

11262
28

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
U.N.A.M. DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRIA EN MEDICINA

PRESENTA:

DRA. CLARA CRISTINA SANCHEZ RODRIGUEZ

TÍTULO:

***EVALUACION CLINICO-INMUNOLOGICA DE LA TUBERCULOSIS Y SU
RELACIÓN CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.***

2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ASESORES:



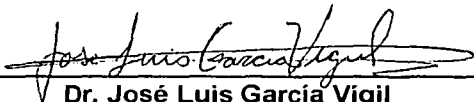
Dr. Niels Wachter Rodarte

Jefe de la Unidad de Investigación Médica
en Epidemiología clínica
HE, CMN Siglo XXI



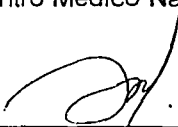
Dr. José Halabe Cherem

Jefe de División de Medicina Interna
HE, CMN Siglo XXI.



Dr. José Luis García Vigil

Jefe de informática
Centro Médico Nacional Siglo XXI



Dr. Fernando Laredo Sánchez

Médico Adscrito al servicio de Medicina Interna
HE, CMN Siglo XXI.



Dr. Raúl Mancilla Jiménez

Investigador
Instituto de Investigaciones Biomédicas

ÍNDICE

1. RESUMEN	5
2. ANTECEDENTES	6
3. JUSTIFICACION..... 13	
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVOS.....	15
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	16
7. PACIENTES Y MÉTODOS	17
7.1. EVALUACIÓN CLÍNICA Y RADIOLOGICA.....	17
7.2. EVALUACIÓN INMUNOLÓGICA	18
8. TRATAMIENTO	21
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
10. RESULTADOS	22
10.1. HALLAZGOS CLINICOS, DE LABORATORIO Y GABINETE.....	22
TABLA1. Manifestaciones clínicas.....	22
HALLAZGOS RADIOGRAFICOS.....	23
10.2. EVALUACION INMUNOLOGICA.....	26
ANTECEDENTE DE VACUNACION CON BCG Y RESPUESTA AL PPD....	26
HALLAZGOS POR INMUNOBLOT.....	27
HALLAZGOS POR ELISA	29
10.3 TRATAMIENTO	30

10.4 CORRELACION ENTRE PARAMETROS IMPORTANTES.....	31
11. DISCUSIÓN.....	33
12. CONCLUSIONES	39
13.CASOS CLINICOS	40
14. REFERENCIAS	45
15. ARTICULO.....	50

RESUMEN

El estudio se realizó en el Hospital Rural Solidaridad de Coscomatepec, Veracruz y en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Su objetivo fue evaluar la extensión clínica de la tuberculosis y el estado inmunológico inicial del enfermo en relación con la respuesta al tratamiento, con el fin de identificar factores clínicos y de laboratorio que nos sirvan de predictores de respuesta al tratamiento identificables en la evaluación inicial del enfermo con tuberculosis. Se incluyeron 55 enfermos con tuberculosis y 15 sujetos controles. De los 55 enfermos con tuberculosis, 52 presentaron TB pulmonar diagnosticados por clínica, hallazgos radiográficos, baciloscopia, cultivo y 3 con TB ganglionar diagnosticados por biopsia. Los pacientes con TB pulmonar fueron clasificados de acuerdo a la extensión radiografica de la enfermedad. A todos se les administró el Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES) primario, secundario, ó reforzado según las características individuales.

Los indicadores no inmunológicos analizados fueron: el antecedente de tuberculosis el cual fue estadísticamente significativo con una p : 0.035 al analizar los pacientes con tuberculosis de primera vez contra los pacientes con recaídas y la respuesta al tratamiento, la extensión de la enfermedad también fue estadísticamente significativa al comparar los enfermos con enfermedad localizada contra los enfermos con enfermedad moderada y diseminada y la respuesta al tratamiento, se obtuvo una p : 0.0035; Entre los indicadores inmonologicos, se analizó el antecedente de vacunación con BCG, la intradermoreacción con PPD, los títulos de anticuerpos séricos por ELISA con un extracto proteico total (EPT) y con la proteína de 30/31 kD (P-30/31) de *M. tuberculosis* H37/Rv y el patrón de bandas por Inmunoblot, entre estos el de mas valor pronóstico fue la serologia con P-30/31. Al analizarse los títulos de anticuerpos con el ELISA con P 30/31 se observo que los enfermos con títulos positivos curaron en mayor proporción que los enfermos con títulos negativos con una p : 0.0001

2. ANTECEDENTES

2.1. IMPORTANCIA DE LA TUBERCULOSIS

La tuberculosis (TB) pulmonar es una enfermedad infecciosa producida por un complejo de micobacterias que incluye *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium microti* (1). La Organización Mundial de la Salud reportó en 1998 que una de cada 3 personas en el mundo esta infectada en forma latente por *M. tuberculosis*. A nivel mundial en 1997 se presentaron 7.25 millones de casos nuevos de TB y se registraron 2,908 000 muertes. La mayoría de los casos ocurrieron en el Sureste de Asia, en Africa y en países del este del Pacífico con 2,800, 1,650 y 1,583 millones de casos, respectivamente (2). El aumento creciente de casos nuevos y su característica de pandemia han llevado a especular acerca de las posibles causas del resurgimiento de la TB. Dichos factores incluyen mutaciones genéticas del bacilo con modificaciones en su virulencia y desarrollo de resistencia a los antituberculosos (3,4). Otro factor importante, es la epidemia del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), enfermedad caracterizada por disminución de los linfocitos T CD4 +, los cuales son cruciales en la protección inmunológica en contra de *M. tuberculosis*. (5) Otros factores predisponentes a considerar son la desnutrición (6), algunas alteraciones metabólicas como la insuficiencia renal y el uso de corticoesteroides y antimetabolitos (7) que deprimen la respuesta inmune mediada por células (8).

2.2. SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN

Al igual que ocurre con otras infecciones hay individuos que son más susceptibles que otros a la TB (9). Se han realizado estudios genéticos sobre el complejo principal de histocompatibilidad (CPH) sin que hasta la actualidad se halla llegado a un consenso general sobre resistencia o susceptibilidad a la TB relacionado con el CPH (10). En estudios de prevalencia se ha observado una relación entre CPH DR1, DR2 y DQ B1*0503 y susceptibilidad a la TB, sin embargo se necesitan más investigaciones para confirmar lo anterior (11).

Recientemente se han hecho observaciones que involucran a otros genes en la susceptibilidad innata a la TB y a otras infecciones intracelulares. Como son el gen de la IL-12 (12), del TNF- α y el gen que codifica para la proteína *Nramp-1* que se expresa en macrófagos y que parece participar en el transporte de nítritos al fagolisosoma permitiendo así la destrucción del bacilo (13). En una población del Oeste de Africa se describió la asociación de polimorfismos en el gen *Nramp-1* y susceptibilidad a la tuberculosis (14). Entre los factores del huésped que influyen en la susceptibilidad a la TB, además de los genéticos está el estado del sistema inmunológico al contacto con la micobacteria (15,16). La mayor parte de las personas, al entrar en contacto con el bacilo, son capaces de desarrollar una respuesta protectora que limita la infección. La población que por algún motivo se encuentra deficiente en la inmunidad celular es la que desarrolla las formas más graves de la enfermedad. Es particularmente importante la deficiencia de linfocitos T CD4+ como se observa en la Insuficiencia renal y en el SIDA, condiciones en las cuales hay un incremento de más de 10 veces en la incidencia de TB comparado con la población general (17,18).

M. tuberculosis infecta preferencialmente los pulmones pero puede diseminarse a prácticamente todos los órganos de la economía dando lugar a una gran variedad de cuadros clínicos (19). Con la reemergencia de la TB y la aparición del SIDA han aumentado las formas extrapulmonares relacionadas principalmente con formas diseminadas (20), intestinales (21,22), renales, óseas y cutáneas (23,24,25,26). Existen tejidos que son propicios para el desarrollo de la infección, permitiendo una gran replicación bacilar, como son los ápices pulmonares, sin embargo otros, como la serosa pleural, parecen resistir la infección observándose formas autolimitadas que curan aún sin tratamiento antituberculoso (27).

2.3. INMUNOPATOGENIA DE LA TUBERCULOSIS

La vía habitual de la infección por *M. tuberculosis*, es la respiratoria por la inhalación de las gotitas de Flügger que contienen el bacilo (28), las cuales por su tamaño alcanzan los alvéolos pulmonares donde la micobacteria es

fagocitada por macrófagos alveolares que se localizan en el epitelio simple de la pared alveolar. Dentro del macrófago la bacteria es destruida, en algunos casos procesando y expresando peptidos unidos a moléculas del CPH tipo II y tipo I que son reconocidas por los linfocitos T CD4+, estimulando la producción de citocinas y la lisis del macrófago a través de las células CD8+. Se han descrito mecanismos micobacterianos que inhiben la destrucción del bacilo el cual, escapa así, del sistema inmune y utiliza al macrófago para su replicación activa ocasionando el estallamiento celular y la diseminación de la infección a células cercanas, alcanzando los ganglios linfáticos y después la circulación sanguínea, ocasionando así TB diseminada (28). Ligado con estos mecanismos se ha descrito en la infección primaria la presencia del complejo de Ranke que es una área de alveolitis, linfangitis y adenitis que cuando se resuelve se calcifica dando lugar al nódulo de Ghon que representa la única fuente de antígenos micobacterianos y es responsable de la existencia de anticuerpos antimicobacterianos y de una respuesta positiva al PPD en individuos con TB latente (29). La mayor parte de los casos de TB activa en el adulto se deben a reactivación de este foco primario. La capacidad del bacilo de la TB para entrar en un estado de latencia donde la disminución de su metabolismo lo hace resistente a los antifímicos, es un factor de gran importancia que es necesario dilucidar e impedir para poder erradicar la TB.

Las células principales, pero no exclusivas involucradas en la respuesta inmune protectora contra *M. tuberculosis* son el macrófago y el linfocito T. El macrófago en respuesta a la infección por *M.tuberculosis*, produce IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β . La IL-1 es un pirógeno endógeno que participa activamente en la producción de la fiebre, característica de la enfermedad. La IL-6 aumenta la producción de células B activadas, participando en la hiperglobulinemia que se observa en la mayoría de los casos de TB. El TNF- α sinergiza su efecto con el INF- γ y ambos son esenciales para la producción del granuloma, participando también en la producción de la fiebre, pérdida de peso y en la necrosis tisular característica de la TB. La IL-10 inhibe la producción de citocinas inflamatorias producidas por los linfocitos T y

macrófagos. El TGF- β inhibe la proliferación de linfocitos T y la función efectora del macrófago, lo que contribuye a limitar la producción de citocinas proinflamatorias, favoreciendo la replicación bacteriana, disminuyendo así la magnitud del daño tisular pero evitando el control de la infección (30). Entre los factores de la micobacteria, no se han identificado toxinas o componentes propios relacionados con las manifestaciones clínicas o con el daño a los tejidos. Sin embargo se han descrito tres factores de virulencia: una catalasa-peroxidasa que inhibe la producción de radicales de oxígeno, *mce*, que codifica para un factor de colonización de los macrófagos y *sigA* que puede ocasionar atenuación de la bacteria. Con la reciente caracterización completa del genoma de *M. tuberculosis* se espera un avance importante en la identificación de componentes micobacterianos relevantes en la patogenia de la TB (31).

2.4. ESPECTRO INMUNOLOGICO DE LA TUBERCULOSIS.

Lenzini y col, en 1977 correlacionaron datos inmunológicos con el espectro clínico de la enfermedad, identificando 2 grupos polares y dos intermedios: reactivo reactivo, reactivo intermedio, arreactivo intermedio y arreactivo arreactivo esto sobre la base de la respuesta celular, clasificaron a la TB sobre la base de patrones radiográficos previamente establecidos, encontrando que los pacientes reactivos (con respuestas positivas al PPD y con títulos de anticuerpos bajos) presentaban enfermedad localizada con infiltrados micronodulares y buena respuesta al tratamiento. En el polo opuesto los pacientes arreactivos arreactivos (con PPD negativo y títulos de anticuerpos altos) presentaron enfermedad diseminada y muy pobre respuesta al tratamiento (32).

Para estudiar la inmunidad celular se han utilizado principalmente pruebas *in vitro* en las cuales los linfocitos T del paciente tuberculoso se exponen a lectinas como la fitohemaglutinina o al PPD y otros antígenos. En general estos estudios han demostrado que hay una correlación directa entre una disminución de la respuesta *in vitro* y la gravedad de la TB. Recientemente se han introducido métodos más sofisticados para evaluar la forma en que el

paciente tuberculoso reacciona inmunológicamente en contra del bacilo y las posibles repercusiones de esta respuesta en el curso de la enfermedad. Un método es la determinación de las subpoblaciones de linfocitos por citometría de flujo con anticuerpos monoclonales y otro es la determinación de las citocinas que están produciendo los linfocitos T *in vitro* (33)

En leishmaniasis y en lepra se ha observado que mientras que la respuesta Th-1 (producción predominante de interferón gamma e IL-2) parecen tener un papel protector, un patrón de citocinas de tipo Th-2 (IL-4, IL-10) es permisivo para el desarrollo de estas infecciones (34,35). El papel de los métodos anteriores en la evaluación inmunológica del paciente tuberculoso está aun por definirse y constituye una línea de investigación de gran interés (36)

2.4. DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS

La TB tiene un espectro de síntomas clínicos muy variado, por lo que es un reto para el médico establecer el diagnóstico oportunamente. Lo primero es tener la sospecha del diagnóstico y posteriormente usar las herramientas necesarias para confirmar el diagnóstico. Entre estas, la radiografía de tórax ocupa un lugar preponderante (37,38). Para confirmar el diagnóstico de TB activa, se utilizan métodos microbiológicos entre los que destacan el cultivo de esputo el cual tiene una especificidad del 100%, y una sensibilidad del 27%. De los medios de cultivo tradicionales más usados esta el medio sólido basado en huevo, el Lowestein-Jensen con el cual se obtienen resultados 4 a 6 semanas después de la siembra. Otros medios basados en agar (7H10, 7H11) son más rápidos, obteniéndose resultados entre 2 y 4 semanas. Entre los medios líquidos esta el Middlebrook 7H12 comercializado como BACTEC 12 B, que se basa en la detección radiométrica del crecimiento micobacteriano que contiene 5 antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes no micobacterianos (39). Entre las técnicas más difundidas y de mayor valor se encuentra la baciloscopia, que identifica bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) (2) pero no asegura su identidad, para lo cual se requiere del cultivo y el empleo de pruebas bioquímicas y de técnicas de biología molecular (40,41).

No obstante que la prueba del PPD parece tener un valor incuestionable en la evaluación inmunológica del paciente tuberculoso, su valor en el diagnóstico está sujeto a múltiples variables que van desde su procedencia, el manejo del biológico, su aplicación y la interpretación de la prueba (42). En países con incidencia baja de TB, la respuesta al PPD es un criterio diagnóstico de gran importancia y puede justificar el establecimiento de un tratamiento antifímico. En cambio, en países como el nuestro donde la mayoría de los individuos responde al PPD, su utilidad como prueba diagnóstica es pobre. En el diagnóstico de la TB se han utilizado una variedad de métodos serológicos como son la hemaglutinación, la fijación del complemento, la inmunolectroforesis y en los últimos años el ELISA utilizando mezclas antigénicas complejas y antígenos micobacterianos nativos purificados o recombinantes (43,44,45). Hasta la fecha ninguno de los métodos mencionados ha sido incorporado plenamente al estudio rutinario del paciente tuberculoso.

Más recientemente se ha venido utilizando en estudios piloto la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con resultados prometedores. El uso clínico de esta prueba, sin embargo, está limitado por lo difícil de su implementación.

2.5. TRATAMIENTO

A principios del siglo XVIII no se conocía la cura para la TB, sin embargo ya se realizaban intentos para su manejo los cuales consistían en la aplicación de suero inmune a los enfermos, los que se obtenían de animales como conejos, caballos e incluso de humanos, obteniendo resultados variables. Esta terapéutica se abandonó debido a las complicaciones relacionadas con reacciones de hipersensibilidad a los componentes del suero. Desde entonces se especulaba sobre el papel protector de los anticuerpos y otras sustancias (46). A principios del siglo XIX se descubren las drogas antifímicas y su aplicación se acompaña de un gran éxito en el control de la enfermedad, el cual continuo hasta mediados de la década de los ochentas cuando se observó un aumento progresivo en la incidencia de la TB, que se atribuyó a múltiples factores entre ellos un incremento preocupante de bacterias resistentes a uno o más antifímicos. El principal factor de esta

multidrogoresistencia (MDR) parece ser la falta de adherencia al tratamiento lo que propicia que la bacteria mute y adquiera factores de resistencia (47). En 1997 la OMS reportó que los países con peores programas de control poseían las prevalencias más altas de MDR. Por ejemplo, en Latvia el 22% de los pacientes poseían cepas MDR (31). En México, en un estudio realizado en el INDRE, se reportó una resistencia primaria del 3% y una resistencia secundaria del 72%, siendo hacia isoniacida en el 52.3%, a estreptomycinina en el 35.3% y a rifampicina en el 34.2%. (48)

Otros factores que inciden sobre la eficacia de la terapia es lo prolongado de los tratamientos habituales que propician el abandono por parte del paciente, la falta de métodos para el diagnóstico oportuno como son el aislamiento y cultivo adecuados de la bacteria, la falta de pruebas eficaces de sensibilidad a antifímicos y así mismo, la falta de medicamentos (49). Por otra parte la micobacteria es naturalmente resistente a muchos antibióticos principalmente por su gran bícapa de lípidos. Una de las medidas adoptadas por la Secretaría de Salud y Asistencia Pública para combatir el abandono del tratamiento es la utilización del TAES por un periodo mínimo de 6 meses (49).

3. JUSTIFICACIÓN

El estudio del enfermo con TB se ha enfocado principalmente al diagnóstico y al tratamiento, siendo escasos los estudios en los cuales se analiza el estado inmunológico del paciente tuberculoso y la influencia de este sobre el curso y pronóstico de la enfermedad.

Durante el desarrollo de trabajos experimentales se han empleado diferentes métodos para valorar la respuesta inmunológica. Después del descubrimiento del agente causal de la TB por Robert Koch se han venido empleando diferentes métodos para él diagnóstico y la evaluación de la relación huésped/parásito. En TB las primeras técnicas empleadas para valorar la respuesta inmune celular fueron la aplicación intradérmica de la llamada tuberculina vieja y actualmente el PPD. Posteriormente se han utilizado estudios *in vitro*, la inhibición de la migración de leucocitos, y actualmente con la evolución de la tecnología se emplean la inmunoelctrotransferencia y el ELISA. Con el advenimiento de la citometría de flujo (FACS) y de los anticuerpos monoclonales es posible ahora analizar poblaciones celulares y su papel en la respuesta del huésped, tanto en enfermedades no infecciosas que afectan directamente el estado inmune, como lo es la desnutrición ó en enfermedades de origen infeccioso con repercusión directamente en el sistema inmune como lo es la TB ó enfermedades típicamente inmunológicas como las autoinmunes.

En este trabajo se utilizó un conjunto de estudios sencillos y rápidos como son el empleo del PPD, el inmunoblot y el ELISA con extracto proteico total y con un antígeno purificado, para evaluar el estado inmunológico del enfermo y tratar de encontrar parámetros inmunológicos que sirvan como indicadores pronósticos que nos informen acerca del probable desenlace de la enfermedad.

4. HIPÓTESIS

Existe parámetros inmunológicos como la respuesta al PPD y otros no analizados rutinariamente, como el inmunoensayo enzimático (ELISA) y el inmunoblot (Westernblot) con extracto de antígenos y con antígenos puros de micobacterias que pueden servir como factores pronósticos en el enfermo con tuberculosis activa

5. OBJETIVOS :

- Realizar un estudio prospectivo de pacientes con tuberculosis pulmonar no seleccionados en una zona rural empobrecida del estado de Veracruz.
- Realizar intradermoreacciones con PPD al ingreso para evaluar la inmunidad celular.
- Evaluar la respuesta inmune humoral por inmunoblot y ELISA.
- Comparar los datos inmunológicos con el curso y pronóstico de la enfermedad

6. DISEÑO DEL ESTUDIO:

Las características del estudio fueron: longitudinal, observacional, prospectivo y comparativo.

7. PACIENTES Y MÉTODOS:

7.1. EVALUACIÓN CLÍNICA Y RADIOLOGICA

A todos los individuos con sospecha clínica de TB activa se les realizaron estudios bacteriológicos y radiológicos, para descartar o confirmar el diagnóstico de TB pulmonar. Una vez corroborado el diagnóstico se incluyeron en el grupo de estudio y se les realizó PPD, BAAR y cultivo. La población estudiada pertenece a un área rural del estado de Veracruz, con estrato socioeconómico muy bajo. Se incluyeron 55 pacientes, hombres y mujeres con edades entre 17 y 70 años, los cuales 52 reunieron los criterios de TB pulmonar activa señalados por la Sociedad Americana de Tórax y 3 se diagnosticaron como TB ganglionar por biopsia ganglionar. Los criterios para diagnóstico de TB pulmonar se basaron en hallazgos clínicos, radiológicos, en la respuesta a la aplicación intradérmica del PPD y demostración del bacilo de la tuberculosis por baciloscopia y/o cultivo de esputo. En todos los pacientes se analizó la respuesta inmune humoral antimicobacteriana por inmunoblot y ELISA. A todos los pacientes se les realizó la prueba de ELISA para detectar anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia adquirida, la cual fue negativa en todos los casos. Se llevo a cabo el seguimiento de los pacientes cada mes por interrogatorio y exploración física. La radiografía de tórax se realizó al ingreso y de control al terminar el tratamiento. Se realizaron series de 3 baciloscopias en esputo mensualmente.

La extensión radiografica fue clasificada según los criterios del Consejo de Investigación Medica Británico de la siguiente forma:

Categoría 1: Sin alteraciones, normal

Categoría 2: Afección unilateral de < 5 cm de parénquima pulmonar

Categoría 3: Afección unilateral de 5 a 15 cm del parénquima pulmonar

Categoría 4: Afección bilateral de > 15 cm del parénquima pulmonar

Categoría 5: Afección miliar bilateral

La enfermedad se clasificó en relación a la extensión pulmonar en leve (enfermos con radiografía en las categorías 1, 2), moderada 3 y 4 y severa con categoría 5.

7.2. EVALUACIÓN INMUNOLÓGICA

7.2.1. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CÉLULAR POR INTRADERMORREACCIÓN CON PPD.

El PPD se obtuvo de la Gerencia General de Biológicos y Reactivos en frascos de 1 ml. A cada paciente se les aplicó 0.1 ml que equivalen a 2 unidades de tuberculina. El PPD se administró con una jeringa de 1 ml y una aguja de 27 X 13 mm por vía intradérmica en la cara anterior del antebrazo por la técnica de Mantoux. La lectura se realizó 6, 24, 48 y 72 horas después de la aplicación, por palpación y medición de la papula en un eje transversal al del antebrazo, reportándose en milímetros. La prueba se consideró positiva cuando la induración midió 10 ó más mm, a las 48 hr de aplicado el PPD.

7.2.2. EVALUACION DE LA RESPUESTA HUMORAL

Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* y obtención de un extracto proteico total (EPT) y purificación de la proteína de 30-31 kilodaltones.

Para obtener antígenos micobacterianos se realizaron los procedimientos que se describen a continuación. *Mycobacterium tuberculosis*, cepa H37/Rv, obtenida de la Gerencia General de Biológicos y Reactivos, se cultivó por 6-8 semanas en el medio sintético de Proskauer y Beck modificado por Youmans (50). Los bacilos se eliminaron por filtración de la siguiente manera: el medio de cultivo se filtró primero a través de un filtro Whatman y después sucesivamente a través de filtros (Millipore Products Division, Bedford, MA 01730) de 1.5, 0.45 y 0.22 μm . El medio de cultivo se precipitó con sulfato de amonio (0.5 g / 1 ml). El precipitado obtenido se dializó extensamente con agua destilada para obtener finalmente un extracto proteico total (EPT). El antígeno de 30-31 kD (P-30/31) se seleccionó para realizar estudios de ELISA por ser el antígeno más frecuentemente reconocido por inmunoblot. Se obtuvo de la siguiente manera: El EPT fue separado por el método ácido-alcohólico de Seibert (51). Los diversos precipitados y sobrenadantes se analizaron por geles de poliácridamida con

dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) e inmunoblot lo que permitió encontrar fracciones enriquecidas en P-30/31. Con estas fracciones se hizo un pool el cual se separó en un gel preparativo al 10%, el cual se tiñó con acetato de sodio 4 M, para identificar la banda deseada, la cual se cortó con tijeras y se sometió a elución con urea 6 M. La proteína obtenida se dializó contra agua bidestilada y se guardó a -20°C grados centígrados hasta su uso.

7.2.3. INMUNOBLOT

El EPT se separó en PAGE-SDS al 10 % bajo condiciones reductoras con 2-mercaptoetanol (52). Para llevar a cabo los estudios de inmunoblot, las proteínas micobacterianas separadas por PAGE-SDS se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Laboratorios BioRad, Richmond, VA, USA) en una cámara de transferencia (Idea Scientific, Corvallis, PA). Con el fin de bloquear sitios reactivos en el papel de nitrocelulosa, este se incubó toda la noche con albúmina bovina sérica al 3 % (Laboratorios Sigma, San Luis, MO, USA) en buffer de fosfatos (PBS) con Tween-20, 0.03%, toda la noche; se lavo con PBS-Tween 0.03%. El papel de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se cortó en tiras de 5 mm, las que se incubaron con el suero de los pacientes a una dilución 1:10 en PBS-Tween 20, 0.03% por 3 horas a temperatura ambiente. Se realizaron 5 lavados con PBS -Tween 20, 0.03% y se incubó con proteína A marcada con peroxidasa (1:1000) por 90 minutos. Se realizaron cinco lavados con PBS antes de revelar la peroxidasa con 4-cloro-1-naftol y agua oxigenada por 15 minutos. Las tiras se lavaron con agua, se secaron y se fotografiaron para el análisis de bandas reactivas. El inmunoblot se clasificó según el número de bandas observadas en tres patrones: tipo 1: <5 bandas, tipo 2: de 5 a 10, tipo 3: >10 y según la intensidad de la banda en: no reactiva (0), poco reactiva (+/-, +), reactiva (++) y muy reactiva (+++). De acuerdo a lo anterior se clasificaron los resultados como negativos cuando la reactividad fue menor a la observada con los sueros control y positiva cuando el número de bandas fue mayor.

7.2.4. ELISA con EPT y con P 30/31.

Se utilizaron placas de microtitulación de 96 pozos (Costar Corporation, Cambridge, MA, 02140, USA). Los pozos fueron sensibilizados con 0.5 μg de EPT o P30-31 en 100 μl de buffer de carbonatos, pH. 9.6, incubando a 37° C toda la noche. Después se realizaron lavados con PBS-Tween 20. Se bloquearon los sitios activos remanentes en el plástico con albúmina bovina sérica 1%, colocando 100 μl por pozo por 1 hora a 37° C. El suero se aplicó diluido 1: 500 en PBS-BSA (3%)-Tween (0.05%), por 1 hr, lavando después con PBS-Tween 20 al 0.05%, 3 veces (3 minutos cada vez). Se incubó con Proteína A- Peroxidasa, 1:1000 (Sigma) se lavo y se reveló con Orto-fenil-endiamina y peróxido de hidrógeno en citrato 0.1M, pH 4.5, por 4 minutos a 37° C. La reacción fue detenida con ácido sulfúrico 1 N, 50 μl por pozo. La densidad óptica se leyó en un procesador automático de ELISA a 492 nm (Ultra Microplate Reader UELx 808, Biotek Instruments, INC, Winoosk, UT.)

Se obtuvieron sueros de personas no enfermas para obtener un punto de corte (la densidad óptica promedio mas 2 DE), considerándose positivos para el ELISA con EPT todos los valores de 0.055 o más; además los títulos de anticuerpos se clasificaron en: bajos (0.100), moderados (0.100 a 0.200) y altos (> 0.200).

En el ensayo con P- 30/31, el punto de corte se obtuvo de la misma manera que para el ELISA con EPT. Todos los valores de 0.352 ó por arriba se consideraron positivos y se clasificaron arbitrariamente en bajos (<0.3), moderados (de 0.3- 0.5) y altos (> 0.5).

8. TRATAMIENTO

Se implementó el tratamiento recomendado por la Secretaria de Salud y Asistencia Pública, establecido en la Norma Oficial Mexicana (NOM 006 - SSA2 - 1993) publicado en el Diario Oficial de la Federación el 26 de Enero de 1995. La administración fue estrictamente supervisada en todos los casos, para disminuir con esto el abandono y la resistencia a las drogas (49).

El tratamiento primario consistió en Isoniacida 300 mg, rifampicina 600 mg, y pirazinamida 1500 mg diarios hasta completar 60 dosis, seguido por un esquema de Isoniacida 800 mg y rifampicina 600 mg al día, dos veces por semana hasta completar 30 dosis.

El tratamiento de las recaídas consistió en Isoniacida 300 mg, rifampicina 600 mg, pirazinamida 1500 mg y etambutol 1200 mg diarios por seis meses o un año, dependiendo de las baciloscopías, ya que si continuaban positivas después de seis meses de tratamiento se prolongó a 1 año.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La variable dependiente en este estudio fue la respuesta al tratamiento y las variables independientes fueron entre los parámetros no inmunológicos: si se trataba de un caso de primera vez o de una recaída y la extensión de la enfermedad, en donde se compararon los pacientes con enfermedad localizada contra los que presentaron enfermedad avanzada o miliar. Entre los parámetros inmunológicos se evaluó independientemente el antecedente de vacunación con BCG, la respuesta cutánea al PPD, el inmunoblot y los títulos de anticuerpos obtenidos por ELISA con EPT y con P-30/31, además se calculó el riesgo relativo y los intervalos de confianza (53).

Se utilizó la χ^2 con corrección de Yates.

10. RESULTADOS:

10.1. HALLAZGOS CLÍNICOS, DE LABORATORIO Y GABINETE.

ANTECEDENTES Y DATOS GENERALES.

El diagnóstico final en los 55 pacientes incluidos en este estudio fue de tuberculosis pulmonar en 52 y de tuberculosis ganglionar en 3. Veintinueve pacientes eran mujeres y 26 eran hombres. El rango de edad varió de 17 a 70 años, con una media de 40 años. El 60% de los enfermos se encontró entre los 17 y 50 años, rango de edad donde se localiza la población laboral productiva. La mayoría de los pacientes tenían talla baja y desnutrición.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS MÁS FRECUENTES

Manifestación Clínica	Frecuencia (%)
Astenia	100%
Adinamia	100%
Anorexia	100%
Pérdida de peso	95%
Tos	96%
Fiebre	93%
Diaforesis	84%
Hemoptisis	69%
Disnea	34.5%

Tabla 1. La tos fue el síntoma respiratorio más frecuente, llamo la atención el alto porcentaje de disnea que presentaron los pacientes al momento del diagnóstico, lo que nos habla indirectamente de la severidad del cuadro.

ESTUDIOS BACTERIOLÓGICOS.

A todos los pacientes se les realizó BAAR en expectoración. En 39 (71%) se observaron bacilos ácido-alcohol resistentes. En 16 pacientes las baciloscopías fueron negativas (29%). Se realizaron cultivos de expectoración en 42 casos utilizando el medio de Lowenstein-Jensen, de los cuales 14 fueron positivos (33%) y 28 (67%) negativos.

HALLAZGOS RADIOGRÁFICOS.

El 100% de los pacientes presentó un cuadro clínico altamente sugestivo de tuberculosis pulmonar y de estos todos menos cinco presentaron cambios radiográficos compatibles con dicho diagnóstico

La radiografía se empleo como herramienta diagnóstica y para la clasificación de la enfermedad (54,55,56). De los 55 enfermos, 10 presentaron infiltrado miliar bilateral, 16 enfermedad moderada, 24 enfermedad localizada y en 5 pacientes no hubo cambios radiográficos; en tres de estos pacientes se estableció el diagnóstico de tuberculosis ganglionar por biopsia ganglionar y en dos casos se diagnostico tuberculosis pulmonar sobre la base de que sus baciloscopías fueron positivas (+++ y ++).

La gama de hallazgos radiográficos encontrada fue muy amplia desde lesiones recientes caracterizadas por infiltrados micro y macronodulares localizados en focos neumonicos o difusos y confluentes diseminados hasta derrames pleurales y datos de cronicidad como son retracción de la traquea, despegamiento de la pleura parietal, cavernas, calcificaciones e hipertrofia compensatoria pulmonar.

En 26 enfermos se observo afección de ambos pulmones, presentando 10 afección miliar de patrón hematogeno típico con infiltrado micronodular en 9 casos y uno con infiltrado macronodular. Dieciséis pacientes presentaron patrón broncogeno característico con focos múltiples y con afección basal en la mayor parte de estos pacientes. En 14 casos hubo afección unilateral con predominio del lóbulo inferior del pulmón izquierdo (9/14) y 5 con afección del lóbulo inferior del pulmón derecho. Se observó afección del lóbulo superior siempre en presencia de lesiones en el lóbulo inferior. En 30 casos se observaron cambios crónicos como son fibrosis, retracción de tejidos blandos y cavernas.

Previamente se ha establecido que la proyección de los segmentos pulmonares en la pared torácica tiene un índice de concordancia muy alto (75%) y que es un método, basado en la exploración física del área pulmonar muy útil para valorar la extensión y localización de las lesiones tuberculosas. Por lo tanto la exploración torácica es un procedimiento clínico confiable y de

gran utilidad para valorar la enfermedad en un medio donde no exista la posibilidad de la radiografía. Además la exploración de la zona suprarretrohiliar que es la más frecuentemente afectada por la lesión primaria de la tuberculosis es accesible a la exploración física, permitiendo un diagnóstico certero en el 75% de los casos (57)

10.2. EVALUACION INMUNOLOGICA:

VACUNACION CON BCG.

El antecedente de vacunación con BCG se investigo interrogando al enfermo y verificando la presencia de la cicatriz en la cara externa del brazo. De los 55 enfermos 34 presentaron la cicatriz. Un hallazgo sobresaliente fue el hecho de que 7 de los 10 casos con TB miliar no fueron vacunados.

RESPUESTA AL PPD.

A todos los pacientes se les aplico el PPD según lo indicado en PACIENTES Y MÉTODOS. Las lecturas se llevaron a cabo a las 6, 24, 48 y 72 horas. De los 55 pacientes 38 fueron positivos ya que la induración midió 10 ó más mm. Se observó induración de 10 mm a las 6 h en 17 pacientes. Las lecturas a las 6 h no parecen tener utilidad pues de los 38 casos positivos a las 48 o 72 h, 22 fueron negativos a este tiempo y 3 no lo eran a las 24. De estos datos se puede concluir que el mejor tiempo para evaluar la respuesta al PPD son las 48 h o 72 h.

Un enfermo presento desde las 6 horas de la aplicación del PPD, induración de todo el antebrazo, con aparición de vesículas y necrosis en el sitio de aplicación (fenómeno de Koch), la cual se autolimito a los 7 días; se trató de una paciente de primer ingreso con enfermedad moderada con baciloscopías negativa que curó con el tratamiento.

Contrario a lo esperado no hubo una correlación clara entre el antecedente de vacunación con BCG y la respuesta al PPD, ya que de los 34 pacientes vacunados sólo 24 fueron PPD positivos. La falta de respuesta al PPD de los pacientes vacunados podría atribuirse a diversos factores como son un mal manejo y aplicación del biológico y a la misma enfermedad que a menudo deprime la respuesta inmune celular (58,59).

INMUNOBLOT, FIGURA 1

Por este método se busco analizar de una manera principalmente cualitativa la respuesta inmune humoral del paciente con tuberculosis. Se utilizaron como controles 10 sueros de individuos sanos con los que se observó reconocimiento muy esporádico de una y hasta dos bandas. El suero de 12 pacientes dio resultados completamente negativos. Tomando en consideración el número de bandas reactivas y la intensidad del reconocimiento se observó una gran variedad en los patrones de reconocimiento (Figura 1). En 7 casos fue muy intenso. El antígeno mas frecuentemente reconocido (16 casos) fue el doblete de 30-31 kD, al que por este estudio puede ser considerado el antígeno inmunodominante, lo cual ya ha sido observado en otros estudios (60). El número de bandas reactivas no se relacionó con la extensión de la enfermedad. En algunos casos se observó un barrido intensamente marcado que podría corresponder a lipoarabinomanana; en estos casos los títulos de anticuerpos por ELISA con EPT fueron muy altos.

INTENSIDAD POR INMUNOBLOT

INTENSIDAD	PACIENTES
Negativo	12
Leve	14
Moderado	15
Intenso	7

Tabla 2. El inmunoblot se realizó en 47 pacientes utilizando un extracto proteico total obtenido del medio de cultivo de *M. tuberculosis* H37/Rv. El suero se diluyó 1/10. Las bandas reactivas se revelaron con Proteína A-peroxidasa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

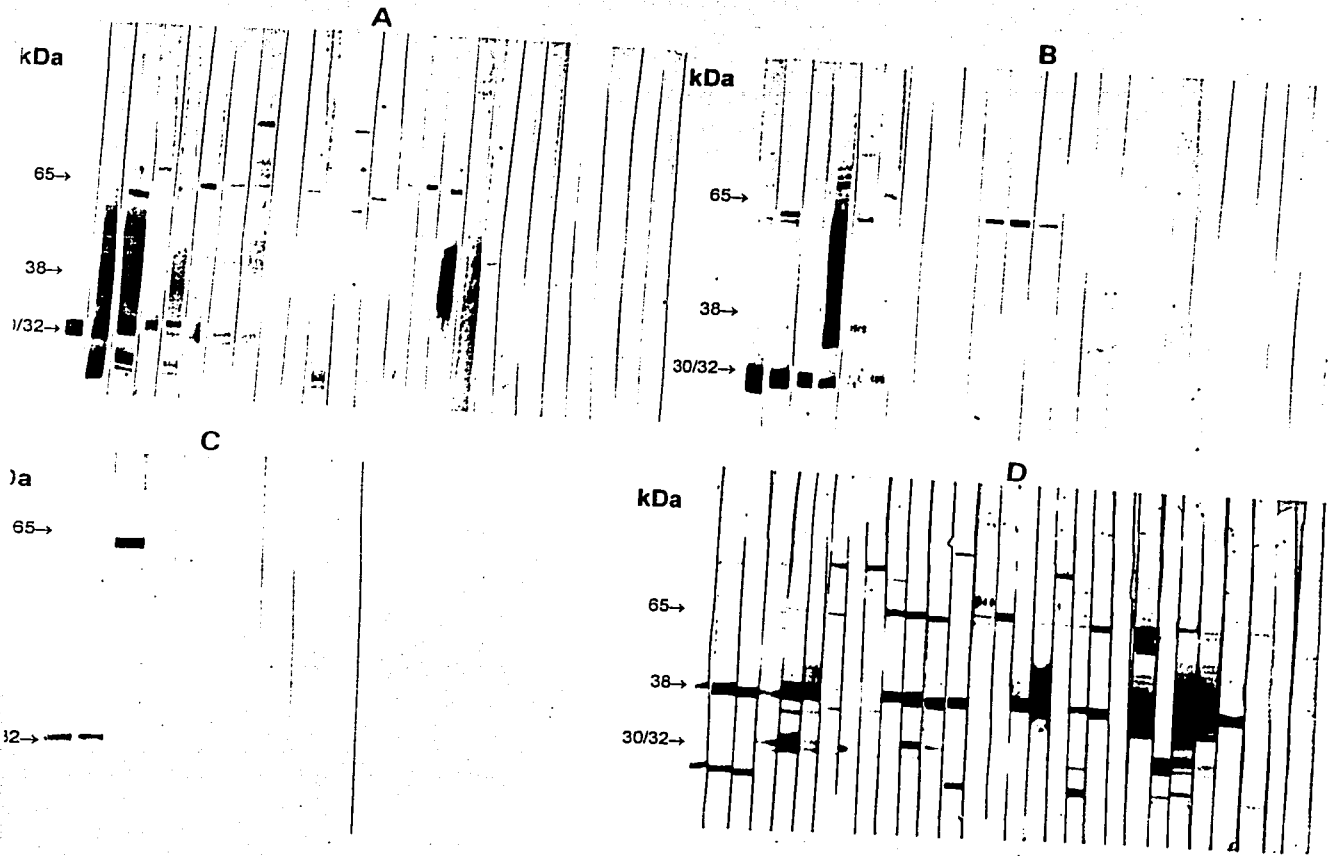


Figura 1. A diferencia de lo observado en estudios previos (8), donde se observó una gran cantidad de bandas por inmunoblot, en esta población los antígenos reconocidos fueron escasos. A) pacientes que respondieron al tratamiento, B) Pacientes que no respondieron, C) Sujetos control, D) Pacientes reclutados en un Centro hospitalario de concentración en el DF (CM La Raza)

ENSAYO INMUNOENZIMATICO (ELISA) CON EXTRACTO PROTEICO TOTAL (EPT).

A 47 de los 55 enfermos se les realizo ELISA para detección de anticuerpos contra el EPT de *M. tuberculosis*. El punto de corte se estableció añadiendo dos desviaciones standard a la densidad óptica media (0.026) de los 14 sueros obtenidos de individuos control. Treinta y un sueros dieron títulos positivos (66%) de los cuales el 68 % tuvieron una reacción positiva al PPD. Los títulos fueron altos en 8 casos, moderados en 12 y bajos en 12. El ELISA con EPT tuvo una sensibilidad de 66%. La especificidad de este ensayo fue de 100%. Los títulos de anticuerpos se relacionaron con la extensión de la enfermedad: el 67% (17/67) de los pacientes con títulos bajos tenían enfermedad localizada, el 56% (5/9) de los pacientes con títulos moderados presentaron enfermedad localizada y el 50% (4/8) de los enfermos con títulos altos tenían tuberculosis miliar.

Se empleo para el análisis la ch^2 con corrección de Yates, se analizaron independientemente los siguientes parámetros: La condición de si se trataba de un caso de primera vez contra si se trataba de recaída y los títulos positivos de anticuerpos contra el EPT, se obtuvo una ch^2 de 5.10 y una p : 0.0239 no encontrando significancia estadística (ns). Con las variables de vacunación con BCG se obtuvo una ch^2 : 0.3983 y una p : 0.5280 ns, con la respuesta al PPD se obtuvo una ch^2 : 0.03205 y una p : 0.8579 ns, con la presencia de cavernas pulmonares se obtuvo una ch^2 : 2.651 y una p : 0.1035 ns, en relación con la respuesta al tratamiento se obtuvo una ch^2 : 0.6693 y una p : 0.4133

ELISA con P- 30/31.

El ELISA con P- 30/31 se realizo en 45 enfermos. La densidad óptica media de 14 sueros controles fue de 0.160 y el valor de corte positivo fue de 0.352. De los 45 enfermos, 32 presentaron títulos positivos. Es de interés que el 72 % de los pacientes con títulos positivos presento una reacción al PPD de mas de 10 mm.

Para analizar los resultados con este ELISA se empleo igualmente la ch^2 y el valor de $p < 0.05$ de significancia

Al analizar si se trataba de un caso de primera vez o recaída, contra los títulos positivos de anticuerpos se obtuvo una ch^2 : 1.368 y una p : 0.2421 ns, al analizar la respuesta a la BCG se obtuvo una ch^2 : 0.07778 y una p : 0.7803 ns, al analizar la respuesta al PPD se obtuvo una ch^2 : 0.0004769 y una p : 0.9826, al analizar la presencia y ausencia de cavernas pulmonares se obtuvo una ch^2 : 6.222 y una p : 0.0126, con un RR: 0.216 con un IC 95%: 0.03589 a 1.308 y un OR: 0.06 con un IC 95%: 0.006179 a 0.5826, remarcando con esto la relación que los pacientes que no presentaron cavernas pulmonares, presentaron en la mayoría de los casos títulos positivos contra la P-30/31, al analizar la respuesta al tratamiento se obtuvo una ch^2 : 14.83 y una p : 0.0001, mostrando que los pacientes con títulos positivos curaban en su mayoría al compararse con los pacientes con títulos negativos.

10.3. TERAPEUTICA

Todos los pacientes recibieron el TAES según las características de la enfermedad y a los criterios establecidos por la Norma Oficial de la Secretaria de Salud. A 3 pacientes se les modifico el tratamiento, a uno por insuficiencia renal crónica en fase de diálisis, a otro por neurotoxicidad secundario al uso de isoniacida y al tercero por resistencia secundaria documentada por pruebas de sensibilidad. Treinta y dos pacientes recibieron tratamiento primario y 23 secundario.

De los 55 enfermos, 29 curaron (53%), 13 no curaron (31%), y en 13 no hubo un seguimiento apropiado (31%). De los pacientes que no curaron, 3 fallecieron durante el periodo de observación, uno se agravó y en 4 no hubo modificaciones clínicas o radiograficas. Tres de estos se trataba de recaída por lo que probablemente cursaron con resistencia secundaria al tratamiento y el otro caso se trataba de un caso nuevo, probablemente relacionado con resistencia primaria. Cuatro pacientes abandonaron el tratamiento, 3 de ellos de primera vez y uno de recaída.

10.4. CORRELACIÓN ENTRE RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y PARAMETROS RELEVANTES

Los factores no inmunológicos que se relacionaron con una buena respuesta al tratamiento son en orden de importancia: la extensión de la enfermedad al ingreso. Se observó que el 92% de los pacientes con enfermedad localizada curaron, mientras que solo la mitad de los pacientes con enfermedad moderada o avanzada tuvieron una respuesta favorable. Es de interés que ninguno de los 3 pacientes con tuberculosis ganglionar respondió al tratamiento. También fue de importancia si la enfermedad era de primera vez, en cuyo caso curaban el 70% de los pacientes, a diferencia de los de recaída que curaron en un 40 %.

En cuanto a los factores inmunológicos, el antecedente de vacunación con BCG y una respuesta al PPD no tuvieron un impacto significativo. Los títulos de anticuerpos en contra de EPT tampoco tuvieron una relación con la respuesta al tratamiento; sin embargo se relacionaron con la extensión de la enfermedad, ya que a mayor extensión de la TB mayores títulos de anticuerpos, de los factores inmunológicos, la respuesta positiva de anticuerpos contra la P:30-31 por inmunoblot mostró una tendencia a relacionarse positivamente con una respuesta favorable al tratamiento (79%). En contraste los pacientes con resultados negativos por inmunoblot tuvieron una respuesta menor (52%). El factor inmunológico más importante como indicador pronóstico fue los títulos de anticuerpos por ELISA en contra de P-30/31, ya que de los 32 pacientes con títulos positivos, 23 curaron (72%). En contraste de los 10 pacientes con títulos negativos solo uno respondió al tratamiento.

	Ag85			CFP		
	N	%	N	N	%	N
BCG						
Vacunados	28	20	71.4	29	17	58.6
No Vacunados	17	12	70.5	18	14	77.1
TUBERCULINA						
Reactor	32	22	68.7	33	21	63.6
No reactor	13	10	76.9	14	10	71.4
CAVERNAS PULMONARES						
Presentes	6	1	16.6	7	7	100
Ausentes	39	31	79.4*	40	24	60
PRESENTACION CLINICA						
Primera vez	28	20	71.4	29	16	55.1
Recaída	17	12	70.5	18	15	83.3
RESPUESTA AL TRATAMIENTO						
Curo	24	23	95.8**	24	18	75
No Curo	21	9	42.8	23	13	56.5

Tabla 3. Se estudiaron 45 sueros con el ELISA con el Ag85 y 47 con CFP. *p:0.02, **p:0.0001

11. DISCUSION

En este trabajo estudiamos un grupo de pacientes de la zona sur del estado de Veracruz, región de México considerada por la Secretaria de Salud y Asistencia Pública como de incidencia media de 15.1 a 30 casos por 100 000 habitantes y de mortalidad alta: 4.1 a 8.0 por 100 000 habitantes (Dirección General de Epidemiología, SSA, 1995).

Los pacientes en su mayoría en indígenas de un estado socioeconómico muy bajo, con mal estado nutricional. Las características étnicas y socioeconómicas de este grupo de pacientes tienen, sin duda relación con algunas peculiaridades observadas en este estudio.

En relación con lo observado en otros estudios, en nuestro país (INDRE, México D.F, 1995) la tasa de curación usando el TAES es cercana al 70% esto depende fundamentalmente de la adhesión al tratamiento que es alrededor del 70% ya que la eficacia de los medicamentos es superior al 95%.

En muy pocos pacientes se pudo evaluar la drogoresistencia de las cepas de *M.tuberculosis* involucradas, por lo que no es posible evaluar este fenómeno como causa del fracaso terapéutico. Cinco pacientes murieron durante el curso de este estudio (6 meses) a consecuencia directa de la infección.

Una observación interesante fue el hecho de que 10 de los 55 pacientes tenían tuberculosis miliar, una incidencia muy alta en comparación de lo reportado en otras series. Es posible que la desnutrición severa de nuestros pacientes, la falta de vacunación con BCG en la infancia y una depresión concomitante de su capacidad inmunológica de lugar a una frecuencia mayor de formas hematogénas de tuberculosis.

El objetivo principal de este trabajo fue investigar si la respuesta inmune antimicobacteriana, celular o de anticuerpos, influenciaba de alguna manera la tuberculosis, sea en su presentación o en su curso, y particularmente en la respuesta al tratamiento. Generalmente, los estudios que abordan el tema de los factores pronósticos se han enfocado a la presentación clínica de la infección, su extensión radiológicamente determinada, si se trata de un ingreso de primera vez o de recidiva y si la cepa de *M.tuberculosis* involucrada es o no resistente a la quimioterapia antifimica habitual.

En la actualidad la importancia de los factores inmunológicos en el curso y pronóstico de la tuberculosis ha sido puesta de relieve por la aparición de la infección por el virus de la inmunodeficiencia adquirida. Los pacientes con SIDA, que presentan una disminución marcada de los linfocitos T con el fenotipo de ayuda (CD4 +) son muy susceptibles a la infección y el curso de la enfermedad es más devastador que en el individuo sano (5,16,47).

Por otra parte, el perfil inmunológico de pacientes tuberculosos sin SIDA, como son los pacientes incluidos en esta investigación, ha sido poco analizado. El trabajo pionero a este respecto fue realizado por Lenzini y col. En 1977 (27) quienes documentaron una correlación indirecta entre la respuesta dérmica al PPD y la gravedad de la infección. Así mismo observaron que a mayor respuesta de anticuerpos el paciente tenía una enfermedad más grave y un curso desfavorable. Aparte de este trabajo no existen otros abordando de manera extensa el tema del perfil inmunológico y su influencia en la gravedad de la infección por el bacilo de la tuberculosis.

En lo que concierne a los factores no inmunológicos y en concordancia con lo reportado en la literatura, corroboramos que el factor pronóstico más importante en el paciente tuberculoso es sin duda la extensión de la enfermedad al ingreso. Utilizando la clasificación radiológica del Consejo Médico Británico, para evaluar la extensión de la enfermedad, observamos que los pacientes con tuberculosis miliar, tenían una respuesta al TAES del 50% en contraste con los pacientes con enfermedad localizada que respondieron en un 92%. Otro indicador pronóstico significativo fue el que se tratara de un caso de primer ingreso o recaída, pues los pacientes recidivantes respondían al tratamiento en un 41% y los de primer ingreso se curaban en una proporción significativamente más alta (70%). Pueden ser múltiples los factores que expliquen el fracaso terapéutico en los pacientes recidivantes; uno de ellos es la posibilidad de que sean portadores de cepas de *M.tuberculosis* resistentes a los antibióticos (46).

Enseguida nos referimos al efecto de algunos indicadores inmunológicos sobre la gravedad de la tuberculosis, en particular sobre la extensión y la respuesta al tratamiento. En primer lugar esta la inmunización con BCG. Nuestras observaciones confirman que la vacunación con BCG no garantiza

una resistencia efectiva en contra de esta infección pues cerca de la mitad de los pacientes incluidos en este estudio habían sido vacunados. Hay ya múltiples observaciones que muestran que el BCG tiene un efecto muy variable. En algunas regiones la protección proporcionada ha sido prácticamente absoluta (61) mientras que en otras, la protección a sido nula y no se han modificado significativamente las tasas de infección (62). Hay varias posibles explicaciones para el fracaso relativo de la vacunación con BCG como son un mal manejo del reactivo, desnutrición, inmunodeficiencias y una alta exposición a micobacterias saprofitas (63). A pesar de las observaciones anteriores, la vacunación con BCG debe ser considerada aún como instrumento útil en la lucha en contra de la tuberculosis; uno de sus efectos benéficos es que en las poblaciones vacunadas se observa una disminución significativa de la incidencia de tuberculosis meníngea (64) una complicación que resulta de una diseminación hematogena de la infección. Observaciones hechas en este trabajo apoyan de alguna manera lo anterior, ya que 7 de los 10 casos de TB miliar no habían sido vacunados. No hay todavía una explicación adecuada para este fenómeno.

Se han hecho múltiples observaciones en tuberculosis humana y experimental que han venido a demostrar de manera inequívoca que la resistencia inmunológica en contra del bacilo de la tuberculosis descansa en la inmunidad celular, la cual esta mediada fundamentalmente por los linfocitos T en particular por los linfocitos T de ayuda o cooperadores (CD4+). Lo anterior justifica nuestro interés en conocer el estado de la inmunidad celular en el paciente tuberculoso y su relación con la gravedad de la infección. En la actualidad hay varias formas de evaluar la respuesta inmune celular, como son la respuesta in vivo o in vitro al PPD o a otras preparaciones antigénicas, analizar el fenotipo de los linfocitos T circulantes y cuantificar las citocinas de origen linfocitario en la circulación. En este estudio hemos utilizado el método más fácil de implementar que es la respuesta a la aplicación intradérmica de PPD, una mezcla compleja de péptidos micobacterianos.

Nuestras observaciones no confirman la expectativa de una menor gravedad de la tuberculosis en el paciente con evidencias de una respuesta inmune celular antimicobacteriana, ya que en los pacientes PPD positivos y

negativos, la extensión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento no difirieron de manera significativa. Esto contrasta con lo reportado por Lenzini y col (27) quienes documentaron un curso mejor de los pacientes con respuesta al PPD. Lo anterior puede interpretarse de diversas maneras, una de ellas es que la respuesta al PPD aún siendo una evidencia de una respuesta inmune celular antimicobacteriana, no refleja de manera completa la competencia de los linfocitos T y que otros factores aun no definidos son también importantes en la resistencia a la infección. En este estudio la respuesta al PPD se definió en cuatro tiempos: 6, 24, 48 y 72 hrs. Es de interés que en el 29% de los casos se observó una respuesta significativa a las 6 horas. El significado de esta respuesta no es claro, pero cabe mencionar que en todos los casos en los que se observó hubo una respuesta tardía importante. Estos hallazgos son semejantes a los reportados por Lenzini y col (27) quienes propusieron que la respuesta temprana podría ser una hipersensibilidad basofílica.

La síntesis de anticuerpos en pacientes con tuberculosis y en modelos experimentales está muy bien documentada (9,58,60). El significado de esta respuesta no es enteramente claro. Muchos investigadores han propuesto el concepto de que hay una relación directamente proporcional entre síntesis de anticuerpos y gravedad de la enfermedad. Así mismo se han hecho observaciones que parecen indicar que hay una relación inversa entre inmunidad humoral y celular (6,15). Todo lo anterior ha llevado a la conclusión generalizada casi de que una respuesta humoral en tuberculosis favorece el desarrollo de esta infección. Esta idea se ha reforzado con las observaciones recientes que muestran que una respuesta T de tipo Th2, asociada a una síntesis de anticuerpos tiene un efecto negativo sobre la tuberculosis mientras que una respuesta Th1 es protectora.

En este estudio analizamos la respuesta de anticuerpos por inmunoblot que es un método de gran utilidad pues da información no solo cuantitativa sino que también cualitativa, pues permite identificar antígenos involucrados en esta respuesta. Una observación que llamó la atención fue la pobreza de la respuesta observada por este método manifestada por una escasez de bandas antigénicas reactivas en comparación con estudios previos realizados en

nuestro laboratorio con suero de pacientes obtenidos de hospitales de concentración en los cuales se ha demostrado una reactividad muy importante. Hubo 21 casos que se consideraron negativos, 5 de estos con reconocimiento nulo. Por lo anterior se puede considerar a este método con muy baja sensibilidad para el diagnóstico de la tuberculosis. Se puede especular que esta pobre reactividad esta relacionada con el hecho de que muchos pacientes tenían tuberculosis avanzada. Esta idea se refuerza por el hecho de que los 5 pacientes con reconocimiento nulo, 3 tuvieron tuberculosis miliar y los restantes enfermedad avanzada y la respuesta al tratamiento en estos casos fue muy baja.

El inmunoblot demostró que el antígeno más frecuentemente reconocido era el doblete de 30/31, un complejo proteico ampliamente estudiado y reconocido por su alta inmunogenicidad, tanto en el ámbito celular como en el ámbito humoral. Estos hallazgos justificaron el hecho de realizar los estudios con P-30/31 por ELISA que ha continuación se mencionaran el análisis cualitativo de la respuesta inmune humoral se realizo por ELISA, método que se ha utilizado de manera reiterada en el pasado. Utilizando un extracto proteico completo obtenido del medio de cultivo, observamos que la sensibilidad diagnóstico del método era de 57% mientras que la especificidad fue del 100%. Estos resultados son también menores que los previamente reportados tanto en nuestro laboratorio y en otros estudios. De nuevo este hallazgo sugiere que los casos estudiados son muy avanzados lo que conlleva a un deterioro global de la respuesta inmune.

En vista de los estudios de inmunoblot que demostraron que el antígeno más frecuentemente reconocido era el doblete de 30/31 kD, este antígeno proteico se purifico y analizó por ELISA. El ELISA con el antígeno de 30/31 kD dio resultados inesperados e interesantes. En primer lugar la sensibilidad fue mayor que con el EPT (71%) lo cual esta de acuerdo con el reporte previo en el que se observó que este antígeno era reconocido con alta frecuencia en pacientes con tuberculosis pulmonar.

La respuesta al tratamiento en este grupo de pacientes fue muy pobre en relación con resultados reportados obtenidos con el TAES en otros países. En

los pacientes que completaron el esquema solo 55 % curaron que esta por debajo de lo reportado en otros estudios. Las causas de este fracaso son múltiples siendo el principal factor la extensión de la enfermedad al inicio del tratamiento, que como observamos una gran proporción de pacientes presentaban cuadros avanzados y miliares. Los pacientes con enfermedad localizada curaron en su gran mayoría, mientras que solo la tercera parte de los que tenían enfermedad moderada y avanzada curaron. Desde luego no se puede descartar que en esta región existan cepas de alta virulencia, como las que se han reportado en algunas regiones del mundo. Desafortunadamente no fue posible analizar en este estudio la existencia de cepas multidrogoresistentes, que se ha reportado como uno de los principales en el fracaso terapéutico. El segundo factor pronóstico importante fue el que se tratara de un paciente de primera vez o de una recaída; Los pacientes de primer ingreso curaron en un gran porcentaje más que los de recaída con resultado estadísticamente significativo.

En lo que concierne a la respuesta inmune humoral en la enfermedad, se encontró un hallazgo estadísticamente significativo de que los paciente positivos por inmunoblot tuvieron una tasa mayor que los negativos. Por otra parte los títulos de anticuerpos por ELISA en contra del EPT no tuvieron ninguna correlación con la respuesta al tratamiento; Sin embargo si hubo relación entre la respuesta humoral al EPT y la extensión de la enfermedad, ya que los pacientes con títulos más altos tenían enfermedad avanzada, lo que concuerda con otras observaciones utilizando el PPD en pruebas de hemaglutinación (27).

El ELISA utilizando la proteína purificada de 30/31 kD dio resultados inesperados y de mucho interés. Los pacientes con títulos positivos curaron en su gran mayoría (72%). El análisis estadístico con la chi cuadrada dio resultados altamente significativos. Las posibilidades de curación se relaciono con la magnitud de la respuesta a los anticuerpos. Los pacientes con títulos más altos curaron en un 68% y solo uno de ocho pacientes con títulos bajos curó. Cabe mencionar que no hubo una correlación entre la respuesta a P-30/31 y la respuesta intradérmica al PPD.

12. CONCLUSIONES

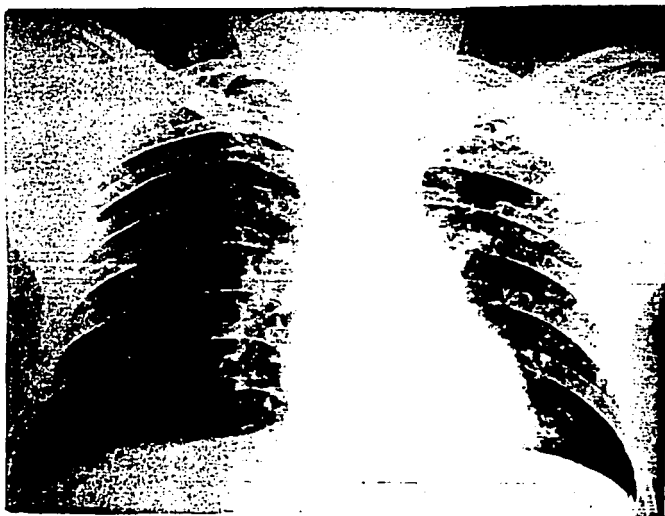
1. El perfil inmunológico de los enfermos con tuberculosis depende no solo de la extensión de la enfermedad sino también de factores bien conocidos como lo es el estado nutricional, el antecedente de vacunación con BCG, la exposición a micobacterias no patógenas y a factores poco estudiados como los factores genéticos.
2. En la población analizada se observó una proporción mayor de pacientes con enfermedad miliar relacionada directamente con la falta de vacunación con BCG y no podemos descartar que existan zonas geográficas en México con cepas más virulentas.
3. Entre los factores importantes identificados en este estudio encontramos factores no inmunológicos como el antecedente de enfermedad previa y la extensión de la enfermedad y entre los factores inmunológicos observamos que el antecedente de vacunación con BCG no brinda una protección contra el desarrollo de la enfermedad si no más bien influye en la disminución de las formas severas en la población vacunada. La respuesta al PPD no se relaciona con una buena respuesta al tratamiento ni con la extensión de la enfermedad. Los títulos de anticuerpos detectados por ELISA con un extracto proteico completo de *M. tuberculosis* no se relacionan con la extensión de la enfermedad ni con la respuesta al tratamiento. Los anticuerpos detectados por inmunoblot se relacionaron con una buena respuesta al tratamiento. Los títulos de anticuerpos detectados por ELISA con la proteína de 30/31 kD fue el factor con mayor valor pronostico para predecir una buena respuesta al tratamiento.
4. El análisis inmunológico de la respuesta celular y humoral del paciente con tuberculosis puede servir como indicador pronostico ya que como observamos en este estudio puede predecir una buena respuesta al tratamiento, además de indicarnos el estado inmune del paciente durante el curso de la enfermedad.

11. CASOS QUE EJEMPLIFICAN EL ESPECTRO DE LA TUBERCULOSIS.

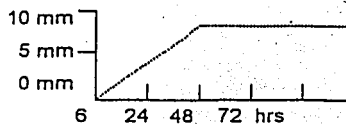
Enseguida se presentan caso con un resumen de sus historias clínicas, radiografías y otros datos que ejemplifican el amplio espectro de la tuberculosis encontrado en este grupo de estudio.

Caso 1. Paciente 23, correspondiente al polo reactivo. Hombre de 49 años, con síntomas generales, tos, hemoptisis, fiebre de 1 año de evolución, con disnea de medianos esfuerzos desde un mes previo a la consulta, antecedente de vacunación con BCG, COMBE positivo, se le realizó BAAR en expectoración, resultando positivo ++, a) Radiografía con afección del segmento apical del lóbulo superior izquierdo, respuesta al PPD positiva, títulos de anticuerpos por ELISA con EPT negativos (0.049), títulos positivos (0.555) con P-30/31. Se le inicio tratamiento primario acertado reforzado con etambutol, con buena respuesta.

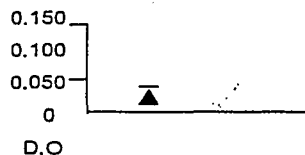
a)



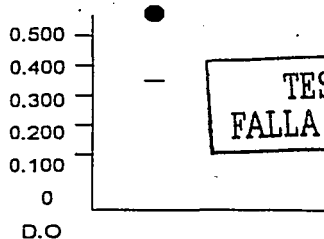
RESPUESTA AL PPD



ELISA con EPT



ELISA con P-30/31

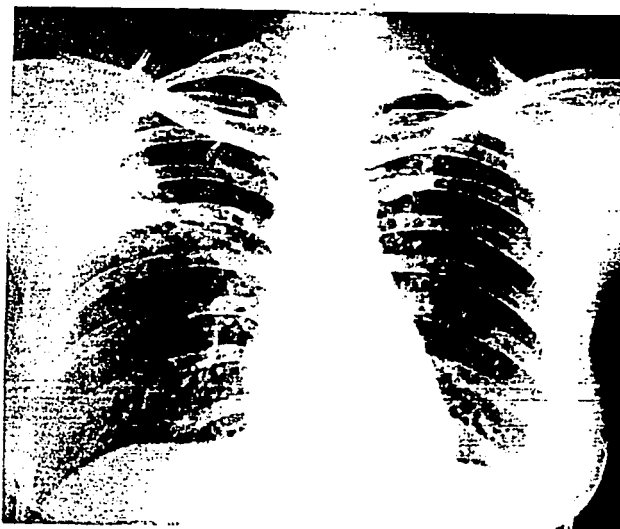


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

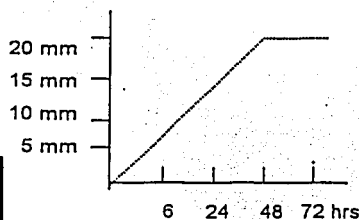
ESTA TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA

Caso 2. Paciente 24, correspondiente al polo reactivo-parcia. Mujer de 49 años de edad con diabetes mellitus tipo 2 de 10 años de evolución controlada con hipoglicemiantes orales, síntomas generales, tos, fiebre, hemoptisis, de año y medio de evolución, se agrega descompensación metabólica por lo que acudió nuevamente a valoración, antecedente de vacunación con BCG, esposito finado por TB un año antes, BAAR en expectoración negativo, cultivo de espectoración positivo. a) Radiografía con afección localizada en el segmento apical del lóbulo inferior derecho, respuesta positiva al PPD, títulos de anticuerpos con EPT positivos (0.144), y títulos positivos (0.409) con P-30/31. Se inicio tratamiento primario reforzado con etambutol con buena respuesta.

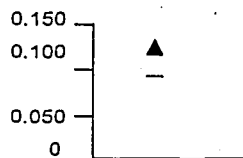
a)



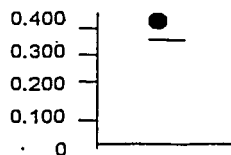
RESPUESTA AL PPD



ELISA CON EPT



ELISA CON P-30/31

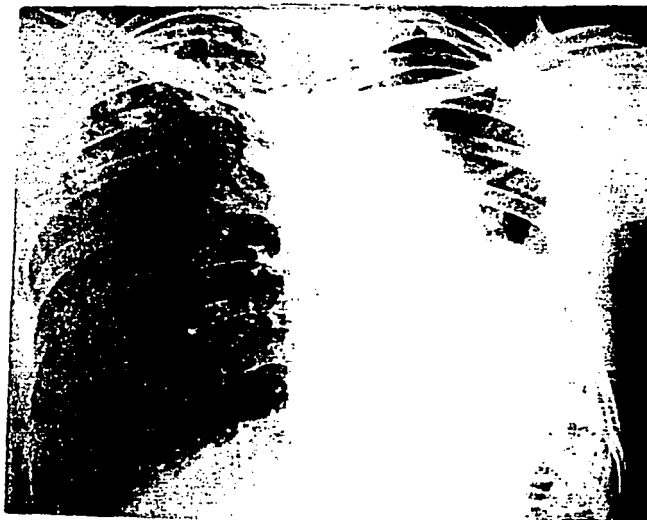
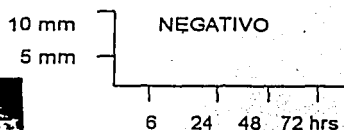


TESIS CON FALLA DE ORIGEN

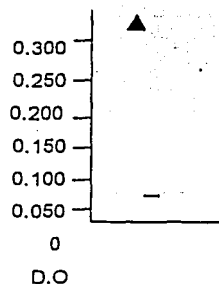
Caso 3. Paciente 27, correspondiente al polo areactivo parcial. Hombre de 35 años, con antecedente de TB hace 2 años, acude por síntomas generales, tos, hemoptisis, fiebre y pérdida importante de peso, sin vacunación con BCG, COMBE +, BAAR +, a) Radiografía con afección del pulmón izquierdo, con retracción traqueal a la izquierda, hipertrofia compensatoria derecha, respuesta al PPD negativa, títulos positivos con EPT (0.302) y con P-30/31 (0.467). Se le administro tratamiento con 4 antifímicos, con buena respuesta al tratamiento.

a)

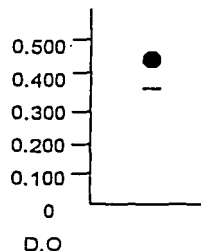
RESPUESTA AL PPD



ELISA CON EPT



ELISA CON P-30/31

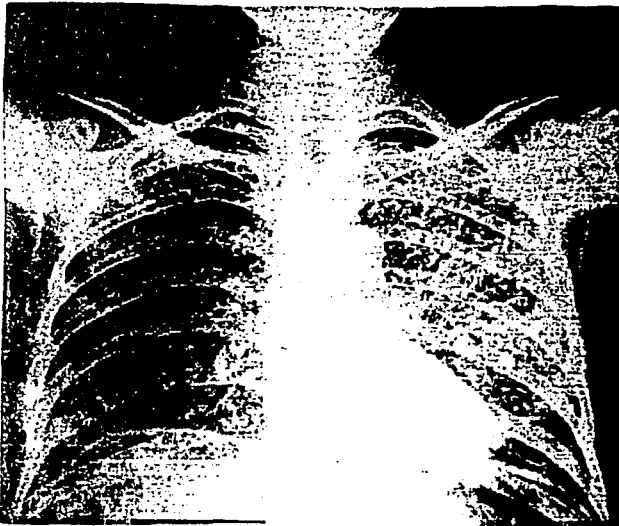
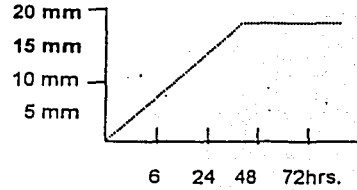


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

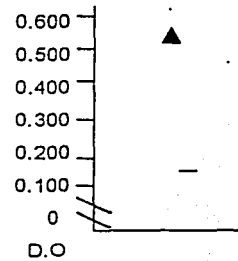
Caso 4. Paciente 2, correspondiente al polo areactivo- areactivo. Masculino de 36 años de edad, con síntomas generales de más de un año de evolución con astenia, adinamia, pérdida de peso, tos, hemoptisis y fiebre, BAAR positivo +, cultivo negativo a) Radiografía con infiltrado miliar característico, PPD positivo, títulos con EPT positivos altos (0.564), títulos con P- 30/31 positivos altos, (2.044).

a)

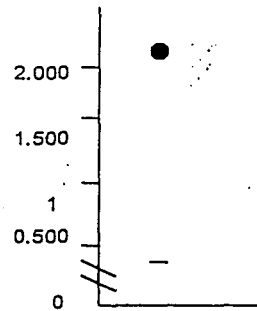
RESPUESTA AL PPD



ELISA CON EPT



ELISA CON P- 30/31

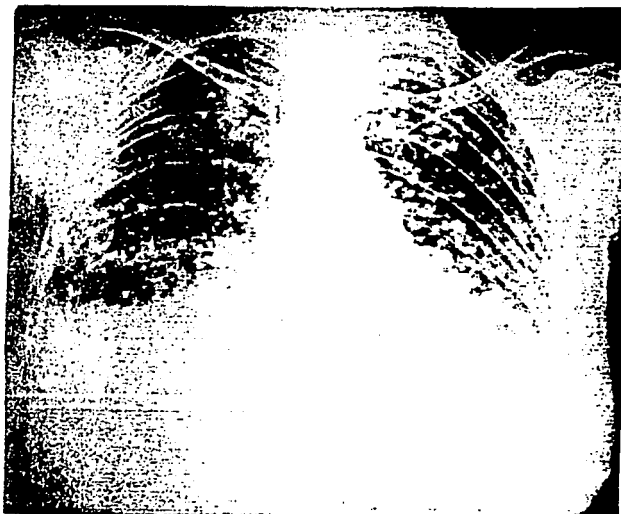


D.O

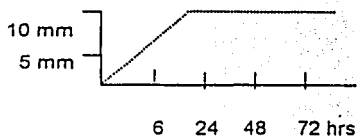
TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Caso 5. Paciente 50, correspondiente al polo areactivo-areactivo. Masculino de 28 años, con historia de síntomas generales, tos, fiebre, diaforesis y hemoptisis, COMBE +, PPD +, BAAR positivo +++, en la radiografía con afección bilateral con infiltrado micro y macronodular, así como afección apical del lóbulo superior izquierdo con infiltrado macronodular con tendencia a confluir, clínicamente con síndrome de condensación pulmonar apical y sibilancias diseminadas, títulos con EPT (0.037) y con P-30/31 (0.351) por ELISA negativos.

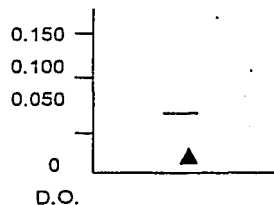
a)



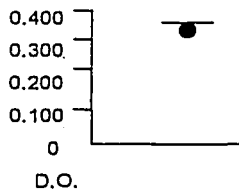
RESPUESTA AL PPD



ELISA CON EPT



ELISA CON P-30/31



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

14. REFERENCIAS

1. American Thoracic Society, Medical Section of the American Lung Association. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1990; 142: 725 - 35.
2. Dolin P, Dye C, Raviglione M and Kochi A. WHO Global tuberculosis programe. *Geneva, 1998.*
3. Weyer, K., and Kleeberg H. Prymary and acquired drug resistance in adult black patients with tuberculosis in South Africa: results of a continuous national drug surveillane programme involvement. *Tuberc Lung Dis.* 1992; 73: 102 - 12.
4. Jacobs R4F. Multiple-Drug- resistant Tuberculosis. *CID* 1994; 19: 1-10
5. Narain, J. P. Raviglione, and Kochi A. HIV associated tuberculosis in developing countries: epidemiology and strategies for preventio. *Tuberc Lung Dis.* 1992; 73: 311 - 21.
6. Unanue ER. Cooperation between mononuclear phagocytes and lymphocytes in immunity. *N Engl J Med* 1980; 303: 977-85
7. Garland J. Deleterious effects of ACTH and cortisone on tuberculosis. *N Engl J Med* 1951; 245: 662-4
8. Parmer EG. Cellular immunity to intracellular bacteria. *Current Opinion in Immunology* 1993; 5: 492- 6.
9. David HL, Papa F, Cruaud P, Berlie HC, Maroja MF. Relationships between titers of antibodies immunoreacting against glycolipid antigens from *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis*, the Mitsuda and Mantoux reactions and bacteriological loads: Implications in the pathogenesis epidemiology and serodiagnosis of leprosy and tuberculosis. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1992; 60:208- 24.
10. Golfeld AE, Delgado JC, Thim S, Bozon MV, Uglialoro AM, Turbay D, Cohen C, Yunis EJ, Association of HLA DQ allele with clinical tuberculosis. *JAMA* 1998; 279 :226-8

11. Selvaraj P, Reetha AM, Uma H, Xavier T, Tanardhanam B, Prabhakar R, Narayanan PR. Influence of HLA-DR and DQ phenotypes on tuberculin reactive status in pulmonary tuberculosis patients. *Tuber Lung Dis* 1996; 77: 369-73
12. Thompson-Snipes, Skamene E, Radzioch D. Acquired resistance but Not Innate Resistance to Mycobacterium bovis Bacillus Calmette- Guérin Is Compromised by Interleukin-12 ablation. *Infec Immun* 1998; 5268-74
13. Schurr E, Malo D, Radzioch D, Buschman E, Morgan K, Gros P and Skamene E. Genetic control of innate resistance to mycobacterial infections. *Immunol Today* 1991; 12: A42-5
14. McLeod R, Buschman E, Arbuckle D and Skamene E. Immunogenetics in the analysis of resistance to intracellular pathogens. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 539-52
15. Modlin R. L. And Nutman T. B. Type 2 cytokines and negative immune regulation in human infections. *Curr Opin Immunol* 1993; 5: 511- 7.
16. Romagnani S. Lymphokine production by human T cell in disease states. *Am Rev Immunol.* 1994; 12: 227-57.
17. T. M. Daniel. The immune spectrum in patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1981; 123: 556 - 59.
18. Sánchez F. O. Rodríguez J. I. Agudelo G and García L. F. Immune responsiveness and Lymphokine production in patients with tuberculosis and healthy controls. *Infec Immun* 1994; 62: 5673- 78
19. Berger H. W., M. D., and Samartin T. G. M. D. Miliary Tuberculosis: Diagnostic Methods with emphasis on the Chest Roentgenogram. *Chest.* 1970; 58: 586-9
20. Marshall JB. Tuberculosis of the gastrointestinal tract and peritoneum. *Am J Gastroenterol. Review* 1993; 88: 989- 99.
21. Shah S, Thomas V, Mathan M, Chandy G, Ramakrishna BS, Rolston DK. Colonoscopic study of 50 patients with colonic tuberculosis. *Gut* 1992; 33: 347-51
22. Campo E, Condom E, Miro J, Cid C, Romagosa V. Tuberculosis-Associated Hemophagocytic Syndrome. A systemim Process. *Cancer* 1986; 58: 2640-45

23. Lombard EH, Manselt ep. Haematological changes associated with miliary tuberculosis of the bone marrow. *Tuber Lung Dis* 1993; 74: 131-35
24. Cassim KM, Gathiram V, Jogessar VB. Pancytopenia associated with disseminated tuberculosis, reactive histiocytic haemophagocytic syndrome and tuberculous hypersplenism. *Tuber Lun Dis* 1993; 74: 208-10
25. Grieco M. H., Chmel H. Acute disseminated tuberculosis as a diagnostic problem. A clinical study based en twenty- eight cases. *Am Rev Respir Dis.* 1974; 109: 554-60.
26. Rajni Bhatnagar, A. N. Malaviya, S. Narayanan, Premavathi Rajgopalan, R. Kumar and O. P. Bharadwaj. Spectrum of Immune response abnormalities in different clinical forms of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1977; 115: 207-12
27. Lenzini L, Rottoli P and Rottoli L. The spectrum of human tuberculosis. *Clin exp Immunol.* 1977; 27: 230 - 7.
28. Chaplin CV. Sources and modes of infection. New York: Jhon Wiley and Sons, 1910:253
29. Ober WB. Ghon for not forgotten: Anton Ghon and his complex. *Pathol Annu.* 1983;18: 79-85.
30. Tsitoura DC, Gelder CM, Kemeny DM, Lamb JR. Regulation of cytokine production by human Th0 cells following stimulation with peptide analogues: differential expression of TGF- β in activation and anergy. *Immunology* 1997; 92:10-19
31. Young DB. Blueprint for white plague. *Nature*, 1998
32. Mosmann T. R., Cherwinski H, Bond M. W., Giedlin M. A. and Coffman R. L. Two types of murine helper T cell clone. *J Immunol* 1986; 136: 2348 - 57.
33. Kaplan G. Cytokine regulation of disease progression in leprosy and tuberculosis. *Immunobiology* 1994; 191: 564-8.
34. Lin Y, Zhang M, Hofman FM, Gong J, Barnes PF. Absence of prominent Th- 2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect Immun* 1996; 64: 1351-6.
35. Wilson M, Seymour R and Henderson B. Bacterial perturbation of cytokine networks. *Infect Immun* 1998; 66: 2401-09
36. Stead WW. The iceberg of medicine: Tuberculosis. *Radiol Clin North Am.*

- 1965; 3:299-304.
37. Kubica, GP, Gross W M, Hawkina JE, Sommers HM, AL Vestal and Wayne LG. Laboratory services for mycobacterial diseases. *Am Rev Respir Dis.* 1975; 112: 773- 87
 38. Cohn, M. L., R. F. Waggoner, and J. K. McClatchy. The 7H11 medium for the culture of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis.* 1968; 98: 295 - 6.
 39. Kulski JK, Pryce T. Preparation of mycobacterial DNA from blood culture fluids by simple alkali wash and heat lysis method for PCR detection. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 1985-91
 40. Bennedsen J, Thomsen VO, Pfyffer GE, Funke G, Feldmann K, Beneke A, Jenkins PA, Hegginsbothom M, Fahr A, Hengstler M, Cleator M, Klapper P, and Wilkins EG. Utility of PCR in diagnosing pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1996;34:1407-11.
 41. Longfield, J. N. Tuberculin skin testing. *Ann Intern Med.* 1997; 121: 334
 42. Herbert WJ. Passive haemagglutination with special reference to tanned cell technique. In: Weir DM, ed. *Handbook of experimental immunology.* Oxford : Blackwell, 1978;20: 1-20.
 43. Espitia C, Cervera I, Gonzalez Rand Mancilla R. A 38-kD Mycobacterium tuberculosis antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation. *Clin Exp Immunol* 1989; 77: 373-77
 44. Dennis J Reen Enzyme linked Immunosorbent assay (ELISA). *Methods in Molecular Biology . Vol. 32. Basic and peptide protocols.* 1994.
 45. Glatman-Freedman A, Cassadevall A. Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody mediated immunity against Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:514-32.
 46. Weis SE, Slocum PC, Blais F X, King BRN, Foresman BH. The Effect of directly observed therapy on the rates of drug resistance and relapse in tuberculosis. *N Engl J Med* 1994. 330:1179- 84.
 47. García-García ML, Valdespino-Gómez JL, Palacios- Martínez M, Mayar-Maya ME, García-Sancho C, Sepulveda-Amor J. Tuberculosis y SIDA en México. *Salud Pública de México* 1995; 37: 539-47.

48. Iseman MD. Treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *N Engl J Med* 1993; 329: 784-91
49. Norma Oficial Mexicana: *Diario de la Federación*, Enero 1995.
50. Youmans, GP. *J. Bact.* 51:703,1946
51. Seibert FB, Isolation of three different proteins and two polysaccharides from tuberculin by alcohol fractions, their chemicals and biological properties. *Am Rev Tuberc* 1949; 59: 86-101.
52. Laemli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227:680- 85
53. Dawson-Saunders B and Trapp RG. Bioestadística Médica. Manual moderno. 1993, Ed. 1.
54. Berger HW, Granada G. Lower Lung Field Tuberculosis. *Chest* 1974; 65: 522-26
55. Choyke PL, Sostman HD, Curtis AM, Ravin CE, Chen JT, Godwin JD, Putman CE. Adult-onset pulmonary tuberculosis. *Radiology* 1983;148:357-62
56. Korzeniewska M, Krysl J, Müller N, Black W, Ellen E, FitzGerald M. Tuberculosis in young adults and the elderly. A prospective Comparison study. *Chest* 1994; 106: 28-
57. Ramírez Gama. Resección pulmonar en tuberculosis, University, 1958.
58. Havlir DV, Wallis RS, Boom WH, Daniel TM, Chervenak K, Ellner JJ. Human immune response to Mycobacterium tuberculosis antigens. *Infect Immun* 1991; 59: 665-70
59. Collins F, Lamb Rand Young B. Biological Activity of Protein Antigens Isolated from Mycobacterium tuberculosis Culture Filtrate. *Infec Immun* 1988; 56:1260-66
60. Espitia C, Sciutto E, Bottasso O, Gonzalez-Amaro R, Hernández-Pando R, Mancilla R, High antibody levels to the mycobacterial fibronectin-binding antigen of 30-31 kD in tuberculosis and lepromatous leprosy. *Clin exp Immunol* 1992; 87: 362-7

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Accept -

To: mancilla@servidor.unam.mx
From: iorme@lamar.colostate.edu
Date: Apr 22, 2002
CC: iorme@lamar.colostate.edu
Subject: IJTLD-02-02-0037.R1

Dear Dr. Raúl Mancilla:

Thank you for sending us the revised version of your article entitled

"AN IgG ANTIBODY RESPONSE TO THE ANTIGEN 85 COMPLEX IS ASSOCIATED WITH A GOOD OUTCOME IN MEXICAN TONONACA INDIANS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS"

and your reply to the reviewers' comments.

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted

for publication in The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease subject to the usual editorial revisions.

Your article will appear in one of the forthcoming issues of the Journal.

Please send the full list of authors and institutions, your full correspondence address, and any Figures by e-mail attachment to the Editorial Office (journal@iatld.org). If your tables were uploaded as images, or the full article was uploaded in PDF format, please also send these by e-mail attachment in Word. Finally, please ensure that you have faxed in the signed copyright form.

With kind regards,

Sincerely,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dr. Ian Orme

Close Window

Manuscript Central™ v1.42 (patent pending). Copyright © ScholarOne, Inc., 2002. All Rights Reserved.

ScholarOne Privacy Policy

Manuscript Central is a trademark of ScholarOne, Inc. Terms and Conditions of Use

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AN IgG ANTIBODY RESPONSE TO THE ANTIGEN 85 COMPLEX IS ASSOCIATED WITH A GOOD OUTCOME IN MEXICAN TONACA INDIANS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS.

Cristina Sánchez-Rodríguez^{1,2}, Ciro Estrada-Chávez¹, José García-Vigil², Fernando Laredo-Sánchez², Jose Halabe-Cherem², Ana Pereira-Suárez¹ and Raúl Mancilla¹.

Key words: tuberculosis, antibody, immunoblot, ELISA, prognosis, antigen 85 complex, chemotherapy, Totonaca Indians.

1, Departamento de Inmunología
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

Apartado postal # 70-228, CP 04510, México D.F.

2, Departamento de Medicina Interna

Hospital de Especialidades

Centro Médico Nacional Siglo XXI
Av. Cuauhtemoc # 330. CP 6720, México, D.F.

Corresponding Author:
Raúl Mancilla, M.D.
Departamento de Inmunología
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Apartado postal: 70-228, CP 04510, México D.F.

Fax: (525) 6223369

Telephone: (525) 6223858

E-mail: mancilla@servidor.unam.mx

ABSTRACT

SETTING: It is generally accepted that antibodies do not protect against *Mycobacterium tuberculosis* infection, this role lying upon T-cell reactivity.

AN IgG ANTIBODY RESPONSE TO THE ANTIGEN 85 COMPLEX IS ASSOCIATED WITH A GOOD OUTCOME IN MEXICAN TOTONACA INDIANS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS.

SUMMARY

SETTING: It is generally accepted that antibodies do not protect against *Mycobacterium tuberculosis* infection, this role lying upon T-cell reactivity. Hence, most studies on antimycobacterial antibodies have been aimed to develop serologic tests and few explore their role in disease pathogenesis. **OBJECTIVE:** To determine the IgG antimycobacterial antibody response of 55 Mexican Totonaca Indians with pulmonary tuberculosis and its correlation with some features of the disease.

DESIGN: Study of the profile of antigen recognition by immunoblot; ELISA with isolated antigen 85 complex (Ag85) and whole culture filtrate proteins; correlation of immunoblot and ELISA results with BCG vaccination, tuberculin reactivity, extent of the disease, clinical setting, and response to treatment.

RESULTS : By immunoblot band reactivity was very poor and the most frequently recognized antigen was the 30-32 kDa, antigen 85 complex (45.8 % of sera). ELISA with this antigen showed a sensitivity of 72 % and a specificity of 100 %. Positive antibody titers to Ag85 were observed in 79.4% of patients with non-cavitary tuberculosis ($p=0.012$) and in 95.8 % of patients who cured with antituberculous chemotherapy ($p=0.0001$). In contrast, an antibody response to whole culture filtrate antigens had no correlation with the presence of cavitations or with prognosis.

CONCLUSIONS: our data show that an antibody response to Ag85, aside from having a great potential to develop a serologic test for tuberculosis, is associated with a good outcome in the cohort of tuberculous Mexican Indians we studied.

KEY WORDS: tuberculosis, antibody, immunoblot, ELISA, prognosis, antigen 85 complex, chemotherapy, Totonaca Indians.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCTION

The resurgence of tuberculosis (TB) is a health problem of paramount importance in developing countries where 90% of the cases occur (1). This situation will worsen in the near future with 225 million new cases and 79 million deaths predicted to occur between 1998 and 2030 (2). In Mexico there has been a sustained increase of reported cases during the last decade with an estimated rate of 51.7 cases per 100,000 inhabitants for 1995 (3). The mainstay of the strategy to control TB is the early diagnosis followed by a supervised treatment with at least 3 antituberculous drugs for at least six months (4). TB diagnosis is confirmed by retrieving bacilli in acid-fast smears or cultures. Recently, new diagnostic methods have been developed, including radiometric assays, DNA probes and chromatography of mycolic acids (5), which are not available in rural regions of developing countries. Hence, practical and inexpensive assays are badly needed to face the challenge posed by increasing TB in countries like Mexico (6). Analysis of the immune response to the tubercle bacilli has been used to develop diagnostic tests. The widely used tuberculin test that reveals delayed-type hypersensitivity to micobacteria, a form of cell-mediated immunity (7),

is useless in Mexico where two thirds of healthy persons develop a positive dermal reaction to tuberculin (8). Moreover, tuberculin reactions do not discriminate reactivity due to BCG vaccination or exposure to environmental non-pathogenic mycobacteria from active tuberculosis (7). Regarding antibody-based tests, a number of strongly seroreactive antigens have been identified (9-13) but there is not at present a universally accepted serologic test (12). Recently, there has been renewed interest in developing more specific and sensitive serologic tests, a difficult task because the repertoire of antigens recognized by anti-mycobacterial antibodies varies according with a number of factors including evolution time, extent and severity of the disease, association with HIV and the genetic background of patients (9-11,13-15). Therefore, it will be important to analyze the specificities of the antibody response of different cohorts in order to define antigens that will serve to develop serologic tests of wide applicability.

In this prospective work we analyzed the antibody response of a group of Totonaca Indians with pulmonary TB recruited in a rural health care center in Veracruz, the state with the highest rate of tuberculosis in Mexico (16). By immunoblot the dominant antigen was the antigen 85 complex (Ag85) and by ELISA positive titers to this antigen were found to correlate with less advanced disease and with response to chemotherapy.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

STUDY POPULATION AND METHODS.

Sera

The study population included 55 patients with pulmonary tuberculosis prospectively recruited in a rural clinic of the state of Veracruz. Thirty-two were cases of newly acquired tuberculosis and 23 patients were admitted with relapsing tuberculosis. All patients were poor Totonaca Indians, recognized by their dialect and physical features; 26 were men and 29 were women, ranging from 17 to 70 years of age (mean, 40 years). All patients were malnourished, 77 % of them severely. Clinically, all patients complained of asteny, adinamy, and anorexia. Other symptoms present were fever and cough (95%), diaphoresis (84%), hemoptysis (69%) and dyspnea (34%). Following criteria of the American Thorax Society (17), on chest-X-rays, 26 patients were classified as having localized, unilateral disease and 29 had advanced disease (19 bilateral involvement, 10 milliary). Seven patients with advanced disease had cavitary lesions. On admission, all patients were tuberculin tested by intradermal injection of PPD (5,UT). At 72 h, 38 patients were positive with indurations measuring 10 or more mm in diameter. Acid-fast sputum smears, performed in all patients, were positive in 39 cases. Cultures of sputum for mycobacteria performed in 42 cases were positive in 15 patients. All patients were negative for HIV antibodies. A 6-month three-drug treatment was initiated upon diagnosis with isoniazid (5mg/kg/day), rifampin (10 mg/kg/day) and pyranizamide (30 mg/kg/day), daily for two months and twice a week for 4 months. In patients with relapsing TB, ethambutol was given (20 mg/kg/day). At the end of the treatment, 30 patients were considered cured with repeated negative acid-fast smears and because they were clinically asymptomatic. An informed consent was obtained from all patients to carry out the studies and treatment.

Culture of bacilli and isolation of the antigen 85 complex.

Mycobacterium tuberculosis, strain H37/Rv, was cultured for 8 weeks in the Proskauer and Beck synthetic medium. A crude culture filtrate protein extract (CFP) was obtained by filtration of the culture medium followed by precipitation with 90% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Ag85 was isolated from CFP by elution from preparative gels. Briefly, 4 mg of CFP were applied to a preparative slab gel; after staining with 4 M sodium acetate, a strip containing the 30-32-kDa band

was excised and eluted with a 50 mM phosphate buffer (pH 7) containing 6 M urea and 20 mM EDTA. The purity of the antigen was assessed by SDS-PAGE and immunoblot with an antiserum against *M. tuberculosis* raised in rabbits which showed the 30-32 kDa doublet band free of contaminants (not shown). The identity of this antigen as Ag85 was established by demonstrating its reactivity with peroxidase-labeled fibronectin by immunoblot, as previously reported (18; not shown).

SDS-PAGE and immunoblot.

Ten ml of blood were collected from each patient before PPD testing and initiation of antituberculous chemotherapy. Control sera were obtained from 10 healthy, asymptomatic, adult donors from the same village. All controls were positive to intradermal tuberculin testing. Aliquots of the sera were frozen at -20°C until use. For the immunoblot analysis, CFP were separated by SDS-PAGE under reducing conditions in a discontinuous buffer system on slab gels of 10% acrylamide. Gels were mounted on an electrontransference chamber (Idea Scientific, Corvallis, PA) and transferred to nitrocellulose sheets (BioRad Laboratories, Richmond, CA). After blocking unbound sites on the paper with 3% BSA in PBS, strips were incubated separately with test sera diluted 1:10 in PBS-Tween 20 for 3 h at room temperature. To reveal bound IgG antibodies, strips were incubated with Protein-A labeled with horseradish peroxidase (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) for 90 min. Peroxidase was revealed with hydrogen peroxide and 4-chloro-1-naphtol for 15 min. The position of the Ag85 was established by comparison with the positions of molecular weight markers and by comparison with the 30-32 kDa fibronectin-reacting bands revealed in control sheets.

Analysis of the antibody response to Ag85 by ELISA.

Sera were processed in one session and included two replicates for each serum; 96-well microtitre plates (Costar, Cambridge, MA) were sensitized with 0.5 µg of Ag85 in 100 µl carbonate buffer, pH 9.6, at 37°C overnight. Blocking of possible remaining active sites on the plastic was done with PBS-BSA 1%, for 1 h at 37°C. Test sera diluted 1/500 were applied to the wells for 1 h at 37°C. After rinsing, Protein-A labeled with horseradish peroxidase was added to reveal bound IgG antibodies. Peroxidase was developed with 50 ml of 1 mg/ml ortho-phenylenediamine and 0.03% hydrogen peroxide in citrate buffer 0.1 M, pH 4.5, for 4 min at room temperature. The reaction was stopped with 200 µl of 1N sulphuric acid. Optical densities (OD) readings at 492 nm were carried out in a Behring automatic ELISA processor. For comparative purposes ELISA with CFP was carried out following the same protocol.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

STATISTICS.

Data were analyzed by the Mann-Whitney-Wilcoxon Test (Software Prism).

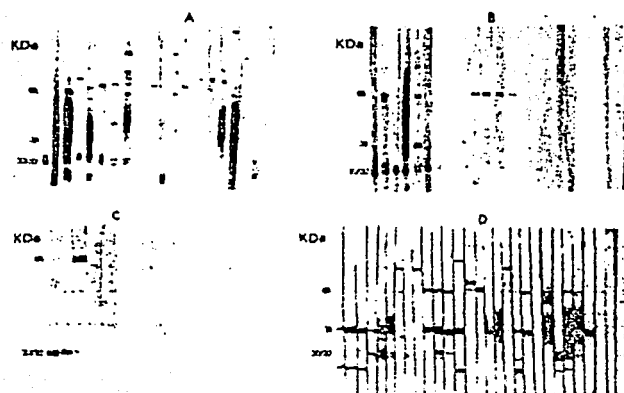
RESULTS

Ag85 is an immunodominant antigen by immunoblot and ELISA in Totonaca Indians with pulmonary tuberculosis.

The immunoblot profile of antigen recognition by serum antibodies from 48 patients with pulmonary tuberculosis is shown in Figure 1 (A, B). Sixteen sera (33.3%) were entirely negative. Peroxidase-labeled Protein-A, used to reveal the blots, showed that IgG reactivity of the

remaining 32 tuberculous sera was directed to very few bands. The most frequently recognized antigen was a 30-32-kDa doublet band, which reacted with 22 of the 48 sera tested (45.8 %); the reaction was strong with 14 sera and ranged from moderate to mild with 8 sera. In parallel blots, the 30-32-kDa doublet band was identified as Ag85 by its reactivity with peroxidase-labeled human fibronectin (not shown). Next in frequency were a 65-kDa band, which reacted with 13 sera (27 %) and a 38-kDa band which was recognized by 3 sera (6.2 %). As shown by previous studies from our laboratory the 38-kDa band corresponds to a phosphoprotein (19) and the 65-kDa is a heat-shock protein (20). The immunoblot profile of patients that cured with chemotherapy (A) was similar to that of patients that did not respond to treatment (B). As control we analyzed 10 sera from healthy adults from the same ethnic group (C): 7 sera were entirely negative, 2 reacted with Ag85, and 1 sera reacted with a high molecular weight band. For comparative purposes, we carried out immunoblot analysis of 29 stored sera obtained from non Totonaca Mexicans with pulmonary TB, recruited in a Mexico City medical reference center (D). A different profile of band reactivity was observed (D); the proteins of 38 and 65 kDa were recognized each by 17 sera (58.6%) and Ag85 by 11 sera (37.9 %).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figure 1. Band reactivity of sera from Totonaca patients with pulmonary tuberculosis who cured with chemotherapy (A) and from patients that did not respond to treatment (B). C, band reactivity of 10 sera from healthy control Totonaca adults. D, band reactivity of sera from 29 ethnically heterogeneous Mestizo Mexicans with pulmonary TB.

In view of the frequent recognition of the A85 antigen by immunoblot, we analyzed the IgG response against isolated Ag85 by ELISA. In Figure 2 the distribution of optical densities found with 45 sera is shown. Taking as cutoff point two standard deviations above the mean optical density (OD) of control sera, the sensitivity of the assay was 72 % and the specificity was 100%.

ELISA with CFP (Figure 2), carried out with 47 sera, resulted positive in 31 instances with a sensitivity of 66% and a specificity of 100%.

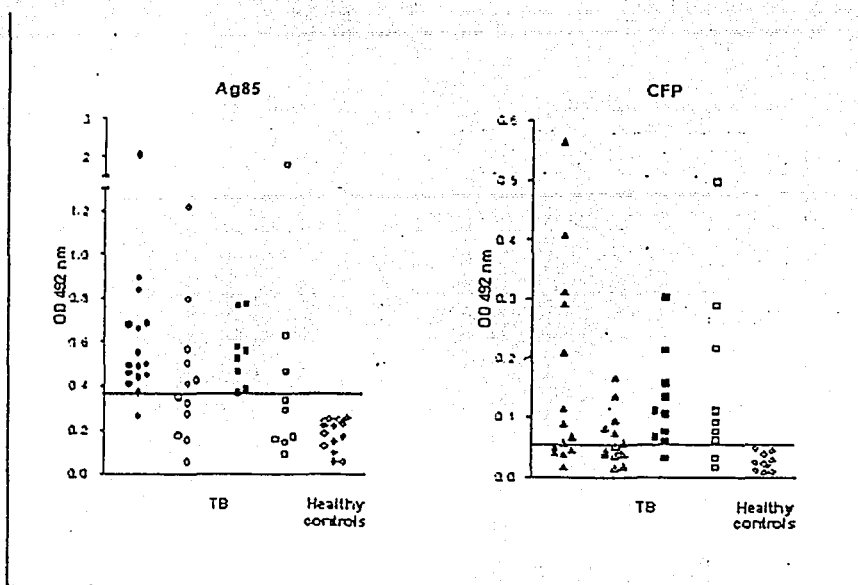


Figure 2. ELISA results with Ag85 and unfractionated culture filtrate proteins (CFP). The horizontal lines represent the cutoff values. Ag85, circles represent first time patients and squares indicate cases of relapsing tuberculosis. CFP, triangles indicate patients with first time tuberculosis and squares represent cases of relapsing disease. Solid figures indicate patients that cured with chemotherapy. Open figures represent patients that did not respond to treatment.

The IgG antibody response to Ag85 correlates with less advanced disease and with a good response to treatment.

In this work we document that an IgG antibody response to Ag85 by ELISA correlates positively with a response to chemotherapy (Table 1, Figure 2). Of the 24 patients that cured with the six months three drug treatment, 23 (95.8%) had positive antibody titers to Ag85. In contrast, only 9 of the 21 patients that did not respond to treatment had positive anti-Ag85 antibody titers; this difference was highly significant ($p=0.0001$). It was also of interest that 31 out of 39 patients with non-cavitary tuberculosis had positive antibody titers to Ag85 ($p=0.02$) whereas only 1 of 6 sera of patients with cavitary disease did so. Tuberculin skin reactivity and BCG vaccination were not associated with an antibody response to Ag85 (Table 1). ELISA with CFP (Table 1, Figure 2) did not show a significant correlation with any of the parameters analyzed, although it is worth to mention that all 7 patients with cavitary TB had positive anti-CFP antibody titers. There were no significant differences between first time tuberculosis patients and cases of relapsing disease in their antibody titers to Ag85 and CFP and in the response to chemotherapy. Immunoblot findings did not correlate significantly with clinical data but a trend towards a more frequent binding of serum IgG to Ag85 was found in patients that cured.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

DISCUSSION

By immunoblot, the antibody response of this cohort of Mexican Indians with pulmonary TB was unusual on two grounds. First, many sera were entirely negative and reactivity of the positive sera was circumscribed to very few bands, mainly to Ag85 and to the heat-shock protein of 65 kDa. Second, antigens reported in other studies as very frequent targets of antimycobacterial antibodies were very seldom recognized by sera of our patients. For instance the 88-kDa and the 38-kDa phosphoprotein, reported to react with a majority of tuberculous sera (9, 13, 19) were very rarely recognized in this study.

Our data brings about the issue on the variability of the antimycobacterial antibody response in different individuals and cohorts and highlights the difficulties to identify mycobacterial antigens to develop serologic tests of wide applicability. The repertoire of antigens recognized by antimycobacterial antibodies can be influenced by a number of factors. Smear negative, HIV coinfecting and newly acquired TB patients exhibit very poor reactivity towards mycobacterial antigens by immunoblot or ELISA (9, 12, 13). The stage of the disease is important; in recurrent TB with cavitations there is a high level antibody response to antigens of 38 and 88 kDa (9,13). In this study recognition of these antigens by immunoblot was equally low in both cavitory and non-cavitory TB.

The poor reactivity and the profile of antigen recognition seen in our patients could be related to severe malnutrition, present in most patients, and to their genetic background. It is known that malnutrition, might depress not only cell mediated immunity but also antibody synthesis (21). Since the patients we studied are Totonaca Indians, a well defined homogeneous ethnic group, genetic factors could be also considered. It is of interest that in a parallel immunoblot analysis of a heterogeneous group of patients, mainly of Mestizo type recruited from a big medical referral center in Mexico City, we observed that the 38-kDa protein was detected by most tested sera, an antigen virtually ignored by sera from Totonaca patients. On the other hand, it is known that the ethnic background might condition different patterns of antibody response. Sensitivity of ELISA with the 19-kDa antigen is negligible in patients from India while in the United Kingdom is high (22) and wide variations in anti-LAM IgG antibodies are observed in TB patients from different countries (23, 24, 25, 26). Furthermore, the synthesis of antibodies to the 38 and 19-kDa antigens is high in individuals with the HLA-DR2 and with HLA-DQ loci, respectively (14,15).

In addition to support a potential value for Ag85 as a serologic reagent, the current study shows that the antibody response against this antigen might be clinically relevant. In effect, positive antibody titers to Ag85 were significantly more frequent in non-cavitory tuberculosis and in patients who cured with antituberculous chemotherapy. The association of an antimycobacterial antibody response with a good outcome in tuberculous patients is an interesting finding as most data ascribe a deleterous role to humoral immunity in the course and pathogenesis of TB. Indeed, it has been reported that a high humoral response to PPD characterizes patients with advanced disease, poor cell-mediated immunity responses and a bad outcome (27). Extensive tuberculosis with poor prognosis is associated with a high antibody response to the 38-kDa phosphoprotein and bacteriological relapse during treatment is associated with a rise in antibodies against a 14-kDa antigen (9, 13). However, there exist old and recent data suggesting a positive role for antimycobacterial humoral immunity. In the first part of the last century, many studies were published reporting cures or clinical amelioration of TB patients treated with sera of animals, generally horses, immunized with *M. tuberculosis* (28). More recently, it has been reported that tuberculous children with low levels of anti-LAM IgG antibodies may be predisposed to dissemination of tuberculosis whereas those with high levels are more likely to

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

have localized disease (29). There are also observations on murine models supporting a protective role for humoral immunity. In B-cell deficient mice *M. tuberculosis* infection is more severe (30) and *M. tuberculosis* bacilli coated with a monoclonal antibody to arabinomannan are less pathogenic (31). How antimycobacterial antibodies might influence the course of TB is unknown. It has been proposed that antibodies may influence phagocytosis and intracellular trafficking of bacilli, which may result in modulation of cytokine synthesis and enhancement of T-cell protective responses (31). In concordance with this view is a study showing that antibodies of IgG1 subclass stimulate macrophages of patients with tuberculosis to produce TNF- α , a key cytokine involved in control of bacillary growth (34).

In summary, this work shows that the repertoire of antigens recognized by a cohort of tuberculous Mexican Totonaca Indians differs from that reported for other cohorts and that a high antibody response to Ag85 is a good prognostic indicator. The factors involved in the peculiar antibody response of our patients and how anti-Ag85 antibodies can influence the outcome of TB need further study.

ACKNOWLEDGEMENTS.

We want to thank Isabel Pérez Montfort for helping to write the manuscript and to Patricia Espinosa Cueto for technical assistance.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

REFERENCES.

1. WHO. 1996. Group at risk: WHO Report on the tuberculosis epidemic. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
2. Murray C J, Salomon J A. Modeling the impact of global tuberculosis control strategies. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:13881-13886.
3. Garcia-Garcia M D, Valdespino-Gomez J L, Palacios-Martinez M, Mayar-Maya M E, Garcia-Sancho C, Sepulveda-Amor J. Tuberculosis and AIDS in Mexico. Salud Publica Mex. 1995; 37: 539-548.
4. Secretaria de Salud. Norma Oficial para el control y prevencion de la tuberculosis en la atencion primaria a la salud. Norma No. NOM-006-SSAA2-1993.
5. Källénus G, Hoffner S E, Miörner H, Svenson S B. Novel approaches to the diagnosis of mycobacterial infections. Eur Respir J 1994; 7:1921-1924.
6. Foulds J, O'Brien R. New tools for the diagnosis of tuberculosis: the perspective of developing countries. Int J Tuberc Lung Dis 1998; 2:778-783.
7. Fogan L. PPD antigens and the diagnosis of mycobacterial diseases. Arch Intern Med 1969; 124:49-54.
8. Garcia-Garcia M L, Jimenez-Corona A, Jimenez-Corona M E, Ferreyra-Reyes L. Factors associated with tuberculin reactivity in two general hospitals in Mexico. Infect Contr Hosp Epid 2001; 22:88-95.
9. Bothamley G H, Rudd R, Festenstein F, Ivanyi J. Clinical value of the measurement of *Mycobacterium tuberculosis* specific antibody in pulmonary tuberculosis. Thorax 1992; 47:270-275.
10. Samanich K M, Belisle J T, Sonnenberg M G, Keen M G, Zolla-Pazner M G, Laal S.

- Delineation of human antibody responses to culture filtrate antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis 1998; 178:1534-1538.
11. Lyashchenko K, Colangeli R, Houde M, Al Jahdali H, Menzies D, Gennaro M L. Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. Infect Immun 1998; 66:3936-3940.
 12. Chan E D, Heifets L, Iseman M D. Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review. Tuberc Lung Dis 2000; 80:131-140.
 13. Samanich K, Belisle J T, Laal S. Homogeneity of antibody responses in tuberculosis patients. Infect Immun 2001; 69:4600-4609.
 14. Bothamley G H, Beck J S, Schreuder G M, D'Amato J, de Vries R R, Kardjito T, Ivanyi J. Association of tuberculosis and *M. tuberculosis*-specific antibody levels with HLA. J Infect Dis. 1989; 159:549-555.
 15. Bothamley G H, Schreuder G M, de Vries R R, Ivanyi J. Association of antibody responses to the 19-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* and the HLA-DQ locus. J Infect Dis. 1993; 167:992-993.
 16. Dirección General de Epidemiología. Anuario Estadístico de Morbilidad. México. Secretaría de Salud. 1994.
 17. American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. Am J Respir Crit Care Med. 2000; 161:1376-1395.
 18. Espitia C, Sciutto E, Botasso O, Gonzalez-Amaro R, Hernandez-Pando R, Mancilla R. High antibody levels to the mycobacterial fibronectin-binding antigen of 30-31 kDa in tuberculosis and lepromatous leprosy. Clin Exp Immunol 1992;87:362-367.
 19. Espitia C, Cervera I, Gonzalez R, Mancilla R. A 38-kDa *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serological evaluation. Clin Exp Immunol 1987; 77:373-377.
 20. Hernandez-Pando R, Reyes P, Espitia C, Wang Y, Rook G, Mancilla R. Raised agalactosyl IgG and antimycobacterial humoral immunity in Takayasu's arteritis. J Rheumatol 1994; 21:1870-1876.
 21. Scrimshaw N S, San Giovanni J P. Synergism of nutrition, infection and immunity. Am J Clin Nutr 1997; 66:464S-477S.
 22. Bothamley G, Batra H, Ramesh V, Chandramui A, Ivanyi J. Serodiagnostic value of the 19-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in Indian patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992;11:912-915.
 23. Lawn S D, Frimpong E H, Nyarko E. Evaluation of a commercial immunodiagnostic kit incorporating lipoarabinomannan in the serodiagnosis of pulmonary tuberculosis in Ghana. Trop Med Int Health 1997; 2: 978-981 .
 24. Ratanasuwon W, Kreiss J K, Nolan C M et al. 1997. Evaluation of the MycoDot test for the diagnosis of tuberculosis in HIV seropositive and seronegative patients. Int J Tuberc Lung Dis 1997; 1: 259-264.
 25. Somi G R, O'Brien R J, Mfinanga G S, Ipuge Y A. Evaluation of the MycoDot test in patients with suspected tuberculosis in a field setting in Tanzania. Int J Tuberc Lung Dis 1999; 3: 231-238 .
 26. Chan E D, Reves R, Belisle J T, Brennan P J, Hahn W E. Diagnosis of tuberculosis by a visually detectable immunoassay for lipoarabinomannan. Am J Respir Crit Care Med. 2000; 161:1713-9.
 27. Lenzini L, Rottoli P, Rottoli L. The spectrum of human tuberculosis. Clin Exp Immunol 1977; 27:230-237.
 28. Glatman-Freedman A, Casadevall A. Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Rev. 1998; 11:514-532.
 29. Costello A M, Kumar A , Narayan V, Akbar M S, Ahmed S, Abou-Zeid C, Rook G A, Stanford J, Moreno C. Does Antibody to mycobacterial antigens, including

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

lipoarabinomannan, limit dissemination in childhood tuberculosis ?. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 1992. 86: 686-692.

30. Vordemeier H M, Venkataprasad N M, Harris D P, Ivanyi J. Increase of tuberculous infection in the organs of B cell-deficient mice. Clin Exp Immunol , 1996; 106: 312-316.
31. Teitelbaum R, Glatman-Freedman A, Chen B, Robbins J B, Unanue E, Casadevall A, Bloom B R. A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival. Natl. Acad.Sci.USA, *1998; 95:15688-15693.
32. Hussain R, Shiratsuchi H, Ellner J J, Wallis R S. PPD-specific IgG1 antibody subclass upregulate tumour necrosis factor expression in PPD-stimulated monocytes: possible link with disease pathogenesis in tuberculosis. Clin Exp Immunol. 2000;119:449-55.

Table 1. Positive antibody titers by ELISA with Ag85 and culture filtrate proteins (CFP). Correlation with some features of the disease.

		Ag85			CFP	
	n=	# positive sera	%	N=	# positive sera	%
BCG						
Vaccinated	28	20	71.4	29	17	58.6
Non-vaccinated	17	12	70.5	18	14	77.1
TUBERCULIN						
Reactor	32	22	68.7	33	21	63.6
Non-reactor	13	10	76.9	14	10	71.4
LUNG CAVITIES						
Present	6	1	16.6	7	7	100
Absent	39	31	79.4**	40	24	60
CLINICAL SETTING						
New case	28	20	71.4	29	16	55.1
Relapse	17	12	70.5	18	15	83.3
OUTCOME						
Cure	24	23	95.8***	24	18	75

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

No cure	21	9	42.8	23	13	56.5

Table 1. Forty five sera were studied by ELISA with Ag85 isolated from preparative gels; 47 sera were tested with unfractionated culture filtrate proteins (CFP). ** $p=0.02$; *** $p=0.0001$.



article summary

◀◀ FIRST ◀ BACK document 12 of 19 FORWARD ▶ LAST ▶▶

quick ingenta search:

- online articles
- uncover plus

search:

search ingenta

browse publications

reviews

my files:

saved searches

marked list

shopping cart

manage my ingenta

track orders

mark ▶ article availability

An IgG antibody response to the antigen 85 complex is associated with go outcome in Mexican Totonaca Indians with pulmonary tuberculosis

▶ The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, ▶ August 2002, vi no. 8, pp. 706-712(7)

Sánchez-Rodríguez C.[1]; Estrada-Chávez C.[2]; García-Vigil J.[3]; Laredo-Sánchez F.[3] Halabe-Cherem J.[3]; Perelra-Suárez A.[2]; Mancilla R.[2]

[1]Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, and the Departamento de Medicina Interna, H de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, México, DF [2]Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF [3]Departamento de Medicina Interna, Hospital de Especialidades, Cer Médico Nacional Siglo XXI, México, DF

Abstract:

SETTING: It is generally accepted that antibodies do not protect against *Mycobacterium tuberculosis* infection, as this role relies upon T-cell reactivity. Hence, most studies on antimycobacterial antibodies have been aimed at developing serologic tests, and few explore their role in disease pathogenesis.

OBJECTIVE: To determine the IgG antimycobacterial antibody response of 55 Mexican Totonaca Indians with pulmonary tuberculosis and its correlation with some features of the disease.

DESIGN: Study of the profile of antigen recognition by immunoblot and ELISA with isolate antigen 85 complex (Ag85) and whole culture filtrate proteins. Correlation of immunoblot ELISA results with BCG vaccination, tuberculin reactivity, extent of the disease, clinical set and response to treatment.

RESULTS: On immunoblot, band reactivity was very poor and the most frequently recognized antigen was the 30–32 kDa, antigen 85 complex (45.8% of serum samples). ELISA with tuberculin antigen showed a sensitivity of 72% and a specificity of 100%. Positive antibody titers were observed in 79.4% of patients with non-cavitary tuberculosis ($P = 0.012$) and in 95% of patients who were cured with anti-tuberculosis chemotherapy ($P = 0.0001$). By contrast, antibody response to whole culture filtrate antigens had no correlation with the presence of cavitations or with prognosis.

CONCLUSIONS: Our data show that an antibody response to Ag85, aside from having great potential to develop a serologic test for tuberculosis, was associated with a positive outcome in a cohort of tuberculous Mexican Indians.

Keywords: tuberculosis; antibody; immunoblot; ELISA; prognosis; antigen 85 complex; chemotherapy; Totonaca Indians

Language: English **Document Type:** Regular paper **ISSN:** 1027-3719

SICI (online): 1027-371968706712

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

CARTA DE ACEPTACION PARA PARTICIPAR EN EL PROTOCOLO

México DF a _____

A quien corresponda:

Yo _____ acepto libre y voluntariamente participar en el protocolo "*Evaluación clinico-inmunologica de la tuberculosis y su relación con la respuesta al tratamiento*" me encuentro enterado que se me sometera a extracción de sangre del brazo al inicio , durante la evaluacion del tratamiento y al final del mismo, los daños a mi persona se limitan a la venopunción .

Es de mi conocimiento que soy libre de retirarme del estudio en el momento en que yo lo decida y que puedo solicitar toda la información adicional que yo requiera, asi como de los resultados obtenidos que el investigador principal (Dra.Clara Cristina Sánchez Rodríguez) sera responsable de proporcionarmelos.En caso de retirarme de la investigación no se modificara mi atención ni de mis familiares en la institución (IMSS)

Nombre y firma del paciente

Nombre y firma del Investigador

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Nombre _____ Sexo _____

Dirección _____

Fecha de nacimiento: _____

BCG _____ PPD _____

Peso inicial: _____ Talla _____

Fecha de Dx. De la TB _____ Tipo de TB _____

Ha recibido tratamientos antituberculosos previos: _____

Tipo e inicio del tratamiento actual: _____

¿Ingiera algun otro medicamento? _____

Muestra inicial: _____

Muestras control _____

PA. Sintomatología: _____

APP: _____

Nombre: _____

Fecha del laboratorio: / / / / / / / / / / / / / / / /

Glucosa / / / / / / / / / / / / / / / /

Urea..... / / / / / / / / / / / / / / / /

Creatinina..... / / / / / / / / / / / / / / / /

Hemoglobina..... / / / / / / / / / / / / / / / /

Hematocrito. / / / / / / / / / / / / / / / /

Leucocitos..... / / / / / / / / / / / / / / / /

Neutrofilos. / / / / / / / / / / / / / / / /

linfocitos. / / / / / / / / / / / / / / / /

eosinofilos / / / / / / / / / / / / / / / /

mononucleares. / / / / / / / / / / / / / / / /

Alaninotransferasa. / / / / / / / / / / / / / / / /

Aspartatotransferasa. / / / / / / / / / / / / / / / /

Fosfatasa alcalina. / / / / / / / / / / / / / / / /

Deshidrogenasa láctica. / / / / / / / / / / / / / / / /

Bilirrubinas totales. / / / / / / / / / / / / / / / /

Proteínas totales. / / / / / / / / / / / / / / / /

Albumina. / / / / / / / / / / / / / / / /

ELISA para VIH. _____ /

BAAR _____ / / / / / / / / / / / / / / / /

Cultivo. _____

Coproparasitoscopico. / / / / / / / / / / / / / / / /