002;4(3). Disponible en: URL:<http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/iv/3/articulos/tbexp_co.htm> [consulta febrero 2005].
- MARROQUÍN EG, CR WONG, A ESCOBAR GUTIÉRREZ, IR BAEZA (1985). El método ELISA para determinar proteína unida a liposomas. *Rev Lat-amer Microbiol*, **27**:163-168.
- MCNAUGHTON CM and GH STOLLERMAN (1993). Disseminated tuberculosis: A presumptive diagnosis. *Hospital Practice*, **15**:73-78.
- MURRAY P, KS ROSENTHAL, GS KOBAYASHI, MA PFALLER. (2003). Microbiología médica, 4. ed., Madrid, Mosby-Doyma, pp 361-372.

- NIEMANN S, E RICHTER, and S RUSCH-GERDES (2000). Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. *J Clin Microbiol*, **38**(1):152-157.
- ONG A, J CREASMAN, PC HOPEWELL, LC GONZALEZ, M WONG, RM JASMER and CL DALEY (2004). A molecular epidemiological assessment of extrapulmonary tuberculosis in San Francisco. *Clin Inf Dis*, **38**:25-31.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (2006), ¿Qué es la tuberculosis?. [En línea] <<http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/tb-boletin.htm>>[consulta julio 2007].
- OROS SALINAS A (1999) Evaluación de la respuesta inmune humoral hacia antígenos de bajo peso molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes con tuberculosis activa utilizando la técnica de Western blot. México. Tesis [Licenciatura Q. F. B], UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán., pp 34-36,42-45.
- POTTUMARTHY S, VC WELLS and AJ MORRIS (2000). A comparison of seven tests for serological diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, **38**(6):2227-2231.
- PRABHA C, KV JALAPATHY, RP MATSA, SD DAS (2007). Differential T helper cell response in tuberculous pleuritis. *Ind J Med Microb*. 25(1):18-23.
- RASOFO RAZANAMPARANY V , D MÉNARD, G AURÉGAN, B GICQUEL, and S CHANTEAU (2002). Extrapulmonary and pulmonary tuberculosis in Antananarivo (Madagascar): High clustering rate in female patients. *J Clin Microbiol*, **40**:3964-3969.
- ROITT I, J BROSTOFF, D MALE (2000). Inmunología, 5.ed., Madrid, Harcourt, pp 341-350.
- ROJAS ESPINOSA O (2001), Inmunología (de memoria), 2. ed., México, Panamericana, pp 86,117-121, 202-207, 212-216.
- ROOK GAW and R HERNÁNDEZ PANDO (1996). The pathogenesis of tuberculosis. *Annu Rev Microbiol*, **50**:259-284.
- SADA E, PJ BRENNAN, T HERRERA, and M TORRES (1990). Evaluation of Lipoarabinomannan for the serological diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, **28**(12):2587-2590.
- SCHLOSSER D (2000). Tuberculosis e infecciones por micobacterias no tuberculosas, 4. ed., México, Mc Gram-Hill Interamericana, pp 54-75.

- SECRETARIA DE SALUD (2004), Tuberculosis, reto por resolver en las poblaciones más pobres del país, [En línea] Comunicado de prensa No. 322, 25 nov. 2004 <http://www.salud.gob.mx/ssa_app/noticias/datos/2004-11-25_1111.html>[consulta febrero 2005].
- SECRETARÍA DE SALUD. SUBSECRETARIA DE PREVENCIÓN Y PROMOCIÓN DE LA SALUD. CENTRO NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA Y CONTROL DE ENFERMEDADES (2004). Guía para la atención de pacientes con tuberculosis multifarmacorresistente. México, pg 7.
- SECRETARÍA DE SALUD (2005). Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2 1993, para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud. México, pp 7, 20-22.
- SECRETARÍA DE SALUD (2006). Guía práctica para la atención de la Tuberculosis en niños, niñas y adolescentes. México, Programa Nacional de Tuberculosis, pp 23-27, 43-66, 69-80.
- SHARMA SK and A MOHAN (2004). Extrapulmonary tuberculosis, *Indian J Med Res*, **120**:316-353.
- SPELLBERG B and JE EDWARDS Jr (2001). Type 1/Type 2 Immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis*, **32**:76-102.
- STOKES RW, R NORRIS JONES, DE BROOKS, TJ BEVERIDGE, D DOXSEE and LM THORSON (2004). The glycan-rich outer layer of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis* acts as an antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages. *Infect Immun*, **72**:5676-5686.
- TENORIO G, L ESCOBEDO JAIMES, R SÁNCHEZ SANTIAGO, G CUETO ROBLEDO (2002). Manifestaciones oculares de la tuberculosis miliar. Consideraciones sobre cinco casos. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*, **15**(3):166-171.
- THOMSEN H, J IVANYI, C ESPITIA, A ARYA and M LONDEI (1995). Human CD4-CD8- $\alpha\beta$ + T-cell receptor T cells recognize different mycobacteria strains in the context of CD1b. *Immunology*, **85**:33-40.
- THONGKRAJAI P, V LULITANON and C CHAMNANVANAKIT (1989). Improved ELISA with immunoabsorbent-purified mycobacterial antigen for serodiagnosis of tuberculosis. *J Med Microbiol*, **30**:101-104.
- TORALES TORALES AN y N GONZÁLEZ SALDAÑA (1997). Tuberculosis. En: *Infectología clínica pediátrica*, 3.ed. González Saldaña N, AN Torales Torales y D Gómez Barreto, editores. México, Trillas, pp 105-145.

- TORRES ROJAS M (1992) Reconocimiento de antígenos de *M. tuberculosis* por pacientes con diagnóstico de Tuberculosis y sus convivientes. México. Tesis [Maestría en Ciencias con especialidad en Inmunología], IPN, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas., pp 1-6.
- TURNER M, JP VAN VOOREN, J DE BRUYN, E SERRUYS, P DIERCKX and JC YERNAULT (1988) Humoral immune response in human tuberculosis: Immunoglobulins G, A, and M directed against the purified P32 protein antigen of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin. *J Clin Microbiol*, **26**(9):1714-1719.
- UMA DEVI KR, B RAMALINGAM, PJ BRENNAN, PR NARAYANAN, A RAJA (2001). Specific and early detection of IgG, IgA and IgM antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* 38kDa antigen in pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*, **81**(3):249-253.
- VON REYN CF and JM VUOLA (2002). New vaccines for the prevention of tuberculosis. *Clin Infect Dis*, **35**:465-474.
- WARREN L and E JAWETZ (2000). Medical Microbiology & Immunology: Examination & Board Review, 6.ed., U.S.A, Mc Graw-Hill. LANGE Medical book, pp 134-137.
- WEINER HL (2001). The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and T_R1 and T_H3 regulatory cells. *Nature Immunol*, **2**:671-672.
- WILKINS EGL and J IVANYI (1990). Potential value of serology for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Lancet*, **336**:641-644.
- WILSHER ML, C HAGAN, R PRESTIDGE, AU WELLS, G MURISON (1999). Human *in vitro* immune responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc Lung Dis*, **79**:371-377.
- YOUNG GP (1984). Infectología Clínica, 2. ed., México, Interamericana, pp. 418-439.
- YOUNG RA. Stress proteins and immunology (1990). *Annu Rev Immunol*, **8**:401-420.
- YUNES R (2002). Liposomas y farmacología. [En línea] <<http://www.elergonomista.com/galenica/liposomas.htm>>[consulta marzo 2005].
- ZOU YL, JD ZHANG, MH CHEN, GQ SHI, J PRIGNOT and C COCITO (1994) Serological analysis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis with Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for anti-A60 immunoglobulins. *Clin Inf Dis*, **19**:1084-1091.