

A. Zejman



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**IDENTIFICACION DE LIPOARABINOMANNAN EN MUESTRAS
DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS POR EL
ENSAYO DE COAGLUTINACION.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
DIANA ELODIA AGUILAR LEON**



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

JURADO ASIGNADO

- PRESIDENTE** **PROF: ELDA PENICHE QUINTANA**
- VOCAL** **PROF: EDUARDO SADA DIAZ**
- SECRETARIO** **PROF: MARIA DEL CARMEN CORTES DECUIR**
- 1er SUPLENTE** **PROF: MARIA ELSA ESCUDERO GARCIA**
- 2do SUPLENTE** **PROF: JORGE FERNANDO PANIAGUA SOLIS**

**Esta tesis fue realizada en el Departamento de Microbiología
del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias**

ASESOR

DR. EDUARDO SADA DIAZ

SUPERVISOR TECNICO

Q.F.B. MA. TERESA HERRERA BARRIOS

SUSTENTANTE

DIANA E. AGUILAR LEON

" El estudio concienzudo de la historia apoya la creencia de que la Tuberculosis pudo ser el primogénito de la madre que engendró la peste y la enfermedad "

Moorman

AGRADECIMIENTOS

QFB Enrique Meléndez Herrada
Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador
Zubiran"

QFB Ma. Teresa Herrera Barrios
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

QFB Ma. Cristina Negrete García
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Dr. Erasmo Martínez Cordero
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Dedicatorias:

A mi Madre : Gracias, por que jamás podré recompensar esta vida de lucha y sacrificios. Además, por el apoyo cariño y confianza de siempre.

A mi Padre : Por darme tu apoyo sin esperar nada a cambio.

A mis Hermanos : Que la presente sea un estímulo en su desarrollo profesional.

A mi Abuelita : De quien he recibido constatemente palabras de aliento para continuar.

CONTENIDO

INDICES	1
INTRODUCCION	3
OBJETIVOS E HIPOTESIS	5
DATOS HISTORICOS	6
EPIDEMIOLOGIA	8
TUBERCULOSIS PULMONAR Y EXTRAPULMONAR	11
CRITERIOS DE DIAGNOSTICO	13
CARACTERISTICAS DE <u>M. tuberculosis</u> Y SUS ANTIGENOS	18
AGLUTINACION	28
MATERIAL Y METODOS	33
RESULTADOS Y ANALISIS	47
DISCUSION	70
CONCLUSIONES	80
ANEXOS	81
BIBLIOGRAFIA	93

INDICES**Indice de abreviaturas****Términos bacteriológicos**

<u>M. tuberculosis</u>	<u>Mycobacterium tuberculosis</u>
<u>M. hominis</u>	<u>Mycobacterium hominis</u>
<u>M. bovis</u>	<u>Mycobacterium bovis</u>
<u>M. africanum</u>	<u>Mycobacterium africanum</u>
<u>S. aureus</u>	<u>Staphylococcus aureus</u>
<u>M. avium</u>	<u>Mycobacterium avium</u>
<u>M. leprae</u>	<u>Mycobacterium leprae</u>

Términos médicos

BAAR	bacilo ácido alcohol resistente
HIV	virus de la inmunodeficiencia humana
TB	tuberculosis
TBP	tuberculosis pulmonar
BCG	bacilo de Calmette Guèrin
SIDA	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
PPD	derivado proteico purificado
LBA	lavado bronquioalveolar

Métodos de laboratorio

ELISA	ensayo inmunoenzimático
CIE	contraínmunolectroforesis
RIA	radioinmunoanálisis
DIL	diluyente

Denominaciones biológicas

NZW	nueva zelanda blanco
H37Rv	cepa virulenta de <u>M. tuberculosis</u>
BSA	albúmina sérica bovina
LAM	lipoarabinomanano
Fc	fracción constante o cristalina
Fab	fracción variable o de unión al antígeno
SAC-I	cepa Cowan-I de <u>Staphylococcus aureus</u>

Medios de cultivo y reactivos

BHI	infusión cerebro corazón
PBS	solución amortiguadora de fosfatos
IgG	inmunoglobulina G
CrCl	cloruro de cromo
I ¹³¹	Iodo marcado
S ³²	Azufre radiactivo
DNP	dinitrofenil

Términos estadísticos

D.E.	desviación estándar
X ²	prueba de Chi cuadrada
r	coeficiente de correlación
VP	verdadero positivo
VN	verdadero negativo
FN	falso negativo
FP	falso positivo

Unidades de medida

M	molaridad
g	gramo
μg	microgramo
ng	nanogramo
mg	miligramo
μl	microlitro
ml	mililitro
nm	nanómetro
h	horas
°C	grados centígrados
d	daltons
pH	potencial hidrógeno
TA	temperatura ambiente
D.O.	densidad óptica
I.D.O.	índice de densidad óptica

INTRODUCCION

La tuberculosis (TB) es un problema de salud pública mundial, pero de especial interés en países en vías de desarrollo.

El diagnóstico de esta enfermedad, puede ser difícil, tanto por los problemas técnicos del cultivo y aislamiento del agente etiológico, como por la heterogeneidad de los órganos y tejidos afectados en diferentes pacientes en estudio.

La localización de la infección por M. tuberculosis en sitios como el sistema nervioso central y la cavidad pleural o articular, pueden hacer difícil la obtención de las muestras biológicas y su estudio posterior. Por otra parte, no siempre se tiene acceso a pruebas de laboratorio de alta sensibilidad y especificidad.

La detección de anticuerpos contra varios componentes de M. tuberculosis, así como la identificación de los antígenos de este agente etiológico, se han estudiado mediante diversos métodos de laboratorio de reciente implementación como el radioinmunoanálisis o la prueba inmunoenzimática (ELISA), con el fin de mejorar la especificidad y sensibilidad. Sin embargo, aún siguen siendo útiles, otros métodos de identificación para el diagnóstico de la enfermedad, como la aglutinación, inmunodifusión y contrainmunoelectroforesis.

La aglutinación se puede realizar con diversos soportes como sepharosa, látex, eritrocitos de carnero o bentonita, los cuales permiten la identificación de anticuerpos y diversos antígenos de M. tuberculosis de una manera rápida. Estas técnicas han favorecido el diagnóstico

preciso de la enfermedad y con ello se ha logrado confirmar la presencia de TB, estudiando tanto el suero como diversos líquidos corporales de enfermos con esta infección.

Una de las variantes de la técnica de aglutinación es la que se realiza con la cepa Cowan-I de S. aureus (SAC-1), la cual se ha denominado coaglutinación. Esta técnica ha resultado relativamente fácil de realizar, ya que el material e infraestructura requeridos están al alcance de prácticamente cualquier laboratorio y ha sido de gran utilidad para el diagnóstico de diversas enfermedades infecciosas, ofreciendo como ventajas una correcta identificación y caracterización de los antígenos específicos. Por otro lado, su proceso lleva un tiempo mínimo, teniendo con esto acceso a una prueba rápida, de alta sensibilidad y especificidad, con la cual se puede confirmar el diagnóstico con la ayuda de la identificación antigénica del agente etiológico, en conjunto con el cuadro clínico, funcional, radiológico y patológico.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo, fue implementar una técnica de coagulación, para la detección de lipoarabinomano (LAM) en muestras de suero de pacientes con TB, y establecer su utilidad en el diagnóstico de esta patología. Para ello, se aprovecho la ventaja de la alta afinidad de la proteína A por la fracción Fc de la IgG y el uso de anticuerpos específicos contra LAM, en combinación con un procedimiento de precipitación, para evitar la interferencia y reacciones inespecíficas, que pueden ocurrir en otras pruebas.

HIPOTESIS DE TRABAJO

La hipótesis de este trabajo fue que el SAC-I constituye un soporte que puede ser ampliamente utilizado mediante la sensibilización con anticuerpos policlonales monoespecíficos que permitan determinar antígenos micobacterianos, usando un sistema simple de aglutinación en combinación con un procedimiento de precipitación de la muestra biológica para obtener un método de alta sensibilidad y especificidad.

DATOS HISTORICOS

La noción de la TB como una entidad clínica infecto-contagiosa, ampliamente difundida y grave se remonta a varios siglos.

Los primeros datos que permitieron reconocer a la TB, como un problema de salud pública y eventualmente como una enfermedad infecciosa surgen probablemente en el siglo XIX, cuando se fortaleció la idea de que diversas enfermedades que tenían brotes epidémicos, estaban relacionadas con agentes transmisibles.

La demostración de una causa bacteriana en algunas de estas enfermedades como el cólera, la fiebre amarilla y la fiebre tifoidea, apoyaron este hecho. Interesantemente, en esta época la TB contrastó con estas enfermedades agudas y epidémicas, ya que su carácter transmisible no resultó evidente en un principio.

Las características que ubicaron a la TB como una enfermedad infecto-contagiosa se establecieron por primera vez en 1868, cuando Villemin logró generar una enfermedad semejante a la TB humana, mediante la inyección experimental del material de lesiones tuberculosas del hombre a conejos.

En el siglo XIX la frecuencia de la TB aumentó a causa de las implicaciones socio-económicas de la revolución industrial y paralelamente se identificó la gran diversidad de manifestaciones clínicas, tales como las lesiones cavitarias en los pulmones y los pequeños nódulos granulomatosos localizados en diferentes órganos, que Laennec reconoció como partes de un mismo proceso.

La causa de estas lesiones granulomatosas no se aclaró hasta que Koch en 1882, descubrió el bacilo

tuberculoso humano. Paralelamente, su trabajo sobre este microorganismo constituyó una impresionante evidencia de los criterios que él mismo había señalado como bases firmes para considerar a un microorganismo como agente etiológico de una enfermedad infecciosa, conocidos desde entonces como "Postulados de Koch".

Desde su descripción inicial, la TB es una de las enfermedades infecciosas que ha sido objeto de numerosos estudios, no sólo por ser una causa importante de morbilidad prolongada y muerte, sino por su alta frecuencia, que afecta generalmente a un gran porcentaje de la población en la etapa de mayor vitalidad y productividad (1,62,65).

El uso de los métodos de diagnóstico de tipo inmunológico para esta enfermedad comienza en 1898, cuando Arloing desarrolla una prueba de aglutinación usando muestras de sueros de pacientes con TB pulmonar. Estos estudios mostraron que el 57% de los especímenes resultaron positivos mientras que sólo el 11% de los sueros controles provenientes de pacientes con otras afecciones pulmonares tuvieron este resultado. A pesar de que no se proporcionan detalles técnicos suficientes en el desarrollo de este procedimiento, la importancia de esta técnica fué que su realización precedió a la identificación del bacilo de Koch como la causa de la TB.

EPIDEMIOLOGIA

La TB es una enfermedad infecto-contagiosa de distribución mundial (17,46,66). Su prevalencia actual supera los 30 millones de casos activos y se ha calculado una incidencia de 10 millones de casos nuevos en el mundo. Además, produce al menos 3 millones de decesos anuales. Las zonas endémicas por excelencia se encuentran en Asia, Africa, Oceanía y América Latina (17,68).

En los países en vías de desarrollo y aún en los desarrollados, sigue constituyendo un problema de salud por su alta frecuencia y mortalidad. De hecho, esta enfermedad es 3 veces más común en los países en vías de desarrollo (38,48,63,64), mientras que en Europa se ha considerado que la TB afecta el 30% de la población adulta (17).

La TB en México ha sido uno de los principales problemas de salud durante varias décadas. Las tasas de morbilidad y mortalidad eran extremadamente altas antes de la década de los cuarenta, pero éstas han disminuido gradualmente en los últimos 50 años, a partir de la introducción de la vacuna con el bacilo de Calmette-Guèrin (BCG), así como de la mejoría del nivel de vida de la población y el acceso a un tratamiento específico (23,45).

En cuanto a los estudios de laboratorio, algunas evidencias destacan la importancia de la detección de TB. Por ejemplo, el 92.5% de los casos de TB se identificaron por algún método de laboratorio, destacando las baciloscopías con un 91.5%. Por otro lado, sólo el 7.3% de los casos carecía de confirmación por laboratorio.

Algunas cifras que destacan la importancia de la TB en México, son que hasta el año de 1980, esta infección

constituyó la décima primera causa de decesos teniendo una tasa de mortalidad del 1.5% del total de las defunciones. Por otra parte, en el período comprendido entre 1980 a 1988, la tasa de casos conocidos de TB fluctuó entre 16 a 19 por cada 100,000 habitantes, en tanto que el número de casos nuevos por cada defunción varió de 2 a 3 según la fuente de notificación, a pesar de que la relación debió ser de 6 a 8 casos nuevos por cada defunción de acuerdo con la situación epidemiológica en México (38). Finalmente, la incidencia para 1992 en nuestro país se ha calculado en 12.7 casos por cada 100,000 habitantes (72).

La relevancia de la TB pulmonar es evidente al encontrar que esta localización representa el 88.9% del total de los casos con esta enfermedad (19,35,72). El uso inadecuado de la quimioterapia ha incrementado la frecuencia de infección por TB en la población abierta en un 14% y otros estudios han señalado, que la prevalencia de la infección dentro de los vacunados se ha elevado en personas entre los 30 y 40 años de edad (37,44,70).

Este padecimiento afecta por igual al sexo masculino y femenino y ocurre prácticamente en cualquier edad. Sin embargo, la población infantil y los ancianos son algunos de los grupos más afectados, especialmente en los países en desarrollo donde se ha reportado que los niños están expuestos al contagio desde el nacimiento y durante la infancia. (72). En los niños, la infección se presenta especialmente entre el primer mes de vida y los 3 años de edad. De los 13 a los 27 años es más frecuente en las mujeres y de los 57 años en adelante, es más común en los hombres (60,72) .

La incidencia de la enfermedad es más elevada en los grupos sociales menos favorecidos, que viven en condiciones socioeconómicas muy bajas y con escasa atención médica (25). Adicionalmente, existen diversos factores que elevan el riesgo para el desarrollo de la infección, como los antecedentes de desnutrición, inmunodeficiencias congénitas o el déficit de la respuesta inmune inducida por la administración de corticoesteroides y medicamentos citotóxicos. La presencia de diabetes mellitus, cáncer y otras enfermedades que pueden abatir la inmunidad celular, también constituyen factores predisponentes de gran relevancia y en ocasiones pueden dificultar el diagnóstico de TB y elevar el costo de los programas de control (26,33).

La aparición reciente del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), constituye uno de los factores más importantes de riesgo (6,7,47,56,67). Las evidencias actuales indican que el incremento del SIDA produce una reactivación de la TB primaria, así como una elevación en la frecuencia de reinfecciones fímicas. De hecho, la probabilidad de que los pacientes con SIDA contraigan TB es relativamente alta, en comparación con aquéllos enfermos que tienen TB y que son susceptibles de contraer el SIDA (3,71).

TUBERCULOSIS PULMONAR Y EXTRAPULMONAR

La TB puede afectar prácticamente cualquier órgano o tejido, pero el compromiso pulmonar es el más común, constituyendo el 88.9% de todas las formas de la enfermedad.

El 11.1% de los casos se ha sido clasificado como TB extrapulmonar. En este último grupo se encuentran la enfermedad que afecta al aparato genitourinario y la meningitis tuberculosa, constituyendo el 40.6 y 40.2%, respectivamente, del total de los casos con compromiso extrapulmonar. La TB intestinal y la que afecta a los ganglios mesentéricos ocurren en el 13.6%. La TB ósea y articular, se presentan comunmente en niños y constituyen el 3.5% de los casos de presentación extrapulmonar (65,72).

M. tuberculosis es la causa principal de la TB en el hombre, pero en ocasiones también pueden producirla las micobacterias atípicas como M. hominis y M. africanum, denominándose en estos casos TB atípica.

La probabilidad de adquirir la infección a nivel del tracto respiratorio está determinada especialmente por la cantidad de bacilos captados del medio ambiente, lo cual depende de diversos factores de riesgo, como las características del paciente y la influencia del ámbito que le rodea. Así se ha demostrado, que la promiscuidad, el detrimento en las condiciones de salud y los procesos que deprimen la capacidad inmune, son particularmente relevantes y promueven el desarrollo de esta infección.

Desde el punto de vista clínico, los síntomas dependerán del sitio afectado. En la TB pulmonar, se presenta frecuentemente tos con expectoración hemoptoica, disnea, fiebre, pérdida de peso y ataque al estado general,

así como imágenes radiográficas que van desde un infiltrado intersticial hasta cavitaciones.

En ocasiones se presentan algunos tipos especiales de la enfermedad, como la que afecta directamente la pleura y el pericardio. En estas entidades se ha reportado que la infección puede tener su origen en un foco primario en cualquier localización, pero frecuentemente surgen a partir de una infección inicial en el parénquima pulmonar. La infección por diseminación contigua o por vía linfohematógena a superficies serosas, da lugar a la TB pleural, que se manifiesta usualmente con derrame.

La TB miliar es otra forma de presentación de esta enfermedad, en la que existe un compromiso parenquimatoso y el cuadro clínico puede ser menos profuso, al grado que en ocasiones sólo se le detecta por las imágenes radiológicas que se caracterizan por un infiltrado intersticial difuso.

Recientemente se ha encontrado que la infección por micobacterias atípicas tiene alta prevalencia en pacientes con SIDA, cuyo estado de supresión inmune favorece una persistencia intracelular de M. tuberculosis en los macrófagos, haciendo uso de sus mecanismos de evasión, como los inhibidores de la fusión del fagosoma-lisosoma, o la resistencia a enzimas lisosomales y metabolitos oxigenados (8,17,39).

CRITERIOS DE DIAGNOSTICO

Para realizar el diagnóstico de TB se han empleado muy diversos parámetros, tanto clínicos y bacteriológicos, como radiológicos e inmunológicos.

La identificación de los criterios de diagnóstico de la TB y su utilidad han evolucionado a través de los años, en forma paralela al avance de los métodos de detección de esta infección.

En un inicio se empleaba el examen físico, inspeccionando cuidadosamente los signos de la enfermedad, tal como lo practicaban los médicos a principios del siglo XVII. Posteriormente surgieron la percusión preconizada por Avenbrugger en 1761 y la auscultación con estetoscopio iniciada por Laennec en 1815. Más tarde se emplearon la termometría clínica introducida por Wunderlunch en 1869; los rayos X de Roetgen en 1895, y el empleo del broncoscopio de Killan en 1898.

Además de las características clínicas, radiológicas, y funcionales, el diagnóstico de este padecimiento se puede realizar por estudios de laboratorio de muy diversas maneras, dependiendo de los métodos accesibles en cada centro hospitalario.

La inspección microscópica del material sospechoso como el esputo y la inoculación de muestras biológicas en animales fue iniciada por Koch en 1882 y la prueba de la tuberculina fue introducida por el mismo autor en 1910. Posteriormente surgieron distintas técnicas de laboratorio, todas ellas basadas en la identificación del agente infeccioso o en el reconocimiento de sus antígenos.

Actualmente, gran parte de este armamento

diagnóstico se sigue empleando para la identificación o búsqueda constante y sistemática de la invasión por el bacilo tuberculoso.

Estos estudios se realizan de preferencia en pacientes con manifestaciones sugerentes de la enfermedad, y particularmente en quienes presentan tos crónica con expectoración y que pertenecen a las poblaciones de alto riesgo.

Desde el punto de vista bacteriológico el método de laboratorio más importante es el cultivo de expectoración en medio de Lowenstein-Jensen, que es específico para el aislamiento de M. tuberculosis. Esta prueba puede realizarse en esputo o en otras muestras biológicas como el líquido pleural o sinovial y aún en orina. La sensibilidad de este método para el diagnóstico de TB pulmonar se acerca al 100%, siempre y cuando existan suficientes microorganismos en la muestra biológica que permitan su desarrollo in vitro, pero tiene la desventaja de que se requieren largos períodos para el desarrollo microbiano.

Otro de los métodos bacteriológicos para el diagnóstico lo constituye la búsqueda de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), también llamada baciloscopia, la cual es una de las técnicas actuales más usadas para el diagnóstico de TB pulmonar. Recientemente se ha demostrado que la sensibilidad de la baciloscopia en expectoración es de un 75%, mientras que presenta un 25% de pruebas falsas negativas. En contraste, en algunas formas de TB como la meníngea y pleural, la sensibilidad de esta prueba es menor del 50% (31,61).

Algunas pruebas como la intradermorreacción con PPD,

han sido muy útiles tanto en estudios epidemiológicos como en el diagnóstico individual de pacientes con TB, especialmente en la fase de actividad clínica (2,15,39). La especificidad de esta prueba es alta en países que muestran una baja prevalencia de la enfermedad, pero su utilidad desciende en áreas con altas tasas de infección. Por ello, esta prueba no es del todo útil, al menos en algunos países, ya que se ha estimado que alrededor de un 39% de los casos con TB en el mundo corresponden a una enfermedad activa (2,39,59).

Recientemente, ha surgido una enorme diversidad de técnicas inmunológicas que permiten identificar tanto la presencia de los anticuerpos, como la existencia de antígenos de M. tuberculosis. Algunos de estos métodos de alta sensibilidad y especificidad se han incorporado como criterios de diagnóstico de TB. Dentro de los métodos inmunológicos denominados tradicionales se encuentran la inmunodifusión, contrainmunolectroforesis (CIE), inmunofluorescencia, inhibición competitiva, y aglutinación, que son empleados para detectar directamente a los antígenos de M. tuberculosis. Desafortunadamente, no todos ellos han tenido una difusión amplia, debido a que tienen diferente sensibilidad y algunos requieren de una interpretación subjetiva.

En la última década, los estudios más importantes que han permitido detectar la presencia de reacciones antígeno-anticuerpo, incluyendo desde luego, las relacionadas con M. tuberculosis, incluyen las pruebas inmunoenzimáticas (ELISA), la nefelometría, el radioinmunoanálisis (RIA) y respuesta celular

(11,13,22,30,41). Esto ha permitido detectar con mayor certeza la incidencia y prevalencia de la TB en poblaciones de alto riesgo, por lo que se han incorporado cada vez con mayor firmeza como criterios para el diagnóstico de esta patología.

En el cuadro 1 se describen algunas de las diferencias que se han encontrado en las técnicas más comunes para la detección de antígenos de micobacteria en diferentes muestras biológicas. Todas ellas se han utilizado por las ventajas que ofrecen, como son el alto grado de sensibilidad y especificidad. Sin embargo, algunos de los inconvenientes de ciertas técnicas como el radioinmunoensayo, que incluyen su costo elevado y la necesidad de una infraestructura de laboratorio amplia y sofisticada para su adecuada realización, hacen difícil su empleo rutinario (11,12,22,30).

Finalmente, dentro de los métodos de laboratorio no tradicionales, que cada vez cobran mayor relevancia en el diagnóstico y que se han aplicado en la identificación de TB se encuentran las técnicas instrumentales; como la radiometría, cromatografía de gases y espectrofotometría.

CUADRO 1. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD ENTRE DIVERSOS
 METODOS DE LABORATORIO EN LA DETERMINACION DE ANTIGENOS DE
Mycobacterium tuberculosis USANDO DIFERENTES MUESTRAS
 BIOLÓGICAS

METODO	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	TIPO DE MUESTRA
	%		
RIA	77	ND	Suero
ELISA	45	ND	Suero
ELISA	60	80	Expectoración
Aglutinación*	96	99	LCR**
ELISA	70	98	LCR**

* Látex

**Líquido cefalorraquídeo

CARACTERISTICAS DE Mycobacterium tuberculosis Y SUS ANTIGENOS

Características generales

En los tejidos, M. tuberculosis se presenta en forma de un bacilo delgado ligeramente curvo con una longitud de 2 a 4 μ y de 0.2 a 0.5 μ de ancho. El aspecto de estos bacilos puede ser uniforme, aunque en ocasiones lo tienen arrosariado, con vacuolas no teñidas y distribuidas irregularmente o con prominencias ligeramente teñidas (5,29,62,69). Al observar estas bacterias en cultivo pueden presentarse formas cocoides o filamentosas, y las cepas difieren en cuanto a su tendencia a crecer como células aisladas o como largos agregados trenzados, llamados "cordones de serpentinias".

La pared del bacilo tuberculoso generalmente es gruesa y frecuentemente muestra grandes mesosomas laminares que están constituidos por lípidos, proteínas y polisacáridos (5,17,62,70). También pueden observarse gránulos de glucógeno y cuerpos de polimetafosfato (volutina), los cuales se tiñen metacromáticamente con los colorantes catiónicos.

Por otro lado, es evidente que la pared de todas las micobacterias incluyendo a M. tuberculosis, poseen el mismo tipo de capa basal glucopeptídica, lo que las distingue claramente de otros tipos de agentes infecciosos. Además, esto les da la propiedad de formar esferoplastos cuando se tratan con lisozima en medios de alta molaridad (5,39,53,62).

Algunas características interesantes in vitro son, que M. tuberculosis es un agente aerobio estricto que tiene

la capacidad de desarrollarse en medios de cultivo simples en los que usan glicerol como fuente de carbono y sales amónicas como fuente de nitrógeno. Usualmente se requiere de un medio al que se le adiciona asparagina o una mezcla de aminoácidos para estimular el crecimiento e incrementar su velocidad de replicación

En medio líquido, la bacteria crece en forma de agregados adherentes formando una película sobre la superficie. La adición de detergentes no iónicos como el Tween-80, permite que las células se desarrollen en forma dispersa (35,62).

Antígenos

Los primeros intentos por reconocer los antígenos específicos de M. tuberculosis, se remontan a los estudios de Koch, quien trabajó inicialmente con un extracto de cultivo del bacilo tuberculoso, mediante procedimientos de desnaturalización, con el objeto de eliminar algunos componentes proteicos.

A partir de estos trabajos, se ha demostrado que M. tuberculosis posee diversas fracciones químicas, cuyas características difieren en relación a su composición, disposición y contenido en diferentes organelos subcelulares. El conocimiento de estos antígenos no sólo ha permitido tener una noción más clara sobre los mecanismos patogénicos que generan al daño tisular de la TB, sino que su aplicación en el diagnóstico específico de esta infección ha tenido gran aceptación.

El uso de la tuberculina, iniciado en el año de 1910 (42), fue uno de los primeros hechos que puso en evidencia

que el empleo y estudio de los antígenos de M. tuberculosis eran importantes en el diagnóstico. La aplicación de esta prueba mediante la aplicación del PPD, distinguía a los pacientes con infección o contacto con la micobacteria, lo cual se denominó como "fenómeno de Koch" (15,17).

Posteriormente se inició la identificación de los antígenos micobacterianos en extractos de microorganismos inactivados, como la cepa H37Rv. Esto dió como resultado el reconocimiento de al menos 11 antígenos diferentes en la década de los setenta, iniciándose así, el estudio sobre las especificidades antigénicas que distinguían a M. tuberculosis de otras micobacterias.

Paralelamente a estos estudios, se efectuaron algunos intentos limitados para analizar y clasificar los bacilos tuberculosos en relación con su estructura antigénica. El antígeno proteico causante de la hipersensibilidad a la tuberculina se localizó en una fracción antigénica de la pared celular. Más adelante, se observó la aparición de anticuerpos frente a la fracción fosfátida, pero los anticuerpos frente a los lípidos de estas micobacterias, en general, fueron poco estudiadas. También se logró generar la producción de anticuerpos frente a los polisacáridos en animales infectados con bacilos tuberculosos vivos o muertos por calor, pero no se explicó la respuesta ante el polisacárido aislado. La observación de que el bacilo intacto adsorbía los anticuerpos antipolisacárido, permitió establecer que estos antígenos, sin duda, se hallaban situados en la superficie celular (21,39).

Lípidos

La característica más sorprendente que presentan las micobacterias es su alto contenido de lípidos en la pared celular, constituyendo el 60% del peso seco. Estos componentes se encuentran unidos en gran proporción a proteínas y polisacáridos formando las lipoproteínas y los glicolípidos, que se hallan en la parte externa de la pared bacteriana.

El alto contenido de lípidos en la pared de M. tuberculosis explica el carácter hidrofóbico de estas células, que se muestra por su tendencia a adherirse unas a otras durante su crecimiento en medio acuoso y desarrollarse en la capa superficial. Estos componentes contribuyen también a la lentitud de su crecimiento, ya que dificultan el paso de nutrientes al interior de la célula. Además, puede explicar la relativa impermeabilidad a los colorantes, la resistencia a ácidos y álcalis, la resistencia a la digestión intracelular y a la actividad bactericida de los macrófagos, así como al efecto de los anticuerpos y complemento. Finalmente, los lípidos parecen ser los responsables de las reacciones tisulares generadas por el bacilo, como la formación de granulomas (15,21,62).

Polisacáridos

Estos son los componentes más abundantes en los filtrados y extractos de micobacterias.

La discusión sobre la clasificación de los polisacáridos ha derivado en diferentes estudios de estos componentes. Gran parte de estas moléculas como el glucano, manano, arabinogalactano y arabinomanano se encuentran

unidos químicamente con lípidos presentes en la pared bacteriana. Los compuestos más simples incluyen hexosas, pentosas, manosas, inositol, galactosa y arabinosa entre otros (28). Estos carbohidratos puros son probablemente inertes pero al combinarse con proteínas y otras moléculas pueden mostrar propiedades antigénicas (15,52,57).

Inicialmente Daniel y Todd, describieron una distribución limitada de algunos antígenos denominados "5 US-Japón", que se han incluido dentro del grupo conocido con el nombre de polisacárido I. Más adelante, con el empleo de extractos de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, y con el uso de la contraímmunoelectroforesis (CIE), se lograron separar y clasificar más de 40 componentes antigénicos (15,36,52). Su caracterización como arabinomanano y arabinogalactano, se logro más tarde. Estos últimos se han clasificado dentro de la fracción denominada polisacárido I y están claramente separados del grupo de polisacáridos II (glucanomacromolecular) y de las fracciones proteicas A,B y C de Seibert.

El análisis cuidadoso con concanavalina A, también ha demostrado 3 polisacáridos usando un filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*, mediante precipitación directa y un método de cromatografía de afinidad. Estos estudios revelaron que la concanavalina A reaccionaba con polisacáridos de alta, y mediana afinidad y un tercer componente que no presentaba reacción alguna y que además de ser el de mayor peso molecular era muy similar al polisacárido II o de Seibert (5,8).

La participación de la mayoría de los polisacáridos en la patogénia de la TB es incierta. Sin embargo, se ha

sugerido que un componente de la pared celular de la micobacteria como la cera D, la cual está formada por un complejo ácido micólico-arabinogalactano, es la responsable de la reacción inmune humoral en la TB. También se ha encontrado que estos polisacáridos pueden inducir hipersensibilidad de tipo inmediato e interferir en algunas reacciones antígeno anticuerpo en algunas condiciones *in vitro* (10,40,62).

Durante la investigación de la actividad biológica de algunos carbohidratos de *M. tuberculosis*, se logró observar que el D-arabino-D-galactano, el cual es un constituyente de la pared celular, es el polisacárido de mayor antigenicidad y que el D-arabino-D-manano ocupa el segundo lugar en cuanto a esta capacidad antigénica. Por último, se ha descrito que este último polisacárido está presente en la fracción soluble de las micobacterias y que el péptidoglicano, junto con el arabinogalactano forman parte de los factores que influyen en la virulencia de *M. tuberculosis* (5,8,17,40).

Otro tipo de polisacáridos

Lipoarabinomanano

El compuesto denominado LAM, es un lipofosfopolisacárido que se encuentra con gran abundancia en la pared celular de diferentes especies de micobacterias. Este constituye el carbohidrato más inmunogénico, siendo el responsable de la reactividad humoral en el suero de pacientes con *M. tuberculosis* y *M. leprae*.

Daniel aisló por primera ocasión el LAM, a partir de *M. leprae*. Su análisis fisicoquímico mostró que está

constituido por 2 componentes principales. El arabinomanano cuyo peso molecular es de 10,000 d y los mananos que tienen un peso de 74,000 d (15).

La purificación del LAM de M. tuberculosis en su forma nativa mostró gran similitud con el de M. leprae. Estudios adicionales permitieron evaluar la presencia de anticuerpos específicos y probar la eficiencia de este antígeno en el diagnóstico serológico de lepra, observando resultados que aportaron una alta sensibilidad y especificidad.

La identificación de los anticuerpos anti-LAM, ha mostrado un alto grado de sensibilidad y especificidad en TB, comparable a la frecuencia de estudios previos usando otros antígenos micobacterianos purificados. El hallazgo positivo de estos anticuerpos ha constituido una prueba útil para detectar a pacientes con TB, a pesar de que existen algunos falsos positivos encontrados en pacientes con Histoplasma capsulatum, así como en paracoccidioidomycosis (52).

Fracción proteica

Las proteínas son componentes poco abundantes en M. tuberculosis, constituyendo menos del 3% del peso seco y la mayoría de ellas se encuentran unidas a lípidos. De manera interesante, estas características les confieren diferentes propiedades. Así, las lipoproteínas tienen la capacidad de disparar la respuesta celular, provocando una prueba de tuberculina positiva. Además, estos compuestos inducen la producción de diversos anticuerpos, que se han empleado para fines diagnósticos (53,54). Por ello, estas fracciones proteicas son las responsables principales de la generación

de la respuesta inmune humoral durante la enfermedad (10,15,52).

Ácidos micólicos

En las bacterias se han encontrado una gran variedad de ácidos grasos y entre ellos los ácidos micólicos parecen ser exclusivos de la pared de Mycobacteria, Nocardia y Corynebacterium (10).

Los ácidos micólicos son ácidos grasos grandes, saturados, ramificados en la posición alfa-alquil y beta-hidroxil, que se encuentran en la cera D y en los glicolípidos. Una molécula de arabinogalactano se une covalentemente al peptidoglicano y con alrededor de 30 residuos de ácidos micólicos, formando un puente entre la capa rígida del exterior y las capas lipofílicas de la pared micobacteriana (5,70).

Factores de virulencia

Diversos estudios realizados con M. tuberculosis han demostrado que este agente infeccioso posee distintos factores de virulencia que le confieren la capacidad de incrementar su infectividad, patogenicidad e inmunogenicidad (8).

Dentro de estos factores de virulencia se encuentra el factor cordón. Este componente bacteriano fue extraído por Bloch, a partir de una cepa patogénica de M. tuberculosis empleando éter de petróleo. Los resultados iniciales de dicho autor, mostraron que esta molécula era la causante del crecimiento de la bacteria en forma de serpentina en medio líquido, durante una de las fases de

proliferación relacionadas con la virulencia. Al estudiar la composición de este factor, se determinó que se encuentra constituido por el micósido 6,6'-dimicoliltrealosa (8).

Algunas evidencias que relacionan claramente a este compuesto con la virulencia de la bacteria son las siguientes: El factor cordón es abundante en las cepas virulentas y también es responsable de la fase de crecimiento que caracteriza a esta propiedad. Los ratones son protegidos de la infección mediante la inmunización con una mezcla de factor cordón y albúmina sérica bovina (BSA) metilada que bloquea su efecto, o bien, por una transferencia pasiva de suero de conejo conteniendo anticuerpos anti-factor cordón. Adicionalmente, la administración subcutánea de 10 g de este factor es letal para los ratones no protegidos.

Los efectos patogénicos y de toxicidad del factor cordón se han relacionado con alteraciones a nivel de las enzimas microsomales, mitocondrias y el metabolismo de los lípidos en el hígado. Además, es un componente tóxico que inhibe la migración de los polimorfonucleares *in vitro* y estimula la formación de granulomas.

El micósido de alto peso molecular es otro factor de virulencia. Aunque se encuentra clasificado entre las ceras D, no es una cera verdadera, ya que contiene ácidos micólicos y glucopéptidos. Estos compuestos han sido extraídos aparentemente de la capa basal de la pared de la micobacteria y contienen aminoácidos característicos de esta estructura unidos a polímeros de hexosa y hexosamina (14,59). Algunas de sus propiedades son las siguientes: Una mezcla de cera D y proteína del bacilo tuberculoso induce

hipersensibilidad de tipo retardado a la tuberculina, mientras que la proteína sola es debilmente inmunogénica. Es interesante, que en una emulsión con cualquier antígeno, la cera D incrementa su inmunogenicidad

Los sulfátidos también actúan como factores de virulencia. Estos componentes son lisosomotrópicos para los macrófagos e inhiben la fusión fagosomal previniendo la degradación del bacilo (17,39). Además, tienen la propiedad de incrementar la toxicidad del factor cordón, constituyendo mecanismos de evasión de la bacteria, que pueden permitir que la enfermedad progrese.

La inhibición inicial en la fusión del fagolisosoma inducida por los sulfátidos, ocasiona que la bacteria persista y se desarrolle. Como consecuencia, la población bacteriana se incrementa y se produce más factor cordón y sulfátidos que contribuyen a la destrucción tisular.

AGLUTINACION

La aglutinación, se puede definir como una reacción de neutralización antígeno-anticuerpo, la cual se hace visible formando un aglomerado de partículas de látex o células, que hacen las funciones de un soporte. Para su realización, a veces se requiere de la presencia de un acarreador que magnifica la reacción antígeno-anticuerpo y permite su detección visual en placa o en tubo, o incluso mediante algunos instrumentos especiales de medición, como el espectrofotómetro, turbidímetro, o un lector de partículas.

Las pruebas de aglutinación se han empleado durante muchos años, y siguen constituyendo técnicas importantes en el diagnóstico de diversas enfermedades, tanto infecciosas, como en otros tipos de procesos patológicos.

La aglutinación se puede realizar mediante diversos soportes, que se han dividido en biológicos e inertes. Dentro de los primeros destacan los eritrocitos de carnero y la cepa Cowan-I de S. aureus y entre los inertes se encuentran la sepharosa, el látex y la bentonita (4,9,34,43,50).

En un inicio, la aplicación de las técnicas de aglutinación era limitada. En algunas de ellas se podían emplear sólo algunos tipo de proteínas como la albúmina y la IgG, que eran fáciles de unir al látex. Más adelante, se usaron reactivos como la carbodimida o el bromuro de cianógeno, que permitieron expandir la posibilidad de acoplar diferentes tipos de moléculas y ampliar la utilidad de los sistemas de aglutinación, especialmente con soportes inertes.

La aglutinación con eritrocitos de carnero, ha permitido detectar anticuerpos contra muy distintos antígenos, que se pueden acoplar a este acarreador mediante el empleo de diferentes reactivos, como el ácido tánico, cloruro de cromo o glutaraldehído.

Recientemente, han surgido una multitud de cambios en las técnicas de aglutinación, mediante la optimización y modificación de los diversos compuestos que se usan como soportes.

El empleo de partículas uniformes de poliestireno de 0.1μ ha permitido incrementar la sensibilidad de estas técnicas, que en general no excedían el límite de detección de $1 \mu\text{g/ml}$. Esto ha facilitado la determinación de concentraciones de hasta 10 ng de antígeno o anticuerpo. Las modificaciones de otras características de los acarreadores, como el acoplamiento de marcadores coloridos, o enzimáticos, en conjunto con el diseño de lectores especiales, ha hecho posible que la aglutinación con látex y con otros soportes sean pruebas cuantitativas y altamente específicas.

Desde el punto de vista del antígeno, el conocimiento de sus características fisicoquímicas permitió desde el inicio de las pruebas de aglutinación acoplar diferentes epítopes a diferentes soportes, como fue el caso de los polisacáridos que se unían directamente al eritrocito de carnero. Posteriormente se ha descrito que la modificación de algunas propiedades de los antígenos, como la sustitución o incorporación de haptenos o grupos DNP, favorecen la unión de distintas proteínas al látex y a otros acarreadores.

Los métodos de aglutinación se han empleado en

pruebas tan diversas, como la identificación del factor reumatoide, tipificación de grupos sanguíneos, o la presencia de anticuerpos contra diferentes antígenos de origen infeccioso. La identificación de antígenos bacterianos específicos mediante la aglutinación, se han usado en forma más reciente y en ocasiones han complementado, o incluso desplazado el estudio aislado de los anticuerpos (11,15,34,55).

La aplicación de los ensayos de aglutinación en procesos infecciosos ha sido tan importante, que la lista de infecciones en que se ha empleado supera media centena de entidades clínicas. También son de utilidad para la titulación de anticuerpos y en algunos ensayos de inhibición, como las pruebas de embarazo.

Además de las características intrínsecas del antígeno y del soporte, se han estudiado constantemente las condiciones óptimas para los ensayos de aglutinación. Las diferencias en el pH, osmolaridad, y concentración iónica, así como la presencia de reactivos como el EDTA, modifican sustancialmente las reacciones de aglutinación, por lo que su uso adecuado, es muy importante (34,51).

La coaglutinación se define con este nombre cuando se emplea la cepa Cowan-I de S. aureus como soporte. La implementación de esta técnica se logró en forma paralela a la demostración de la utilidad clínica de diversas pruebas de aglutinación, haciendo uso de partículas inertes como es el látex, o de otros soportes biológicos, como los eritrocitos de carnero.

El estudio de varias cepas de S. aureus coagulasa positiva, mostró que de entre ellas, la Cowan I, presentaba

en la pared una gran cantidad de un compuesto que tenía la capacidad de causar una reacción de precipitación con gamma-globulinas humanas normales y con el suero normal de cobayo. Este compuesto se denominó proteína A, cuyo análisis reveló que estructuralmente consistía de una cadena polipeptídica simple con peso molecular de 42,000 d, que no contiene cantidades significativas de carbohidratos (24). Su característica más relevante fue la propiedad de interaccionar con gran afinidad con la región constante de varias formas de inmunoglobulinas de la clase IgG, como los tipos 1, 2 y 4 de mamíferos (24,43).

Inicialmente se supuso que la proteína A reaccionaba con los anticuerpos producidos por un estímulo con un antígeno específico, y se consideró como una reacción antígeno-anticuerpo. Sin embargo, Forsgren y Sjöquist encontraron que estas reacciones ocurrían a través de los fragmentos Fc de las inmunoglobulinas, motivo por el cual fueron denominadas seudorreacciones (24,58).

En el sistema de coaglutinación, el anticuerpo se une a la proteína A de la bacteria y se genera el reactivo o soporte de la aglutinación (18,34). Durante la interacción de la proteína A con la fracción Fc, se deja libre la fracción Fab, que está directamente implicada en el reconocimiento antigénico. De esta manera, el empleo de la cepa Cowan-I de *S. aureus* tiene la ventaja de no interferir en la reacción específica antígeno-anticuerpo.

La aplicación de los estudios de aglutinación en TB se remontan a la década de los setenta, cuando se encontró que un antígeno denominado proteína tuberculosa, podía ser acoplado al látex, y que esta prueba de aglutinación parecía

indicar el grado de progresión de la enfermedad, ya que se incrementaba o disminuía en forma paralela a la fase de actividad de la enfermedad (32,49). A partir de entonces la coaglutinación se ha aplicado ampliamente en diversos procesos infecciosos diferentes a TB y ha mostrado ser un método rápido y de gran apoyo en el diagnóstico clínico (18,34).

Al realizar el estudio de aglutinación, es importante de considerar, que las características del paciente con TB pueden influir en los resultados de esta prueba de laboratorio. Existen diversas variables, que parecen modificar de manera importante el nivel de anticuerpos contra M. tuberculosis y sus antígenos específicos. Se ha observado que conforme avanza la enfermedad el título de anticuerpos se incrementa al usar algunas pruebas de aglutinación.

Esta variación de los anticuerpos y especialmente del nivel antigénico de M. tuberculosis durante las fases activas o de remisión de la enfermedad, ha contribuido con datos adicionales para identificar diferentes formas de expresión clínica y serológica de la TB. Además, la detección de antígenos proteicos específicos de la micobacteria en muestras clínicas, es de gran trascendencia ya que puede simplificar el diagnóstico de ésta y otras enfermedades con alta prevalencia, como las infecciones por estreptococo o salmonela entre otras (18,20,27,49).

MATERIAL Y METODOS**Material****a) Material**

Tubos de ensayo de vidrio

Tubos cónicos de polipropileno de 50 ml

(Costar, USA)

Pipetas serológicas de vidrio (Pyrex)

Placas de vidrio con excavaciones

Vasos de precipitado de vidrio (Pyrex)

Vasos de precipitado de plástico (Nalgene)

Tubos Eppendorf

Matraz Erlenmeyer de vidrio (Pyrex)

Cajas petri (Pyrex)

Gendarmes

Pipetas automáticas (Gilson)

Pipeta multicanal (Tittertek)

Aplicadores

Placas de poliestireno (Nunc Roskilde, Danemark)

Columna de plástico (Nalgene)

Jeringas de insulina (Plastipack)

Jeringas de plástico desechables (5,10,20 ml)

(Plastipack)

b) Reactivos

Etanol (Merck)

Fenol (Merck)

Formaldehído (Merck)

Adyuvante de Freund (Sigma Co, USA)

Albúmina bovina fracción V (Sigma Co, USA)

Anticuerpo biotinilado anti-IgG de conejo (ICN)

ImmunoBiologicals)

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)
PBS-Tween-20 al 0.05% (Sigma Co, USA)
Estreptoavidin-peroxidasa (Sigma Co, USA)
Proteína A (Pharmacia)
Amortiguador de citratos (0.1 M, pH 5.0)
Sepharosa 4B con proteína A (Pharmacia)
Biotina (Sigma Co, USA)
EDTA (Merck)

c) Equipo

Espectrofotómetro para placas de ELISA (Minireader II), (Dynatech).
Agitador rotatorio
Potenciómetro (Beckman)
Centrífuga refrigerada (Beckman)
Microcentrífuga (Beckman)
Mechero Bunsen
Campana de flujo laminar (Veeco)
Estufa de incubación (Napco)
Reloj de intervalos
Bomba peristáltica (Pharmacia)

Pacientes

Se incluyeron un total de 246 muestras que se dividieron en 6 grupos, de acuerdo al tipo de pacientes en estudio:

Grupo I: 63 pacientes con TB pulmonar definitiva en período de actividad, con BAAR y cultivo positivos en expectoración.

Grupo II: 19 pacientes con TB pulmonar con cultivo positivo para M. tuberculosis en expectoración, y serología positiva para HIV.

Grupo III: 10 casos con enfermedad pulmonar, en los que se documentó la presencia de M. avium.

Grupo IV: 32 enfermos HIV positivos, sin TB.

Grupo V: 60 pacientes con otra patología pulmonar diferente a TB, la cual se excluyó mediante evaluación clínica, radiológica y estudio microbiológico.

Grupo VI: 62 controles clínicamente sanos, quienes se estudiaron y captaron en el banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Metodología

Obtención del anticuerpo anti-LAM

Este anticuerpo se obtuvo a partir de la inmunización de conejos Nueva Zelanda Blancos (NZW) de 6 semanas de edad. El antígeno administrado consistió de un extracto de M. tuberculosis de la cepa H37Rv, que se trató inicialmente con fenol al 10% y posteriormente se sometió a sonicación.

El proceso de inmunización se realizó durante 7 semanas por vía intramuscular con adyuvante incompleto de Freund (Sigma Co. USA) a una dosis de 3 mg/ml, seguido por la administración intravenosa de 1 mg/ml del mismo extracto durante 5 semanas. Al término del procedimiento de inmunización, se obtuvo la muestra de sangre de estos conejos mediante punción cardíaca y se procedió a centrifugar para separar el suero, el cual se almacenó en alícuotas que se mantuvieron en congelación a -20°C, hasta

su utilización posterior.

Titulación del anticuerpo anti-LAM

Este procedimiento se llevó a cabo sensibilizando placas de poliestireno (Nunc Roskilde, Danemark) con 1 μ g/ml de LAM puro en amortiguador de carbonatos (0.05 M, pH 9.6). Posteriormente se bloquearon los sitios inespecíficos con BSA fracción V (Sigma Co, USA) a una concentración del 1%.

El suero de los conejos inmunizados se colocó en las placas usando diluciones sucesivas de 1:100 hasta 1:128,000. Posteriormente se procedió a lavar los pozos con PBS-Tween-20 al 0.05% y en seguida se incubó un anticuerpo biotinilado anti-IgG de conejo (ICN, ImmunoBiologicals). La dilución óptima recomendada de este anticuerpo fue de 1:1,000. Este preparado se incubó por una hora a 37°C y posteriormente se adicionó estreptoavidina-peroxidasa (Sigma Co, USA) a una dilución de 1:1,000. Al cabo de una hora de incubación a 37°C se lavó 5 veces con PBS-Tween-20 y se procedió a revelar con ortofenilendiamina a una concentración de 4 mg/ml diluída en un amortiguador de citratos (0.1 M, pH 5.0). La densidad óptica en este sistema de ELISA se leyó en un espectofotómetro para placas de 96 pozos (Minireader II, Dynatech).

Con estos ensayos se logró demostrar que el método de inmunización que se utilizó fue el óptimo, obteniendo un título de los anticuerpos de 1:32,000.

Una vez obtenido el suero del conejo inmunizado se procedió a recuperar la IgG mediante una columna de afinidad con sepharosa 4B activada, a la que se acopló previamente proteína A (Pharmacia).

Este procedimiento consistió en la incubación del suero durante 2 h a temperatura ambiente (TA) y la recirculación de este preparado durante 24 h a 4°C para capturar el máximo de inmunoglobulinas. La IgG que se unió a la columna se eluyó con una solución de glicina-HCl (0.1 M, pH 2.8) y las fracciones se colectaron en volúmenes de 1 ml, neutralizando el pH con una solución amortiguadora de Tris (0.5 M, pH 8.0). La densidad óptica (D.O.) obtenida en el espectrofotómetro a 280 nm se encontró en el rango 0.784 a 2.195.

A los anticuerpos purificados se les determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (Anexo I). El título de la IgG recuperada fue de 1:16,000, por el método de ELISA.

Especificidad de los anticuerpos anti-LAM

Para identificar la especificidad de estos anticuerpos anti-micobacteria se decidió realizar un método de ELISA y emplear un marcaje con biotina (Sigma Co. USA). Para ello se utilizó una fracción de los anticuerpos anti-LAM purificados mediante la columna de sepharosa 4B con proteína A, para conjugarse a biotina (Anexo I).

La especificidad del anticuerpo contra LAM se demostró mediante una técnica de ELISA. En este sistema se utilizó LAM puro (donado generosamente por el Dr. Patrick Brennan, del Departamento de Microbiología de la Universidad de Colorado. USA) (52), el cual se diluyó en un amortiguador de carbonatos (0.1 M, pH 9.6) a una concentración de 1 µg/ml. Este preparado se incubó durante 12 h a 4°C. Posteriormente se bloqueó con 1% de BSA (Sigma Co, USA) y se

adicionó el anticuerpo anti-LAM previamente marcado con biotina. En seguida se agregó estreptoavidina-peroxidasa y se procedió a revelar con ortofenilendiamina.

El bloqueo de la reacción se realizó con ácido sulfúrico 2.5 N y la lectura de esta prueba de ELISA se realizó en un espectrofotómetro para placas de 96 pozos (Dynatech).

Purificación de LAM

A partir de los anticuerpos anti-LAM obtenidos mediante la inmunización en conejos, se preparó una columna de afinidad con sepharosa 4B activada comercial (Sigma Co, USA), a la cual se acoplaron 10 mg del anticuerpo anti-LAM previamente separado en la columna de sepharosa 4B con proteína A.

Para purificar el antígeno, se recirculó un suero positivo para LAM previamente conocido, cuya determinación se confirmó por coaglutinación y la prueba de ELISA. Al término de esta incubación se lavó la columna y una vez obtenidas lecturas de D.O. menores de 0.001, a 280 nm, se procedió a obtener las fracciones de LAM mediante el tratamiento con una solución de glicina-HCl. Una vez obtenido este preparado se dializó extensamente en contra de amortiguador de fosfatos (PBS) (0.1 M, pH 7.2) y la fracción de LAM se determinó mediante los métodos de aglutinación y ELISA.

Obtención de cepa Cowan-I de Staphylococcus aureus (SAC-I).

Se obtuvo la cepa Cowan-I de S. aureus (donado generosamente por el Dr. Samuel Ponce de León, del Instituto

Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán").

El cultivo se realizó a partir de una colonia contenida en medio de conservación de caldo tioglicolato. Para ello se procedió a colocarla en un medio de gelosa sangre (Sigma Co, USA) sembrando por el método de estria. Después de su incubación a 37°C durante 24 h se tomó una segunda colonia y se llevó a un medio líquido de infusión cerebro corazón (BHI) (Sigma Co, USA), en el cual se mantuvo durante 24 h a 37°C. Posteriormente se trasladó a un medio sólido de Mueller Hinton y se incubó durante 72 h a 37°C. Una vez que se obtuvo el máximo de crecimiento se recolectaron las colonias empleando PBS (0.1 M, pH 7.2) previamente esterilizado mediante autoclave. La suspensión del SAC-I se lavó 2 veces con 7 ml de PBS y se recolectó en un tubo cónico de 50 ml (Costar, USA).

La inactivación del SAC-I se realizó mediante la incubación en baño maría a 96°C durante 20 minutos, seguido de un proceso de enfriamiento rápido al chorro de agua. Este preparado se centrifugó a 7,000 x g durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente se procedió a lavar 3 veces con PBS estéril y se le adicionó PBS-formaldehído al 0.5%, con el cual se incubó a TA durante una hora. Una vez obtenida esta suspensión se lavó 3 veces con PBS a TA y se ajustó a una concentración del 10% peso-volumen (27), conservando esta muestra con azida de sodio al 0.01% y manteniendo en refrigeración a 4°C.

Sensibilización del SAC-I

Este procedimiento se basó en el método de Edward y Larson (20). Para ello, se tomaron 500 μ l de la suspensión de SAC-I al 10% y 200 μ l del anticuerpo previamente

purificado a una concentración de 2 mg/ml. Esta mezcla se incubó durante 3 h a 37°C en agitación constante y al término de este paso se procedió a lavar 3 veces con PBS, resuspendiendo al final en 1 ml de PBS con 0.01% de azida de sodio.

Para verificar que la sensibilización fuera la adecuada, se incubaron 10 μ l del SAC-I sensibilizado, con 100 ng de LAM puro, valorando con ello la presencia de una prueba de aglutinación positiva. De la misma forma se prepararon controles negativos del sistema, adicionando 200 μ l de IgG normal de conejo y 200 μ l de PBS con BSA, los cuales se enfrentaron con 100 ng de LAM puro, produciendo una aglutinación negativa. El SAC-I sensibilizado se almacenó a 4°C, hasta su empleo en el ensayo de coaglutinación.

Estos experimentos que se realizaron, confirmaron que con 100 μ l de la suspensión del SAC-I al 10% se captaron entre 10 a 15 μ g del anticuerpo, lo que coincide con los datos de otros autores.

Ensayo de coaglutinación

Este método se realizó de acuerdo a la descripción de Doskeland (18).

Para ello, partimos de 100 μ l de suero no deplementado, con el cual se procedió a obtener un precipitado adicionando 80 μ l de EDTA disódico (0.1 M) (Merck), seguido por una incubación en ebullición en baño maría durante 3 minutos. Posteriormente se realizó una centrifugación (1,500 x g) durante 8 minutos.

El sobrenadante se precipitó 2 veces más mediante la

adición de etanol a una concentración final del 70%. Después de su enfriamiento, se centrifugó a 1,500 x g durante 8 minutos, para posteriormente resuspender el precipitado en 80 μ l de PBS (0.01 M, pH 7.2). Esta muestra se utilizó inmediatamente o se almacenó en congelación (-70°) hasta 8 días sin afectar la determinación de LAM.

La presencia de LAM se detectó incubando 10 μ l del suero problema previamente tratado, con 10 μ l del SAC-I sensibilizado, en presencia de una solución de PBS-BSA fracción V (Sigma Co. USA) al 3%. Este preparado se incubó en una placa de pozos excavados agitando suavemente durante 15 minutos a TA.

La lectura de la aglutinación se realizó mediante una comparación con una curva de concentración conocida de LAM puro, incluyendo niveles entre 25 a 100 ng/ml en cada experimento.

En este ensayo se emplearon tanto los sueros problemas como los controles internos de cada muestra. Por una parte se empleó el SAC-I sensibilizado con IgG hiperinmune, SAC-I con IgG de conejo normal, así como SAC-I con PBS conteniendo BSA al 3% y el suero diluido en PBS, para apreciar la posible aglutinación producida por la propia muestra.

La interpretación de la prueba se realizó por cruces de acuerdo a la intensidad de aglutinación que se obtuvo con concentraciones conocidas de LAM puro, considerando un resultado positivo de una cruz a la aglutinación producida por 25 ng de LAM, dos cruces al correspondiente a 50 ng y tres cruces al equivalente a 100 ng del antígeno puro. Para evaluar la concentración de LAM en las muestras, así como de

los controles positivo y negativo, se procedió según el cuadro siguiente:

CUADRO 2. ESQUEMA DE LA REALIZACION DE LA COAGLUTINACION E INTERPRETACION SEMICUANTITATIVA USANDO UNA CURVA CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LAM PURO

LAM*	IgG**	DIL	Ag	LECTURA
(ng)	_____	μ l _____	_____	
100	10	50	10	+++
50	10	50	10	++
25	10	50	10	+
<25	10	50	10	Neg

* LAM puro

** IgG de conejo

DIL: Diluyente

Neg: negativo

Detección de LAM por la prueba de ELISA

Además de la coaglutinación, los sueros de este estudio se probaron también por la técnica de ELISA con la finalidad de verificar si los resultados que se obtuvieron

por coagulación mostraban alguna relación con otra técnica de alta sensibilidad.

El método de ELISA consistió en la sensibilización de placas de poliestireno (Nunc, Roskilde. Danemark) con 4 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo purificado en conejos, en amortiguador de carbonatos (0.1 M, pH 9.6). La incubación se realizó durante 24 h a 4°C. Posteriormente se bloqueó con BSA al 1% durante 12 h a 4°C. En seguida se procedió a adicionar los sueros previamente tratados y diluidos apropiadamente en PBS-Tween al 0.05% y se incubaron durante una hora a 37°C. Después se adicionó el anticuerpo anti-LAM, previamente marcado con biotina. Más adelante se lavó 5 veces y se adicionó ortofenilendiamina, para evidenciar la reacción enzimática.

El bloqueo de la reacción enzimática se realizó mediante la adición de ácido sulfúrico 2.5 N. La densidad óptica se determinó en un lector para microplacas (Minireader II, Dynatech) a una D.O. de 490 nm. Las lecturas superiores a la media +2 D.E. de los controles se consideraron positivas.

Aplicación de los métodos de coagulación y ELISA en otras muestras biológicas

En este estudio se lograron obtener 51 muestras de lavado bronquioalveolar (LBA) mediante broncoscopia. Veintisiete de estos lavado se obtuvieron de pacientes con TB pulmonar y 24 muestras correspondieron al grupo control, el cual incluyó a otras enfermedades pulmonares diferentes a TB. También se estudiaron 6 muestras de líquido cefalorraquídeo obtenidas por punción lumbar, así como una

muestra de orina.

La determinación de LAM en estos especímenes se realizó mediante el sistema de coagulación y la prueba de ELISA. Las muestras de LBA y LCR se precipitaron de la misma manera que los sueros, mientras que la muestra de orina se concentró previamente y posteriormente se realizó el proceso de precipitación.

Análisis de resultados

Los datos entre los pacientes con TB y los controles se compararon estadísticamente mediante las pruebas de varianza, X^2 , Fisher y "t" de Student.

Los cálculos respectivos, se realizaron mediante el empleo de programas estadísticos, que se han aplicado especialmente para evaluar parámetros biomédicos (Epistat y Statgraphics).

Evaluación de las técnicas de coagulación y ELISA

La evaluación de la utilidad de la coagulación como método de diagnóstico en TB se realizó mediante la estimación de los siguientes parámetros: sensibilidad, especificidad y eficiencia, así como valor predictivo positivo y negativo (16).

Sensibilidad. Esta se define como la capacidad de la prueba para identificar correctamente a todos los pacientes enfermos.

$$\text{sensibilidad} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}} \times 100$$

Especificidad. Este parámetro se define como la capacidad de la prueba para identificar correctamente a todos los pacientes no enfermos.

$$\text{especificidad} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}} \times 100$$

Eficiencia. Esta medida indica el porcentaje de pacientes correctamente clasificados por la prueba (enfermos y no enfermos).

$$\text{eficiencia} = \frac{\text{VP} + \text{VN}}{(\text{VP} + \text{FP} + \text{FN} + \text{VN})} \times 100$$

Valor predictivo positivo. Es la medida que estima qué tan frecuente la prueba es correcta cuando el resultado es positivo.

$$\begin{aligned} \text{valor predictivo} \\ \text{positivo} &= \frac{\text{VP} + \text{FP}}{\text{VP}} \end{aligned}$$

Valor predictivo negativo. Este valor indica qué tan a menudo la prueba es incorrecta cuando el resultado es negativo.

$$\begin{aligned} \text{valor predictivo} \\ \text{negativo} &= \frac{\text{FN} + \text{VN}}{\text{VN}} \end{aligned}$$

Donde:

VP = Verdadero positivo

VN = Verdadero negativo

FN = Falso negativo

FP = Falso positivo

Adicionalmente, en la prueba de ELISA se evaluaron las variaciones intraensayo e interensayo.

RESULTADOS Y ANALISIS

Titulación y especificidad del anticuerpo anti-LAM y obtención de la fracción IgG

El esquema de inmunización que se realizó permitió optimizar, tanto nuestros métodos de obtención y rendimiento de los anticuerpos, como asegurar una excelente especificidad.

En primer lugar, la obtención de los anticuerpos anti-LAM fue sumamente efectiva obteniendo títulos altos, tanto con el suero total de los conejos, como con la fracción IgG obtenida por cromatografía.

La titulación elevada del suero total, se demostró mediante Ouchterlony y la prueba de ELISA. La titulación del anticuerpo reveló que existía una sola banda de precipitación por inmunodifusión doble y que ésta persistía al emplear diluciones del suero original por arriba de 1:1,280. Además, se encontró que el suero hiperinmune empleado a diluciones superiores de 1:32,000 tuvo una reactividad específica contra LAM, permitiendo obtener lecturas mayores de 1.0 de D.O. en el sistema de ELISA en el que se empleó antígeno puro.

Por otro lado, se apreció que una muestra de suero total original y una fracción obtenida mediante columna de afinidad a partir de una mezcla del suero hiperinmune del conejo, reveló una unión creciente del suero en placas de poliestireno sensibilizadas previamente con 1 μ g/ml de LAM puro. Esta determinación se realizó con un método de ELISA empleando un anticuerpo específico anti-IgG de conejo marcado con biotina (ICN, Immunobiologicals), que nos permitió confirmar la correcta purificación de la porción

IgG del anticuerpo anti-LAM.

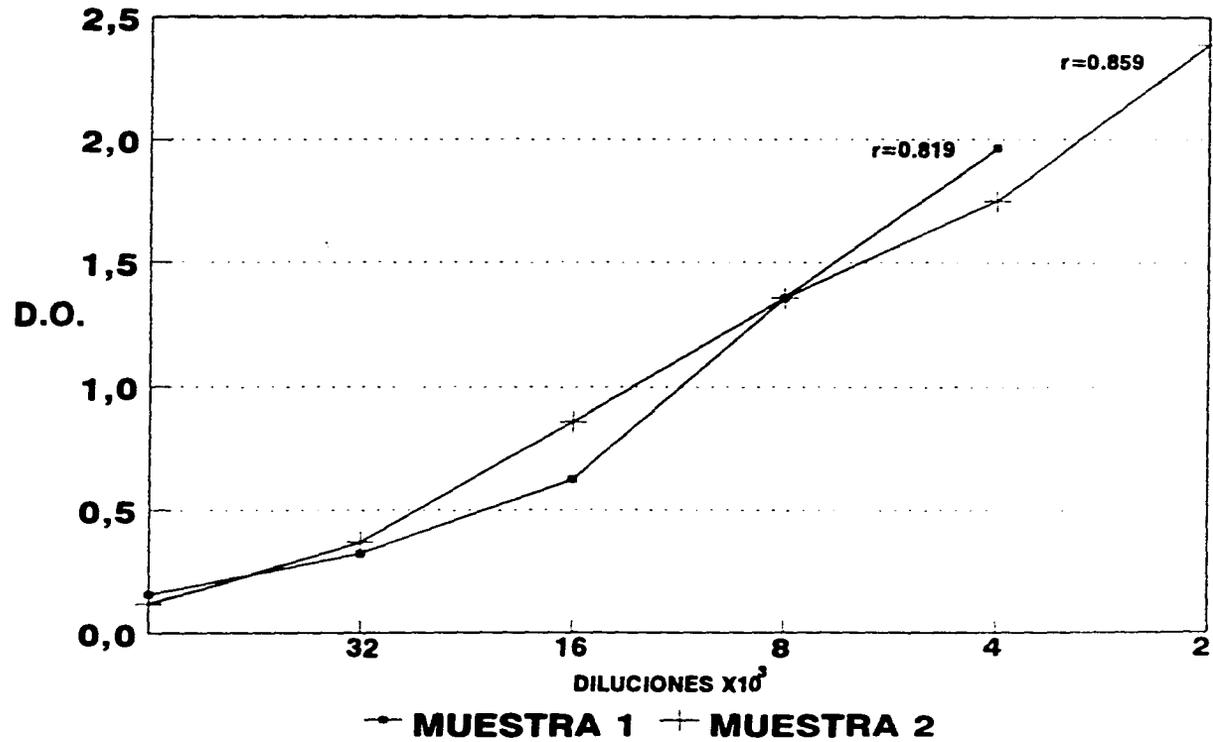
Los resultados de este experimento se expresan en el cuadro 3 y la gráfica 1 donde se observa que a mayor dilución del anticuerpo se encontró menor lectura. En estos ensayos se obtuvieron lecturas positivas, superiores a 0.5 de D.O. con diluciones de 1:16,000 y la correlación fue altamente significativa con valores de $r=0.819$ y $r=0.858$

CUADRO 3. DETECCION DE LAM MEDIANTE ANTICUERPOS ESPECIFICOS
GENERADOS EN CONEJOS Y PURIFICADOS MEDIANTE COLUMNA DE
AFINIDAD

DILUCION DEL SUERO ($\times 10^3$)	MUESTRAS	
	1*	2*
	D.O. (280 nm)	
1:2	2.39	2.50
1:4	1.75	1.96
1:8	1.33	1.36
1:16	0.86	0.62
1:32	0.37	0.32
1:64	0.12	0.16

* $r=0.859$ y 0.819 respectivamente

GRAFICA 1



Anticuerpos anti-LAM con antígeno puro. Sistema de detección con anticuerpos específicos anti-IgG

La obtención de la fracción IgG con reactividad específica anti-LAM, se realizó a partir del suero hiperinmune generado en conejos NBW. Esto se realizó mediante un método de cromatografía a partir del empleo de un inmunoabsorbente. Así, se logró establecer un método de captura de alta eficiencia al emplear una columna de afinidad de sepharosa 4B a la que se acopló proteína A (Pharmacia).

Con esta técnica se observó un rendimiento adecuado y una excelente purificación de la fracción IgG del anticuerpo anti-LAM a partir del suero total obtenido de los conejos inmunizados.

Cuando se realizó el método de separación por cromatografía, a partir de la recirculación repetida del suero original de los conejos inmunizados, seguida por la separación del anticuerpo mediante el uso de una solución de glicina-HCl, se apreció que los valores de los eluados en la zona de máxima recuperación variaron entre 0.8 y 1.900 de D.O., mediante la lectura por espectroscopía a 280 nm (Cuadro 4).

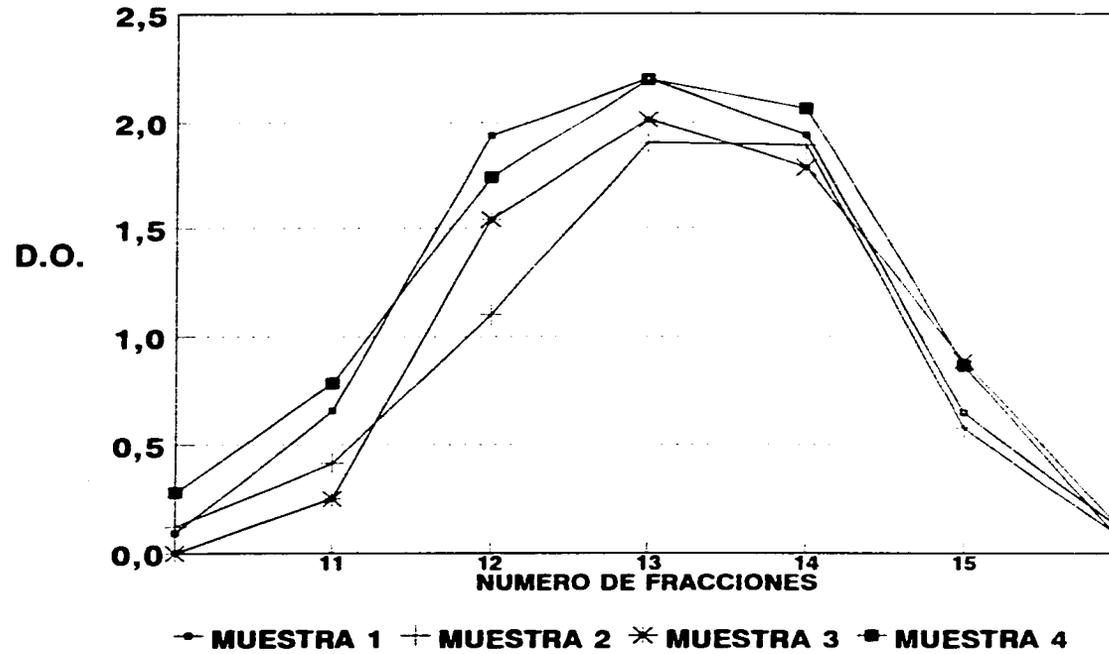
En la gráfica 2 se muestra que el patrón de separación fue muy similar en 4 corrimientos representativos de este sistema de separación por cromatografía de afinidad, usando el suero total de los conejos inmunizados. Estos perfiles fueron reproducibles en al menos 10 corridas consecutivas del suero total de 2 conejos, en los que se observó una separación muy bien definida del pico de los anticuerpos.

CUADRO 4. RESULTADOS DEL METODO DE SEPARACION DEL SUERO
HIPERINMUNE ANTI-LAM, MEDIANTE COLUMNA DE AFINIDAD CON
PROTEINA A.

FRACCIONES	MUESTRAS			
	1	2	3	4
	D.O. (280nM)			
9*	0.000	0.000	0.003	0.000
10	0.092	0.120	0.280	0.009
11	0.654	0.415	0.784	0.254
12	1.936	1.100	1.740	1.543
13	2.200	1.900	2.195	2.013
14	1.940	1.888	2.065	1.785
15	0.646	0.577	0.867	0.888
16	0.109	0.069	0.051	0.106
17	0.037	0.000	0.000	0.000

* fracciones de 1 ml

GRAFICA 2



Patrón de corrimiento de cuatro muestras representativas obtenidas mediante cromatografía de afinidad con proteína A

Sensibilización del SAC-I y optimización del sistema de coaglutinación

Una vez obtenida la fracción de IgG anti-LAM, se realizó la unión de ésta al SAC-I para su empleo en el sistema de coaglutinación.

Las fracciones colectadas y utilizadas para preparar los sistemas de coaglutinación fueron seleccionadas de aquéllas que superaron la lectura de 0.800 de D.O. durante el procedimiento de separación en la cromatografía de afinidad.

La sensibilización del SAC-I con el anticuerpo anti-LAM se logró en forma óptima realizando una incubación de 2 mg/ml por cada 500 μ l de SAC-I al 10% de acuerdo a la descripción de Doskeland (18). También se procedió a utilizar IgG normal de conejo obtenida de la misma manera que la hiperinmune. La sensibilidad del SAC-I con esta IgG de control fue similar a la hiperinmune en cuanto a su unión, pero no mostró resultados positivos al emplearla en el ensayo de coaglutinación con LAM puro en concentraciones de 1 ng a 1 μ g/ml, por lo que se consideró que la especificidad de nuestro sistema de sensibilización fue la adecuada. Además, los controles internos, empleando SAC-I diluido con PBS y el SAC-I no sensibilizado con diferentes concentraciones de LAM, no mostraron aglutinación alguna (Cuadro 5).

Como se describió anteriormente, con la concentración preestablecida de los anticuerpos anti-LAM, se logró interpretar correctamente la aglutinación. En este proceso se emplearon de 1 a 1,000 ng de LAM puro, apreciando

que nuestro método fue claramente semicuantitativo entre 25 a 100 ng con lecturas positivas de una a 3 cruces, equivalentes a 25, 50 y 100 ng de LAM puro. Al usar concentraciones menores de 25 ng del antígeno no se manifestó ninguna reacción de aglutinación y sólo al emplear LAM a concentraciones superiores de 200 ng/ml o arriba de este límite se detectó interferencia, observando aglutinación inespecífica cuando se empleó la IgG normal no hiperinmune. Por otra parte, al estudiar la unión de este anticuerpo en diferentes preparados de *M. tuberculosis*, se encontró que la IgG obtenida en este trabajo mostró mayor reactividad con PPD y menor reacción con BCG (Cuadro 5).

CUADRO 5. RESULTADOS DE LA COAGLUTINACION CON ANTIGENO PURO EMPLEANDO ANTICUERPOS ANTI-LAM OBTENIDOS EN CONEJOS

	LAM (ng)					PPD	BCG
	<25	25	50	100	200		
	COAGLUTINACION						
IgG anti-LAM*	neg*	+	++	+++	++++	++	+
IgG control	neg	neg	neg	neg	±	neg	neg
PBS-BSA	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

*neg: negativo

Resultados en muestras biológicas por coaglutinación

El estudio de LAM en los sueros de pacientes, empleando como curva de concentración el antígeno puro a diferentes diluciones, que variaron entre 25 y 100 ng totales, revelaron resultados consistentes y reproducibles mostrando una prueba de aglutinación positiva que varió de una a 3 cruces.

Al dividir a las muestras en estudio en los diferentes grupos de pacientes con TB pulmonar y controles, se encontró diferente porcentaje en cuanto al resultado de la coaglutinación, dependiendo del grado de positividad.

Al estudiar las 63 muestras de pacientes con TB pulmonar previamente identificados mediante cultivo de expectoración, BAAR y pruebas bioquímicas para la identificación de *M. tuberculosis* (incluyendo niacina y reducción de nitratos a nitritos positivas, y catalasa a 20°C positiva y a 68°C negativa, así como ureasa positiva y crecimiento en la hidrazida del ácido 2 tiofeno carboxílico (1 mg/ml), aril-sulfatasa (3 días) negativas), se observó positividad de coaglutinación arriba de 25 ng en el 95.3%. En contraste, sólo 2 de 62 sueros normales mostraron resultados positivos ($\chi^2=66.44$, $p<1\times 10^{-6}$). Los controles internos con el empleo de IgG normal y el SAC-I con PBS y BSA no revelaron aglutinación alguna.

Los pacientes con prueba HIV+ y TB pulmonar mostraron 16 de 19 muestras positivas arriba de 25 ng de LAM (84.21%), en comparación con aquellos pacientes con HIV+ sin TB que tuvieron 28 de 32 sueros negativos. Al estudiar 10 casos con infección por *M. avium* se encontró que los 10 sueros eran positivos (100%).

Fué interesante observar, que en el grupo con enfermedad pulmonar diferente a TB sólo se observaron 6 casos positivos, de los cuales un paciente presentaba criptococosis y otro tenía infección por Nocardia. Sólo uno de los 62 casos (1.66%) con enfermedades diferentes a TB pulmonar tenía resultados que superaron los 50 ng de LAM.

Los resultados individuales correspondientes a cada grupo y sus concentraciones respectivas se pueden observar en el cuadro 6.

CUADRO 6. RESULTADOS DE COAGLUTINACION DE ACUERDO A UN METODO SEMICUANTITATIVO EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO

Grupo	Dx	muestras (n=)	LAM (ng)			
			>100	50	25	<25
I	TBP	63	11	39	10	3
II	TBP, HIV+	19	3	3	10	3
III	Infección (<u>M. avium</u>)	10	0	2	8	0
IV	HIV+ sin TB	32	0	0	4	28
V	Enfermedad diferente de TB	60	0	1	5	54
VI	Controles Sanos	62	0	0	2	60

Con los datos anteriores, el primer objetivo fue establecer el valor de sensibilidad mediante la comparación de los resultados de los pacientes con TB pulmonar probada previamente. Este análisis aportó cifras del 95.2% de sensibilidad. La especificidad contra los controles normales fue del 98.3%.

Al analizar otras características de la prueba de aglutinación, se apreciaron otros datos interesantes. El valor de la exactitud o precisión para el sistema de coagulación fue del 97%. El valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo correspondieron a 98 y 95% respectivamente.

Características semicuantitativas de la prueba de coagulación

La prueba de coagulación fué claramente positiva al observar una cruz, sin embargo, cuando se analizó su relación con la curva de titulación de LAM puro se apreció, que para contar con un método semicuantitativo debía considerarse un resultado de 2 cruces. Por ello, los resultados de coagulación considerados positivos en un ensayo semicuantitativo, fueron aquéllos superiores a 50 ng de LAM y correspondieron a una lectura por el sistema de aglutinación de 2 cruces. De acuerdo a este criterio se encontró, que de un total de 92 muestras de sueros de pacientes con TB, 58 (63.04%) mostraron resultados positivos.

Al clasificar en subgrupos respectivos de acuerdo a la patología como lo muestra el cuadro anterior, se obtuvieron los siguientes datos para coagulación: El

79.36% de las muestras fueron positivas en el grupo con TB pulmonar, los pacientes con TB pulmonar y prueba de HIV+ tuvieron el 31.57% de casos positivos, el grupo con infección por M. avium mostró 20% de sueros positivos y las enfermedades pulmonares diferentes de TB revelaron sólo el 1.66% de muestras positivas.

En el grupo total con TB, el 15.21% presentó 3 cruces, que fue el mayor nivel de antígeno detectado en este estudio. La mayoría de estos pacientes (11/14) correspondieron al grupo de TB pulmonar activa.

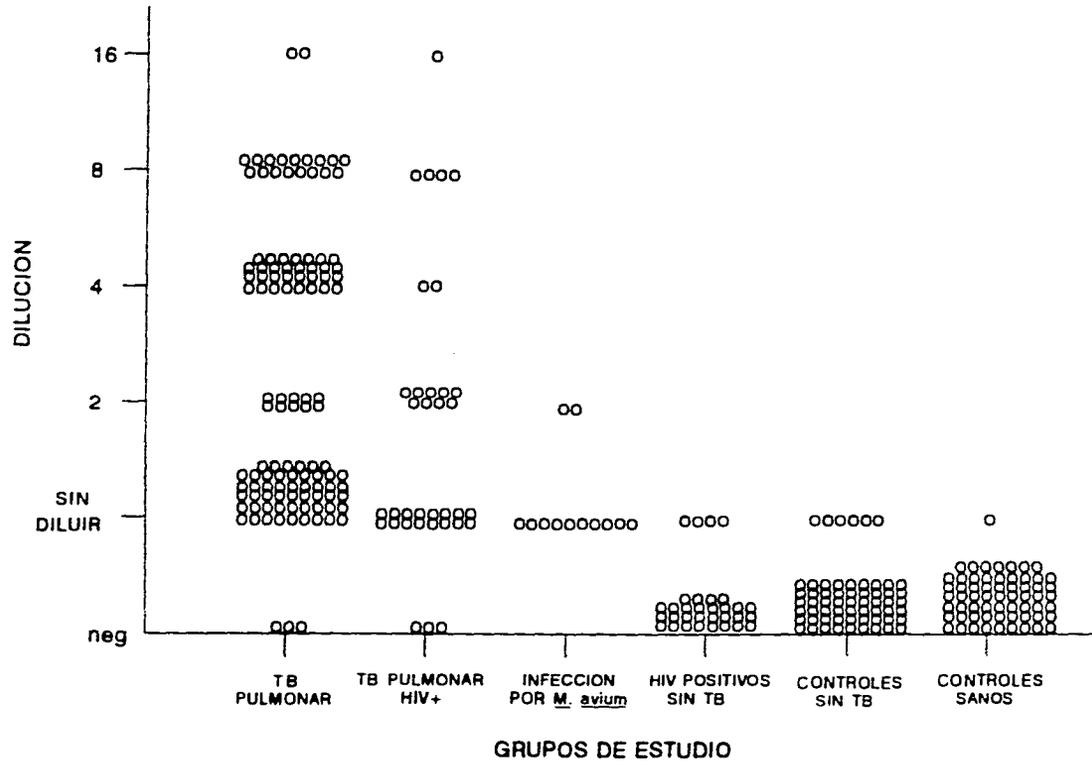
La misma tendencia se observó cuando el resultado fue de 2 cruces (50 ng), observando que el 47.82% tenía este nivel de LAM. Nuevamente la mayoría (39/44) correspondió al grupo con TB pulmonar activa.

De forma interesante, los pacientes que presentaron 3 cruces fueron aquéllos que tenían una enfermedad de reciente instauración y con un cuadro activo de TB, detectado clínicamente. En contraste, el mayor número de sueros de los grupos controles mostraron 25 o menos de 25 ng de LAM (98.33%).

El análisis estadístico mostró una diferencia significativa entre los pacientes con TB pulmonar y aquéllos con TB y prueba HIV+, al compararlos con los controles ($p < 1 \times 10^{-6}$, $p < 1 \times 10^{-8}$ por las pruebas de χ^2 y Fisher).

Los resultados semicuantitativos individuales de la coaglutinación en los diferentes grupos de estudio se presentan en la figura 1.

FIGURA 1



Comparación de los resultados de coagulación usando sueros diluidos de los diferentes grupos de pacientes. Se aprecia una clara separación entre el grupo con TBP y los controles

Resultados por coaglutinación en muestras diluidas

Con el objeto de confirmar la utilidad de la prueba de coaglutinación, como un sistema semicuantitativo, se realizaron diluciones sucesivas de los sueros. Con ello se determino el título máximo en el que persistía positiva la aglutinación.

Dentro de los hallazgos obtenidos, fue interesante observar que un gran porcentaje de sueros del grupo de pacientes con TB pulmonar (grupo I) persistían con resultados positivos de coaglutinación al diluir la muestra problema 1:4 y 1:8. La tendencia de estos resultados era similar, pero menos notoria en los pacientes con TB con prueba HIV+.

En la figura 3 se comparan tanto los resultados de los diferentes grupos de pacientes usando las muestras directas, como las diluciones máximas a las que fueron positivas.

Al analizar los resultados individuales se apreció que se logró distinguir claramente a los enfermos con TB de los controles sin esta enfermedad. En el grupo con TB pulmonar y en los enfermos con TB pulmonar con prueba HIV+ se encontraron frecuentemente sueros en los que la prueba de coaglutinación era positiva a un dilución superior de 1:2 (83.3y 43.7% respectivamente).

En contraste, en los grupos de controles estudiados, incluyendo a los enfermos con otra patología pulmonar diferente de TB pulmonar, las muestras de pacientes con SIDA sin TB y los sueros normales, no se observaron resultados positivos con diluciones de 1:2 o superiores. Además, se apreció que al dividir y analizar los resultados de los

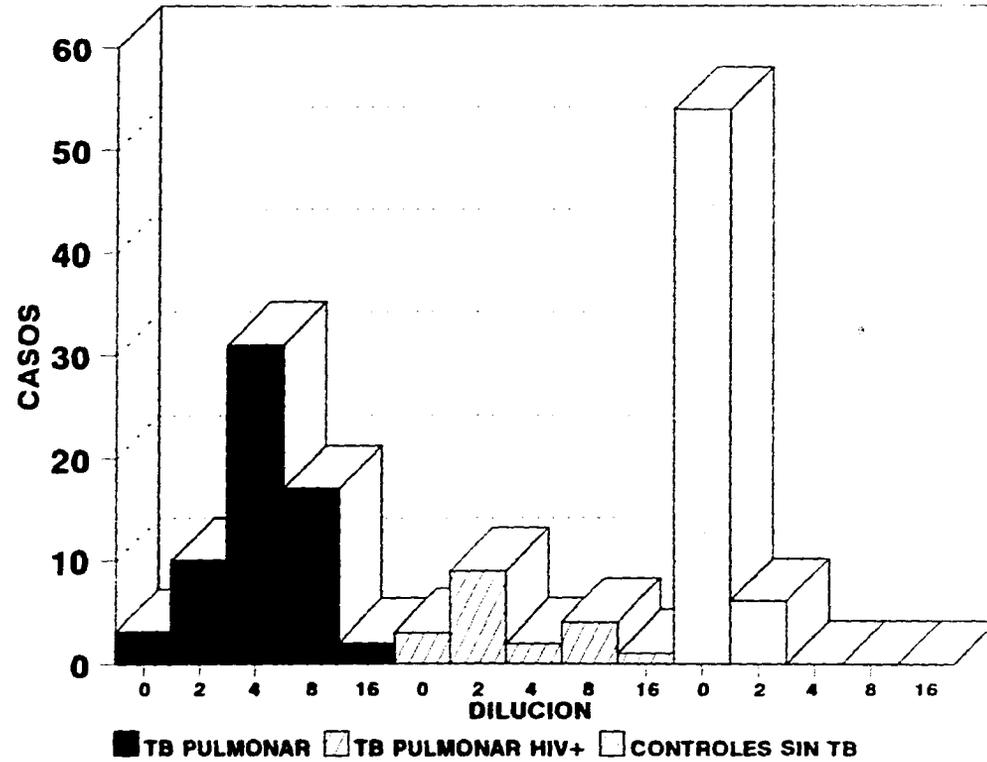
diferentes grupos de estudio, sólo 2 de los 10 pacientes con TB por *M. avium*, que habían mostrado resultados positivos sin dilución, continuaron con títulos positivos usando diluciones del suero 1:2.

En los casos con enfermedades diferentes a TB se encontraron sólo 6 muestras con resultados positivos usando el suero directo, pero ninguno fue positivo con diluciones 1:2 o mayores. Adicionalmente, ninguno de los controles normales mostraron pruebas positivas usando diluciones del suero 1:2 o superiores.

Para analizar en otra forma la utilidad de nuestro método de coagulación y su valor semicuantitativo, se tomaron como grupos representativos a los pacientes con TB pulmonar, a los casos con TB pulmonar con prueba HIV+ y a los sueros de los enfermos con padecimientos diferentes a TB pulmonar. Con ello se pudo observar que los resultados de la coagulación tenían un comportamiento que distinguía claramente a los pacientes con TB pulmonar de los controles sin esta enfermedad, siempre y cuando se usaran las muestras diluidas.

En la figura 2 se aprecia efectivamente que el grupo con TB pulmonar (grupo I) comparado con las muestras de TB pulmonar con prueba HIV+ (grupo II), y con los enfermos con otro tipo de padecimiento respiratorio, los pacientes con esta infección mostraban frecuentemente una prueba de coagulación positiva al emplear muestras del suero a diluciones de 1:4 o mayores; en cambio, esto nunca ocurrió en el grupo con enfermedades pulmonares diferentes a TB (grupo V).

FIGURA 2



Resultados mediante el método de dilución. Se aprecia que los grupos con TBP y TBP HIV+ muestran una prueba de coagulación positiva al emplear diluciones 1:4 o mayores

Resultados de LAM por la prueba de ELISA

La técnica de ELISA presentó datos que sostienen los hallazgos que resultaron por coaglutinación.

Para obtener el límite de corte se obtuvo la media +2 D.E. (0.376 de D.O.) de los 62 sueros controles obtenidos de los donadores sanos. Soló 3 de estos sueros del grupo control superaron este límite.

Tomando en cuenta estos datos, la prueba de ELISA para LAM fue positiva en el 92.06% de los pacientes con TB pulmonar en el 89.47% de los pacientes con TB pulmonar con HIV+ y en el 80% de los casos con M. avium. En las muestras sin TB con prueba HIV+ se encontraron resultados positivos en el 9.37% y en las enfermedades diferentes a TB se encontró un 8.33% de casos con pruebas positivas. Estos datos se muestran en la figura 3 y se comparan con los resultados obtenidos en las muestras controles.

El método de ELISA mostró una buena reproducibilidad, pues se encontró una variabilidad intraensayo del 8.53% e intraensayo del 10.06%. Encontramos 8 pruebas falsas positivas en los 122 controles, que incluyeron a 62 sujetos clínicamente sanos y a 60 pacientes con otra enfermedad diferente a TB pulmonar. En el grupo sin TB y prueba HIV+, no se documentó la presencia de TB por ningún otro método, y fué difícil establecer que el resultado positivo de LAM se debiera a otras infecciones por agentes oportunistas.

La especificidad de la prueba de ELISA fue del 95.19% y la sensibilidad fue del 92.06%. Por otro lado, la exactitud o precisión de la prueba de ELISA fue del 93%. El valor predictivo positivo y negativo fue del 96 y 92%

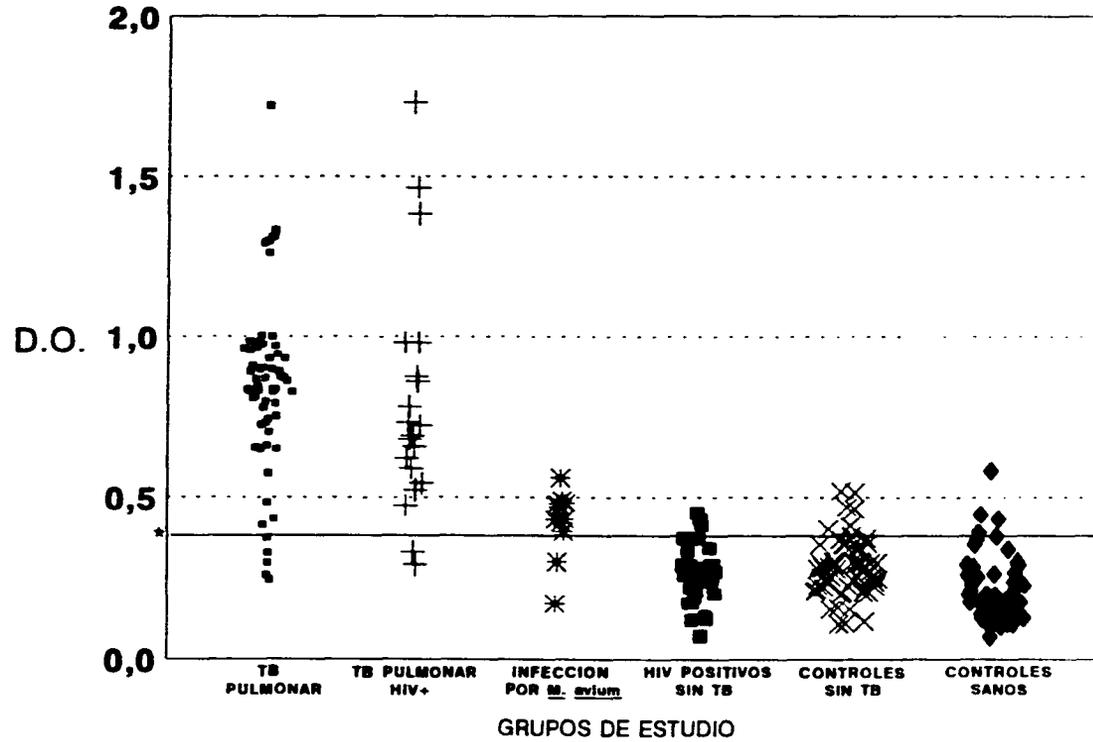
respectivamente. El análisis estadístico, reveló que los pacientes con TB pulmonar y los enfermos con esta enfermedad con prueba HIV+, diferían significativamente de los sueros normales ($p < 1 \times 10^{-6}$ por "t" de Student). En cambio, la comparación entre las muestras normales y los grupos controles, con prueba HIV+ y enfermedades pulmonares diferentes a TB, no mostraron diferencias significativas.

Relación entre los sistemas de coagulación y ELISA

Una vez que se tuvo la seguridad que el método de coagulación empleado era confiable y evaluaba semicuantitativamente la concentración de LAM, y que el método de ELISA detectaba eficientemente el LAM, se estableció un índice de D.O. (I.D.O.) dividiendo la lectura de los sueros problema sobre un estándar de concentración conocida de LAM (100 ng).

Con estos datos se analizó un grupo seleccionado de muestras con diferentes resultados de coagulación, variando entre aquéllas muestras con menos de 25 ng y sueros con resultados positivos en distintas diluciones (1:2, 1:4, 1:8), y se relacionaron con la D.O. de cada muestra. Los resultados mostraron, que a menor dilución del suero se obtuvo menor D.O. Con esto se validó el sistema de coagulación semicuantitativo, lo que permitió obtener un estándar para evaluar la concentración de LAM en base a un parámetro conocido, que puede ser empleado tanto para la realización en el sistema de coagulación, como en la prueba de ELISA.

FIGURA 3



Detección de LAM por la prueba de ELISA en los distintos grupos de estudio. Los resultados positivos superaron la media +2 D.E. de los controles sanos (Línea horizontal continua *)

Comparación entre las pruebas de coagulación y ELISA

Para establecer cuáles eran las diferencias entre la coagulación y una prueba de alta sensibilidad como la prueba de ELISA, se comparó la frecuencia de las muestras positivas de los diferentes grupos estudiados.

Como era de esperar, la prueba de ELISA resultó ser una técnica de mayor sensibilidad, encontrando con mayor frecuencia muestras de sueros positivas en los grupos con TB. Sin embargo, también se encontraron mayor número de pruebas falsas positivas en las muestras provenientes del grupo control.

La aglutinación y la prueba de ELISA demostraron gran similitud en cuanto a la sensibilidad y especificidad para la detección de LAM.

Por otro lado, la identificación de TB por M. avium fué ligeramente más frecuente mediante el ensayo de coagulación que con la prueba de ELISA. Los resultados falsos positivos, ocurrieron tanto con la aglutinación como con la prueba de ELISA, encontrando que al menos 6 de las 122 muestras del grupo control presentaron resultados de 25 ng.

Mediante la prueba de ELISA, 8 de los 122 sueros controles revelaron pruebas positivas para LAM. Al subdividir los sueros controles se observó que en las muestras de los controles sanos, sólo un suero resultó positivo por coagulación y 3 muestras fueron positivas por el método de ELISA. Estos resultados se anotan en el cuadro 7.

CUADRO 7. COMPARACION DEL PORCENTAJE DE RESULTADOS POSITIVOS
PARA LAM ENTRE COAGLUTINACION Y LA PRUEBA DE ELISA

PRUEBA	TBP	TBP	TB	HIV+	Dif. CONTROLES	
		HIV+	<u>M. avium</u>	s/TB	TB	SANOS
	n=63	n=19	n=10	n=32	n=60	n=62
	%					
Coaglutinación (25 ng)	95.2	84.2	100	12.5	10	1.6
ELISA (>media +2 DE)	92.0	87.4	80	9.3	8.3	0.05

**Aplicación de los sistemas de coaglutinación y ELISA
en otras muestras biológicas**

Durante la realización de este trabajo se tuvo la oportunidad de aplicar el sistema de coaglutinación y la prueba de ELISA para LAM en diferentes muestras biológicas de pacientes con TB, como lavado bronquialveolar, líquido cefalorraquídeo y orina.

Mediante el sistema de coaglutinación, 22 de los 27 pacientes con TB mostraron resultados positivos. Catorce de

ellos tenían pruebas positivas correspondientes a 25 ng de LAM, 6 muestras fueron positivas con un nivel de 50 ng y 2 con 100 ng. Solo 12 de 24 pacientes con alteración pulmonar diferente de TB mostraron coaglutinación positiva, observando que 10 de ellos tenían 25 ng y solo 2 presentaron 50 ng de LAM.

El análisis estadístico, comparando el total de muestras positivas a partir de 25 ng de LAM, así como con límites superiores a 50 ng, no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0.159$ y $p=5.75$, por la prueba de Fisher).

Al estudiar el LCR, sólo uno de los 6 pacientes tenían coaglutinación superior a 25 ng de LAM

Por la prueba de ELISA, 17 de los 27 LBA de pacientes con TB superaron la media de los controles, mientras que 7 excedieron la media +2 D.E. Tres de las 6 muestras de LCR de pacientes con TB tuvieron lecturas superiores a la media +2 D.E. de los sueros controles, que en este caso fué el límite de corte considerado, al no contar con muestras controles de LCR. En el cuadro 8 se comparan los resultados obtenidos al estudiar las muestras de LBA y LCR mediante los sistemas de coaglutinación y ELISA.

La comparación de ambos métodos demostró además, que del total de 7 casos de LBA con coaglutinación positiva, los 7 presentaron prueba de ELISA positiva. Fue interesante que un paciente con TB, en quien se estudió el suero y la orina, mostró pruebas de coaglutinación y ELISA positivas en ambos especímenes.

CUADRO 8. UTILIDAD DE LA DETERMINACION DE LAM EN OTRAS
MUESTRAS BIOLÓGICAS

METODO	PRUEBA POSITIVA DE LAM		
	TB (n=27)	L B A	LCR
		sin TB (n=24)	(n=6)
Coaglutinación	8*	2**	1
ELISA	7***	1	3****

* Seis muestras positivas con 50 ng, 2 con 100 ng

** Dos muestras positivas con 50 ng

*** Superiores a la media +2 D.E. de los LBA controles

**** Superiores a la media +2 D.E. de los sueros controles

DISCUSION

La TB es una enfermedad altamente prevalente y constituye un problema epidemiológico importante, principalmente en los países del tercer mundo. En nuestro medio es una de las causas más frecuente de morbilidad y mortalidad (17,23,45).

Una de las formas más comunes de esta enfermedad es la infección localizada a nivel pulmonar y con menor frecuencia se pueden encontrar la TB meníngea, TB renal o la infección localizada en otros sitios, como el sistema músculo esquelético (15,61).

A pesar de que los estudios epidemiológicos no son del todo completos en México, se ha estimado que la tasa de casos conocidos de TB en nuestro medio fluctúa entre 16 a 19 por cada 100,000 habitantes y las cifras más recientes de la incidencia en nuestro país se ha calculado en 12.7 casos por cada 100,000 habitantes (38,72). Esto sustenta la enorme importancia que tiene este problema de salud en nuestra población (1,23,35,45).

La frecuencia de la TB se encuentra claramente relacionada con factores de riesgo que promueven su aparición. Las condiciones socioeconómicas y enfermedades concomitantes, especialmente aquéllas que favorecen la inmunosupresión, están claramente asociadas con el desarrollo o reactivación de esta infección y particularmente con la TB que afecta las vías respiratorias. Además, la aparición reciente de otros procesos como el SIDA, ha exaltado la importancia de ésta y otras enfermedades infecciosas en pacientes inmunocomprometidos (3,71).

Desde el descubrimiento del agente etiológico se ha hecho evidente el afán de contar con pruebas altamente sensibles y específicas para el diagnóstico de TB, y este objetivo sigue siendo en la actualidad de alta prioridad, tanto en el laboratorio clínico, como en diversas áreas de investigación (9,11,13,48).

El diagnóstico de TB, como el de otras enfermedades infecciosas, se basa tradicionalmente en el cultivo del agente etiológico. Sin embargo, las técnicas bacteriológicas presentan una serie de desventajas, cuando los microorganismos son de lento desarrollo como M. tuberculosis, requiriendo de tiempo prolongado para su cultivo. Esto puede explicar que en ocasiones los resultados pueden ser de poca utilidad en pacientes con sospecha de infección y, especialmente en aquéllos que no presentan expectoración, o al intentar estudiar otras muestras biológicas o fluidos corporales difíciles de obtener (13,69).

La detección de TB mediante estudios bacteriológicos requiere de laboratorios especiales y costosos. El procesamiento de las muestras, el aislamiento de M. tuberculosis y su identificación, se realizan en áreas especializadas con medidas de alta seguridad en el manejo de estos agentes infecciosos altamente patógenos. Los recursos humanos son especializados y el laboratorio cuenta generalmente con equipo sofisticado.

Por otro lado, otros métodos de identificación como la búsqueda de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), no siempre son aplicables en todos los casos con TB y en algunas condiciones han mostrado un alto porcentaje de

pruebas falsas positivas o falsas negativas (31,61).

A partir de los estudios sobre la respuesta inmune y su relación con las enfermedades infecciosas, se encontró una reactividad humoral contra M. tuberculosis y la formación de anticuerpos contra diferentes componentes de este agente infeccioso, así como un estado de hipersensibilidad celular que producía esta infección (2,19,41). Esto se logró poner de manifiesto al demostrar anticuerpos específicos contra M. tuberculosis y mediante la aplicación de la tuberculina por vía intradérmica (15,39).

El avance de estos conocimientos, dió como resultado, que cada vez con mayor frecuencia se emplearan otros métodos de detección indirectos, especialmente de tipo inmunológico.

La mayoría de los ensayos actuales se basan en la reacción antígeno-anticuerpo, que generalmente involucra la unión de anticuerpos específicos con diversos antígenos micobacterianos presentes en las muestras biológicas de los pacientes con TB.

Durante la última década se ha ampliado la posibilidad de detectar a pacientes con TB, mediante la implementación de una gran variedad de estudios serológicos. Esto se logró mediante la identificación de anticuerpos, o el estudio de los antígenos de M. tuberculosis, y para esto fué necesario contar con el desarrollo de métodos de alta sensibilidad y especificidad, como las pruebas de aglutinación, CIE, RIA y ELISA entre otras (22,30,63).

La utilidad de la aglutinación, se ha puesto de manifiesto en diversos estudios que han enfatizado la

utilización de distintos soportes, permitiendo obtener ensayos o técnicas de alta sensibilidad y especificidad. Algunos de estos soportes como el látex, bentonita y sepharosa tienen la ventaja de ser inertes y relativamente estables, una vez que se les ha acoplado un anticuerpo (4). Esto ha ofrecido distintas ventajas como la interpretación fácil y reproducible a simple vista, al utilizar técnicas en las que la reacción de fijación es fácilmente demostrable y los resultados pueden ser semicuantitativos (50,51).

El empleo de soportes biológicos como los eritrocitos de carnero y de otras especies, y desde luego la cepa Cowan-I de *S. aureus*, del cual deriva el nombre de coagulación, han sido muy útiles en la implementación de técnicas inmunológicas, con las que se han obtenido resultados equiparables a aquéllos en las que se emplean soportes inertes.

Los eritrocitos de carnero pueden ser sensibilizados con antígenos de diferente naturaleza mediante el uso de ácido tánico, o cloruro de cromo, debiendo establecer las condiciones subaglutinantes para estandarizar la técnica. En el caso de la cepa Cowan-I de *S. aureus*, es importante usar anticuerpos que tengan suficiente afinidad por la proteína A, como las inmunoglobulinas de la clase IgG (IgG₁ e IgG₂) y tiene la ventaja de que la falta de unión con otro tipo de antígenos como polisacáridos, carbohidratos y otras moléculas, evita la interferencia en la reacción de aglutinación.

En este trabajo se logró implementar una técnica de coagulación de bajo costo y alta sensibilidad y especificidad haciendo uso de la propiedad del SAC-I de

unirse en forma no covalente con la porción Fc de las inmunoglobulinas de la clase IgG. Esto permitió detectar la presencia del antígeno LAM usando un procedimiento sencillo en el que se sensibilizó la cepa Cowan-I de S. aureus y una dosis subaglutinante de anticuerpos policlonales obtenidos en conejos.

Los resultados de esta técnica se detectaron mediante una reacción macroscópica de aglutinación. Además, tiene la ventaja de utilizar sueros precipitados y tratados con EDTA evitando la interferencia de otros componentes de la muestra biológica. La lectura e interpretación resultaron fáciles de realizar y se logró contar con una prueba semicuantitativa, al emplear una curva de referencia con el antígeno LAM puro.

También se evitaron algunos problemas que se presentan en otras pruebas como la CIE, ELISA o RIA, incluyendo su alto costo, la dificultad de manejo del material radiactivo y las posibles interferencias, al usar una muestra de suero total.

El método empleado se comparó con una técnica de alta sensibilidad como la prueba de ELISA, encontrando que la sensibilidad y especificidad pueden ser equivalentes. Además, la comparación con una prueba inmunoenzimática, mostró que la coaglutinación es un método a partir del cual se puede iniciar la estandarización de otras técnicas como el propio sistema de ELISA, el RIA o la quimioluminiscencia, permitiendo la detección de concentraciones muy bajas de antígenos de M. tuberculosis.

El uso de la prueba de ELISA también nos permitió encontrar resultados similares a los de la coaglutinación,

lo que sostiene que ésta última, constituye un método útil, con ciertas ventajas sobre la prueba de ELISA o pruebas comparables como el RIA (12,20,49,54). En la coaglutinación no se requiere de placas de poliestireno ni de antígenos o anticuerpos marcados. Además, el sistema de lectura es simple y reproducible. La prueba permitió detectar límites de nanogramos del antígeno LAM y usar una pequeña cantidad de la muestra problema, en forma similar a la prueba de ELISA. Por otra parte, la estabilidad de los reactantes biológicos empleados en la coaglutinación es adecuada, particularmente si se pretenden conservar por periodos prolongados.

En cuanto a la reacción cruzada con antígenos de otros agentes infecciosos o con micobacterias diferentes al bacilo tuberculoso, se observó que el método de coaglutinación fue positivo en un pequeño número de casos con infección por *M. avium*, sin embargo, el conjunto de las características clínicas, radiográficas y patológicas pueden ayudar a definir el diagnóstico preciso y las diferencias entre estas enfermedades. Por otra parte, la técnica aquí propuesta identificó antígenos de micobacteria específicos, como LAM, pero su empleo es factible en otros sistemas antígeno-anticuerpos, siempre que se cuente con antígenos purificados apropiados, que permitan obtener una curva de concentración y controles positivos.

El empleo de la cepa Cowan-I de *S. aureus* en nuestro sistema puede equipararse a otros ensayos biológicos en los que se emplea este acarreador, como en las pruebas de complejos inmunes, la identificación del factor reumatoide y el uso de adsorbentes para la captura de antígenos. En

forma interesante, su empleo en sistemas de inhibición, así como en la preparación de columnas de afinidad para la purificación de anticuerpos, siguen siendo igualmente útiles.

Uno de los aspectos más relevantes del procedimiento de coaglutinación fue que, en combinación con un proceso de precipitación, permite el empleo de muestras biológicas, sin el inconveniente de interferencias que ocurren tradicionalmente con sueros lipémicos, o por la presencia de factor reumatoide, hipergammaglobulinemia, etc.

Adicionalmente, la coaglutinación permitió eliminar algunos de los problemas que presentan la mayoría de los ensayos inmunoenzimáticos, o radiométricos de tipo inmunológico que generalmente involucran la unión de anticuerpos marcados, como el uso de numerosos isótopos radioactivos que pueden utilizarse para este tipo de ensayos. En el caso del RIA se emplean I^{131} , S^{32} y en las técnicas de quimioluminiscencia se usan moléculas que emiten luz. Sin embargo, estos métodos tienen como desventajas una vida media limitada de algunos isótopos, o la dificultad para obtener los reactivos de quimioluminiscencia. Por otra parte, en dichas pruebas se requiere generalmente de equipo sofisticado y existe el riesgo de que el personal esté expuesto al material radiactivo.

En cuanto al significado clínico, se apreció que el método de coaglutinación fue sumamente útil para el diagnóstico de diferentes grupos de pacientes con TB, incluyendo el grupo de alto riesgo con SIDA (6,7,47,56,67).

Por lo general, el diagnóstico de TB es clínico, y en no pocas ocasiones erróneo si no se cuenta con datos de

apoyo mediante estudios de laboratorio. El cultivo de M. tuberculosis, la baciloscopia y la determinación de anticuerpos contra los productos de este agente infeccioso no han sido desplazados, sin embargo, cada vez con mayor frecuencia se prefieren identificar antígenos específicos que permitan definir con certeza la etiología y la fase clínica en la que se encuentran estos enfermos.

El empleo de la técnica de coagulación para la detección de LAM, puede facilitar la detección de los pacientes en forma oportuna, así como aplicar este método de diagnóstico en otras muestras biológicas, como el lavado bronquioalveolar, líquido cefalorraquídeo y orina. Todo esto, en conjunto, aportará junto con otras medidas de salud pública, un control más adecuado de la TB y posiblemente de las complicaciones por esta entidad, que presentan otros pacientes de alto riesgo (6).

Este apoyo de laboratorio puede favorecer el tratamiento temprano, y evitar la perpetuación de importantes focos de infección de TB en los casos no detectados. También puede eliminar el retardo en el diagnóstico, que conlleva a una alta mortalidad en algunos enfermos, como los niños con meningitis tuberculosa en los que la falta de un diagnóstico definitivo y tratamiento oportuno puede resultar en una alta mortalidad (25).

Para enfatizar la relevancia que tiene la identificación de los antígenos micobacterianos, debemos señalar que la detección de numerosos antígenos específicos de M. leprae y de M. tuberculosis, han permitido en los últimos años, contar con pruebas con alta especificidad para el diagnóstico de estas enfermedades. Esta utilidad se ha

extendido en estudios epidemiológicos y a grupos de población abierta y de alto riesgo.

De los antígenos que han demostrado poseer gran importancia en la caracterización serológica de la TB destaca el lipofosfolipolísacárido denominado LAM. Este componente, se encuentra en la pared de M. tuberculosis, lo cual lo hace accesible al contacto con la respuesta inmune del paciente. Además, recientemente se ha encontrado que es uno de los factores de virulencia de M. tuberculosis, lo que le confiere un posible papel patogénico.

Por todo lo anterior, es posible que el nivel antigénico, pueda mostrar diferencias entre los grupos con TB pulmonar, como se aprecia en los resultados, ya que el mayor título de LAM se obtuvo en los pacientes con TB activa, en comparación con la enfermedad en remisión. La observación de que la TB miliar presentó diferentes niveles de antígeno que el resto de los pacientes con TB sostiene esta hipótesis.

Además, estos datos pueden tener una explicación biológica, si tomamos en cuenta que estudios recientes han mostrado, que entre los factores de virulencia se puede incluir el LAM, componente que podría estar incrementado en la fase aguda de la TB pulmonar y que parece inhibir la función efectora de los macrófagos abatiendo su respuesta a interferón y disminuyendo la producción de metabolitos derivados del oxígeno durante la infección por M. tuberculosis (57). Estos efectos de LAM pueden coexistir con otros mecanismos de evasión y favorecer la generación de daño tisular en los pacientes con TB.

Un aspecto de aplicación clínica futura podría ser

también la vigilancia del tratamiento, ya que los niveles de los antígenos de M. tuberculosis, podrían mostrar cuáles pacientes responden eficientemente al tratamiento.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

La TB es un importante problema de salud en México y su diagnóstico en el laboratorio requiere de pruebas sensibles y específicas, accesibles a todos los laboratorios clínicos.

El sistema de coagulación mostró ser una prueba de bajo costo, fácil de realizar y cuya lectura no requiere de instrumentos o sistemas complicados.

El ensayo con SAC-I tiene una alta sensibilidad y especificidad y es altamente reproducible.

Este método permite identificar el antígeno LAM en muestras de pacientes con TB y cuantificarlo mediante la comparación con concentraciones conocidas de LAM puro.

La precipitación de las muestras de suero es un paso relativamente simple y evita posibles interferencias que pueden encontrarse al emplear suero total en otros métodos.

Este tipo de ensayos pueden emplearse para fines epidemiológicos y de diagnóstico en TB.

La aplicación de este tipo de ensayos de coagulación puede ser útil, no sólo en TB, sino en la detección de antígenos bacterianos de otro tipo.

El estudio de LAM en muestras biológicas, como lavado bronquioalveolar, líquido cefalorraquídeo, fluido articular y orina, puede ser de gran utilidad en el diagnóstico de algunos tipos de TB extrapulmonar.

La identificación de los niveles de LAM puede ayudar a definir la fase de actividad de la enfermedad, ya que se ha detectado que este compuesto es uno de los factores de virulencia de M. tuberculosis.

ANEXOS**Anexo 1****Preparación de soluciones**

1. Solución amortiguadora de carbonatos (0.05 M, pH 9.6)

Na₂CO₃1.59 g
 NaHCO₃2.93 g

Disolver en agua destilada y ajustar el pH antes de aforar a 1 lt. Conservar a 4°C.

2. Solución amortiguadora de citratos (0.1 M, pH 5.0)

C₆H₅Na₃O₇.....29.4 g

Disolver en agua destilada y ajustar el pH con ácido fosfórico antes de aforar a 1 lt. Conservar a 4°C

3. Solución amortiguadora de fosfatos-salina (0.1 M, pH 7.2)

Solución A (0.2 M)

NaH₂PO₄.H₂O...27.6 g

Solución B (0.2 M)

Na₂HPO₄ anhidro28.4 g

Disolver cada una de las sales en agua destilada y aforar a 1 lt.

Mezclar:

Solución A.....165 ml.

Solución B.....335 ml.

NaCl.....74 g.

Agregar agua destilada y ajustar el pH con NaOH concentrado antes de aforar a 1 lt. Conservar a TA.

4. Solución amortiguadora de fosfatos-salina (0.01, pH 7.2)

Hacer una dilución 1:10 de la solución anterior con agua destilada y ajustar el pH. Conservar a 4°C.

5. Solución amortiguadora de fosfatos-salina con Tween-20 al 0.05 %.

Tomar 100 ml de la solución 3 y adicionar agua destilada, posteriormente agregar 500 µl de Tween-20 y aforar a 1 lt, ajustando antes el pH a 7.2. Conservar a 4°C.

6. Acido sulfúrico 2.5 N.

H₂SO₄ conc.....13.3 ml

Adicionar lentamente en agua destilada y aforar a

100 ml. Conservar a 4°C.

7. Solución amortiguadora de glicina-HCl (0.1 M, pH 2.8)

$C_2H_5NO_2$ 7.5 g

Disolver en agua destilada y ajustar el pH con HCl antes de aforar a 1 lt. Conservar a 4°C.

8. Solución de tris (1.5 M, pH 8.0)

Tris
(hidroxi-metil) amino
metano.....45.4 g

Disolver en agua destilada y ajustar el pH antes de aforar a 250 ml. Conservarlo a 4°C.

9. Sustrato de peroxidasa con O-fenilendiamina

$C_6H_8N_2$4 mg
 H_2O_25 μ l

Amortiguador
de citratos.....10 ml

10. Solución amortiguadora de bicarbonatos (0.1 M, pH 8.0)

$NaHCO_3$8.4 g

Disolver en agua destilada y ajustar el pH antes de aforar a 1 lt. Conservar a 4°C.

11. Solución de fenol 10%

C_6H_5OH 10 g

Disolver en agua destilada llevando a 100 ml.

12. Solución PBS-formaldehído 5%

Formaldehído

(CH_2O) solución.....37 %

Se disuelven 1.35 ml de formaldehído y se aforan a 10 ml de PBS (0.01 M, pH 7.2)

13. EDTA disódico 0.1 M

$C_{10}H_8N_2O_{10}Na_2 \cdot 2H_2O$40.82 g

Disolver en agua destilada, aforando posteriormente a 1 lt.

14. Soluciones para determinación de proteínas

Solución A

50 ml de Na_2CO_3 en NaOH 0.1N
0.5 ml de tartrato de Na y K al 2%

Solución B
Reactivo de Folin-Ciocalteua 1:2

Estándar de Proteínas.
Albumina Sérica
Bovina (BSA).....100 $\mu\text{g/ml}$

Anexo 2

Métodos y fundamentos

Conjugación de anticuerpos a biotina

Diversas proteínas y otras moléculas, como los anticuerpos, pueden ser marcados con diferentes sustancias radiactivas o enzimáticas, con el objeto de determinar la presencia de los antígenos contra los cuales están dirigidos.

Para proceder con el marcaje se toman en cuenta las características fisicoquímicas tanto de la proteína, como de los reactantes empleados en este método de marcaje.

En el caso de la conjugación enzimática, ésta se lleva a cabo mediante la interacción de la porción amino terminal con un grupo carboxilo de la biotina, formando una unión covalente.

La conjugación de los anticuerpos anti-LAM obtenidos previamente mediante la inmunización en conejos se realizó de la siguiente manera:

La concentración de proteínas del anticuerpo anti-LAM seleccionado para su marcaje se ajustó a 1 mg/ml con PBS (0.01 M, pH 7.2) y se sometió a diálisis contra una solución amortiguadora de NaHCO_3 (0.1 M, pH 8.0) durante toda la noche a 4°C.

Posteriormente se pesó 1 mg de N-hidroxisuccinimido éster de biotina (Sigma Co, USA), el cual se disolvió en 1 ml de dimetil sulfóxido (DMSO). Para realizar la conjugación se adicionaron 200 μl de la mezcla de biotina-DMSO por cada ml de la solución proteica conteniendo el anticuerpo anti-LAM y se dejó reaccionar durante 4 hrs a TA con agitación esporádica y suave.

La mezcla preparada se dializó contra PBS (0.01 M, pH 7.2) durante toda la noche a 4°C, haciendo varios cambios de PBS. El anticuerpo conjugado con esta coenzima se congeló en alícuotas pequeñas hasta utilizarse.

Método de Lowry

Este método es uno de los más ampliamente utilizados para la determinación de proteínas.

Su realización se basa en la interacción inicial de la proteína con los iones de Cu^{++} en un medio alcalino. Esta reacción inicial forma un complejo inestable, y una reducción posterior de los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico a azul de tungsteno y azul de molibdeno, respectivamente.

En esta técnica, la reducción resultante es debida a la acción del complejo proteína- Cu^{++} que se generó inicialmente, lo que resulta en una reacción colorida, cuya lectura se debe realizar mediante un colorímetro.

Para llevar a cabo la determinación de proteínas se prepararon previamente las soluciones necesarias y se realizó una curva de calibración comparativa, empleando BSA comercial, como se anota a continuación:

Soluciones:

Solución A

Solución B

Estándar de proteínas

ASB 100 $\mu\text{g/ml}$

No. de tubo	Curva de calibración						
	1	2	3	4	5	6	7
Condición	_____ ml _____						
Estándar de proteínas	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	
Agua destilada	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.0	
Sol. A (3 ml)	_____						
Se mezclan los tubos y se deja reaccionar durante 10 min, a TA							
Sol. B (0.3ml)	_____						

Los tubos se agitan y se dejan reaccionar durante 1 h a TA y se leen en un colorímetro a 500 nm.

Prueba de ELISA

Este método inmunoenzimático, se basa en el empleo de un soporte generalmente en fase sólida, al cual se pueden acoplar antígenos o anticuerpos, optimizando esta unión con una solución de pH alcalino.

La identificación de la reacción se logra al emplear un marcaje de antígenos o anticuerpos con enzimas. De esta forma, un anticuerpo es capaz de captar un antígeno específico presente en un suero problema, que a su vez podrá reaccionar con un segundo anticuerpo marcado enzimáticamente.

En este trabajo se utilizó una fase sólida de poliestireno, a la cual se unió un anticuerpo de conejo anti-LAM, lo que permitió captar el antígeno de interés, a partir de una muestra de suero. La reacción permitió detectar este antígeno de la pared celular de M. tuberculosis. Esta reacción antígeno-anticuerpo se evidenció a través de un ensayo enzimático, utilizando un segundo anticuerpo anti-LAM marcado con peroxidasa.

Aglutinación

Esta técnica se basa en una reacción antígeno anticuerpo que es perceptible macroscópicamente.

Cuando se enfrentan antígenos formes previamente inmovilizados en soportes inertes o biológicos, con sus respectivos anticuerpos, se obtiene una reacción inmunológica que es perceptible a simple vista, en forma de acúmulos. Los soportes que se pueden emplear incluyen eritrocitos, sepharosa, látex, bentonita y bacterias.

Las reacciones de aglutinación tienen un gran número

de aplicaciones, especialmente en el diagnóstico clínico. El empleo de antígenos conocidos o sueros específicos permite investigar y cuantificar los anticuerpos o la presencia de antígenos en el suero de pacientes con diversos tipos de enfermedades.

Estas reacciones pueden realizarse en placa o en tubo, siendo este último el método más sensible. La técnica en placa es el más sencillo en su ejecución y los resultados se obtienen en un máximo de cinco minutos.

Cromatografía de afinidad

Los métodos de cromatografía son sumamente útiles en la separación y purificación de proteínas y se pueden clasificar dentro de las técnicas inmunespecíficas.

La unión de un antígeno o un anticuerpo a un soporte inerte, permite separar un determinado tipo de antígenos o anticuerpos complementarios a partir de un extracto antigénico crudo o del suero o plasma total. Para la separación y purificación del antígeno, se acoplan al soporte los anticuerpos respectivos mediante una reacción previa con bromuro de cianógeno. Una vez que se ha captado el antígeno específico, se puede separar mediante un cambio del pH.

Para la purificación específica de los anticuerpos mediante la cromatografía de afinidad, es necesario optimizar las reacciones antígeno-anticuerpo o su unión específica, y conocer las propiedades fisicoquímicas de los diferentes tipos de anticuerpos.

La columna de sepharosa 4B con proteína A permite la separación de anticuerpos de tipo IgG, debido a la afinidad

de la porción Fc por esta proteína.

La purificación de los anticuerpos anti-LAM y del propio antígeno, en este estudio se logró basándose en la reacción antígeno-anticuerpo que se llevó a cabo entre los anticuerpos contra M. tuberculosis y la proteína A, así como entre los antígenos de la pared bacteriana y los anticuerpos respectivos captados del suero hiperinmune.

Reacción de precipitación

Cuando se utilizan antígenos en solución, como lisados bacterianos o extractos totales y se ponen en contacto con sus anticuerpos respectivos, se forman reacciones de precipitación.

Esta propiedad tiene muchas aplicaciones para la investigación de las características de la interacción de los antígenos con sus anticuerpos específicos. En las reacciones de precipitación es necesaria siempre la presencia de un electrolito con el objeto de disminuir las cargas electrostáticas y facilitar así la reacción.

Anexo 3

Contenido de cuadros, gráficas y figuras

Cuadro 1. Sensibilidad y especificidad entre diversos métodos de laboratorio en la determinación de Mycobacterium tuberculosis usando diferentes muestras biológicas.

Cuadro 2. Esquema de la realización de la coaglutinación e interpretación semicuantitativa usando una curva con diferentes concentraciones de LAM puro.

Cuadro 3. Detección de LAM mediante anticuerpos

específicos generados en conejos y purificados mediante columna de afinidad.

Cuadro 4. Resultados del método de separación del suero hiperinmune anti-LAM, mediante columna de afinidad con proteína A.

Cuadro 5. Resultados de la coaglutinación con antígeno puro empleando anticuerpos anti-LAM obtenidos en conejos.

Cuadro 6. Resultados de coaglutinación de acuerdo a un método semicuantitativo en los diferentes grupos de estudio.

Cuadro 7. Comparación del porcentaje de resultados positivos para LAM entre coaglutinación y la prueba de ELISA.

Cuadro 8. Utilidad de la determinación de LAM en otras muestras biológicas.

Gráfica 1. Anticuerpos anti-LAM con antígeno puro. Sistema de detección con anticuerpo específicos anti-IgG.

Gráfica 2. Patrón de corrimiento de cuatro muestras representativas obtenidas mediante cromatografía de afinidad con proteína A.

Figura 1. Comparación de los resultados de coaglutinación usando sueros diluidos de los diferentes grupos de pacientes. Se aprecia una clara separación entre el grupo con TBP y los controles.

Figura 2. Resultados mediante el método de dilución. Se aprecia que los grupos con TBP y TBP-HIV+ muestran una prueba de coaglutinación positiva al emplear diluciones de 1:4 o mayores.

Figura 3. Detección de LAM por la prueba de ELISA en

los distintos grupos de estudio. Los resultados positivos superaron la media $+2$ D.E. de los controles sanos (línea horizontal continua *).

BIBLIOGRAFIA

1. Allen, EA. Global view of tuberculosis. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Méx. 3/51-54 1990
2. Andrade, AR., Machado, VI., Fernández, B., Ramírez, R. Cellular immunity in current active pulmonary tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis. 143/496-500 1991
3. Barnes, PF., Bloch, AB., Davidson, PT., Snider, DE. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. N. Engl. J. Med. 324/1644-1650 1991
4. Boyle, M. Applications of bacterial Fc receptors in immunotechnology. Biotechniques 2/334-340 1984
5. Brennan, P. Structure of mycobacteria. Recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. Rev. Infec. Dis. 11/420-430 1989
6. Centers for Diseases Control Diagnosis and management of mycobacterial infections in persons with human immunodeficiency syndrome. Ann. Intern. Med. 106/254-256 1987
7. Chaisson, RE., Schechter, GF., Thever, CP., Rutherford, GW., Echenberg, DF., Hopewell, PC. Tuberculosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome; clinical features, response to therapy, and survival. Am. Rev. Respir. Dis. 136/570-574 1987
8. Chan, J., Xuedong, F., Hunter, SW., Brennan, PJ., Bloom, BR. Lipoarabinomannan a possible virulence factor involved in persistence of Mycobacterium tuberculosis within macrophages. Infect. Immunity. 59/1755-1761 1991
9. Chan, SL., Reggiardo, Z., Daniel, TM., Girling, DJ., Mitchison, DA. Serodiagnosis of tuberculosis using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with antigen 5 and

a hemagglutination assay with glycolipid antigens. Results in patients with newly diagnosed pulmonary tuberculosis ranging in extent of disease from minimal to extensive. Am. Rev. Respir. Dis. 142/385-390 1990

10. Daffe, M., Brennan, P.J., Mc Neils, M. Predominant structural features of the cell wall arabinogalactan of Mycobacterium tuberculosis as revealed through characterization of oligoglycosyl alditol fragments by gas chromatography/mass spectrometry and by ^1H and ^{13}C NMR analysis. J. Biol. Chem. 265/6734-6743 1990

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

12. Daniel, T.M. New approaches to the rapid diagnosis of tuberculosis meningitis. J. Infec. Dis. 55/599-602 1987

13. Daniel, T.M. Rapid diagnosis of tuberculosis laboratory techniques applicable in developing countries. Rev. Inf. Dis. 11/471-478 1982

14. Daniel, T.M. The purification of mycobacterial polysaccharides with concanavalin A. Am. Rev. Respir. Dis. 110/634-640 1974

15. Daniel, T.M.

HARRISON'S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE

12th Edition

Vol. I

MacGraw-Hill

Estados Unidos de Norteamérica (1991)/637-645

16. Dawson-Saunders, B., Trapp, R.G.

BIOESTADISTICA MEDICA

Editorial El Manual Moderno

México (1993)/265-282

17. Des-Prez, RG., Heim, CR.

ENFERMEDADES INFECCIOSAS

3th Edición

Vol. I

Editorial Médica Panamericana

Argentina (1991)/1986-2017

18. Doskeland, S., Bernal, BP. Bacterial antigen detection in body fluids: Methods for rapid antigen concentration and reduction of nonspecific reactions. J. Clin. Microbiol. 11/380-384 1980

19. Dunlap, NE., Briles, DE. Immunology of tuberculosis. Med. Clin. North. Amer. 77/1235-1252 1993

20. Edward, EA., Larson, GL. New method of grouping β -hemolytic Streptococcus directly on sheep blood agar plates by coagglutination of specifically sensitized protein A containing Staphylococci. Appl. Microb. 28/972-976 1974

21. Edwards, D., Krikpatrick, CH. The immunology of mycobacterial diseases. Am. Rev. Respir. Dis. 134/1062-1071 1986

22. Engval, E. Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. Method. Enzymol. 70/419-439 1980

23. Fernández de Castro J. Tuberculosis, perspectivas en México. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Méx. 3/55-61 1990

24. Forsgren, A., Sjöquist, J. Protein A from S. aureus, pseudoimmune reaction with human-gamma globulin. J.

Immunol. 97/822-827 1966

25. Glicksman, R., Brickner, PW., Edwards, D.
Tuberculosis screening and treatment of New York City
homeless people. Ann. N.Y. Acad. Sci. 435/419-421 1984

26. Grzybowski, S. Cost in tuberculosis control.
Tubercle. 68/33-37 1987

27. Harlow, ED., Lane, D.

ANTIBODIES. A LABORATORY MANUAL

Cold Spring Harbor Laboratory

Estados Unidos de Norteamérica, New York (1988)/

613-635

28. Hunter, S., Gaylord, H., Brennan, PJ. Structure
and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide
antigens from the leprosy and tubercle bacilli. J. Biol.
Chem. 261/12345-12351 1986

29. Jawetz, E., Melnick, JL., Adelberg, E.

MICROBIOLOGIA MEDICA

14th Edición

Editorial El Manual Moderno

México (1992)/289-297

30. Kardival, GV., Samuel, A., Mazarello, TBMS.,
Chaparas, S. Radioimmunoassay for detecting M. tuberculosis
antigen in cerebrospinal fluids of patients with
tuberculosis meningitis. J. Inf. Dis. 155/608-611 1987

31. Kim, T., Blackman, R., Heatwole, KM. Acid fast
bacilli in sputum smears of patients with pulmonary
tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis. 129/264-268 1984

32. Krambovitis, E., Mc Murray, MB., Lock, PE.,
Hendrickse WH. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by
latex particle agglutination. Lancet. 2/1229-1231 1984

33. Kramer, F., Modilevsky, T., Walianny, AR., Leedom, JM., Barnes, PF. Delayed diagnosis of tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. Am. J. Med. 89/451-456 1990

34. Kricka, LJ.

TIETZ TEXTBOOK OF CLINICAL CHEMISTRY

2th Edition

W.B. Saunders

Estados Unidos de Norteamérica (1994)/238-312

35. Kumate, J., Gutiérrez, G., Santos, JI., Muñoz, O.

MANUAL DE INFECTOLOGIA

13th Edición

Méndez Editores

México (1992)/221-224

36. Levis, WR., Meeker, HC., Schuller, LG., Sersen, E., Brennan, PJ., Fried, P. Mycobacterial carbohydrate antigens for serological testing of patients with leprosy. J. Infect. Dis. 156/763-769 1987

37. Mac Gregor, RR.

TRATADO DE NEUMOLOGIA

2th Edición

Ediciones Doyma

España, Barcelona (1991)/1732-1748

38. Manual de Normas y Procedimientos para la Prevención y Control de la Tuberculosis. Sistema Nacional de Salud, México, 1991

39. Mayer, BG. Immunoreactive substances of mycobacteria. Am. Rev. Resp. Dis. 142/725-735 1990

40. Misaki, A., Azuma, I., Yamamura, Y. Structural

and immunochemical studies on D-arabino-D-mannans and D-mannans of Mycobacterium tuberculosis and other Mycobacterium species. J. Biochem. 82/1759-1770 1977

41. Oftung, F. Human T cell clones recognize two abundant M. tuberculosis protein antigens. J. Immunol. Am. Assoc. 138/927-931 1987

42. Pérez-Tamayo, R.

INTRODUCCION A LA PATOLOGIA

2th Edición

Editorial Panamericana

México (1987)/281-284

43. Pharmacia Fine Chemicals.

PROTEIN A SEPHAROSE CL4B FOR CELL SURFACE AND IMMUNOGLOBULIN STUDIES. MANUAL

Pharmacia Fine Chemicals

Estados Unidos de Norteamérica (1985)

44. Pio, A. Impact of present control methods on the problem of tuberculosis. Rev. Inf. Dis. 2/360-365 1989

45. Registro Nacional de Casos de Tuberculosis DGE/SSA enero, 1989

46. Rieder, HL., Cauthen, GM., Comstock, GW., Snider, DE. Epidemiology of tuberculosis in the United States. Epidemiol. Rev. 11/79-98 1989

47. Rieder, HL., Snider, G. Jr. Tuberculosis and the acquired immunodeficiency syndrome. Chest. 90/469-470 1986

48. Roberts, GD., Koneman, EW., Kim, YK.

MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY

5th Edition

American Society for Microbiology

Estados Unidos de Norteamérica, Washington

(1991)/304-339

49. Ruiz, PG., Sada, E.

ANTIGEN DETECTION TO DIAGNOSE BACTERIAL INFECTION

Academic Press

Estados Unidos de Norteamérica (1987)/155-164

50. Ryan, RW., Kwasnik, I.

MANUAL DE MICROBIOLOGIA CLINICA

4th Edición

Editorial Médica Panamericana

Argentina (1993)/279-318

51. Sada, E., Aguilar, D., Torres, M., Herrera, T.

Detection of lipoarabinomannan as a diagnostic test for tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 30/2415-2418 1992

52. Sada, E., Brennan, PJ., Herrera, T., Torres, M.

Evaluation of lipoarabinomannan for the serological diagnosis of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 28/2587-2590 1990

53. Sada, E., Ferguson, L., Daniel, TM. An ELISA for

the serodiagnosis of tuberculosis using a 30,000 Da native antigen of Mycobacterium tuberculosis. J. Infect. Dis. 162/928-931 1990

54. Sada, E., Torres, M., Herrera, T. Nuevos métodos

de diagnóstico en tuberculosis. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Méx. 1/121-126 1988

55. Sathapatayavangas B, Kholer RB, Wheat JL, White

A, Winn WC: Rapid detection of Legionnaires' disease by latex agglutination. Am. Rev. Respir. Dis. 127/559-562 1983

56. Shafer, RW., Goldberg, R., Sierra, M., Glatt,

AE. Frequency of Mycobacterium tuberculosis bacteremia in patients with tuberculosis in an area endemic for AIDS. Am.

Rev. Respir. Dis. 140/1611-1613 1989

57. Sibley, LD., Hunter, SW., Brennan, PJ.
Mycobacterial lipoarabinomann inhibits gamma interferon
mediated, activation of macrophages. Infect. Immunity.
56/1232-1236 1988

58. Sjöholm, I., Bjerkén, A., Sjöquist, J. Protein A
from staphylococcus aureus. The effect of nitration of
protein A with tetranitromethane and subsequent reduction.
J. Immunol. 110/1562-1568 1973

59. Slead, WW. Pathogenesis of tuberculosis:
clinical and epidemiologic perspective. Rev. Infect. Dis.
11/366-368 1989

60. Snider, DE. Supplement on future research in
tuberculosis. Prospects and priorities for elimination.
Anti-tuberculosis association. Am. Rev. Respir. Dis.
134/401-423 1986

61. Sommers, HM., Good, RC.

MANUAL DE MICROBIOLOGIA CLINICA

4th Edición

Editorial Médica Panamericana

Argentina (1993)/189-260

62. Spitznagel, JK., Jacob, WR.

MICROBIOLOGIA. MECANISMOS DE ENFERMEDADES

INFECCIOSAS

2th Edición

Editorial Médica Panamericana

Argentina (1994)/337-354

63. Steele, AB., Daniel, MT. Evaluation of the
potential role of serodiagnosis of tuberculosis in a clinic
in Bolivia by decision analysis. Am. Rev. Respir. Dis.

143/713-716 1991

64. Styblo, K. Overview and epidemiologic assessment of the current global tuberculosis situation with an emphasis on control in developing countries. Rev. Inf. Dis. 11/5339-5345 1989

65. Styblo, K., R ouillon, A. Estimated global incidence of smear-positive pulmonary tuberculosis: unreliability of officially reported figures on tuberculosis. Bull. Int. Union. Tuberc. 65/118-126 1981

66. Sudre, P., Dam, PG., Kochi, A. Tuberculosis a global overview of the situation today. Bulletin. WHO. 70/149-159 1992

67. Thever, CP., Hopewell, PC., Elias, D., Schecter, GF., Rutherford, GW., Chaisson, RE. Human immunodeficiency virus infection in tuberculosis patients. J. Infect. Dis. 162/8-12 1990

68. Tuberculosis en las Américas. Mortalidad y Morbilidad, Organización Panamericana de la Salud, 1987

69. Wayne, LG., Hawkins, JE.

TRATADO DE NEUMOLOGIA

2th Edición

Ediciones Doyma

España, Barcelona (1991)/1676-1685

70. Wolinsky, E.

CECIL TRATADO DE MEDICINA INTERNA

18th Edición

Vol. II

Editorial Interamericana, McGraw-Hill

México (1991)/1858-1868

71. World Health Organization. The current global

situation of the HIV/AIDS pandemic. Geneva: WHO; 4 de enero de 1994.

72. Zacarías, F., González, RS., Cuchi, P., Yáñez, A., Peruga, A., Mazin, R., Betts, C., Weissenbacher, M. El SIDA y su interacción con la tuberculosis en América Latina y el Caribe. Bol. Of. Sanit. Panam. 116/250-262 1994