



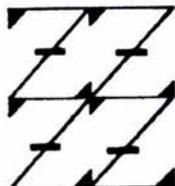
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

COMPARACION DEL SERO-TB E IMMUNOTECT-TB CON EL
METODO DE ELISA PARA LA IDENTIFICACION RAPIDA EN
PACIENTES CON *Mycobacterium Tuberculosis*

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
VALLADARES CORTES FABIOLA CITLALLI

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXIÓN

ASESOR: Q.F.B. VICTOR HUGO BECERRA LOPEZ
DIRECTOR DE TESIS: Q.B.P. FRANCISCO SALINAS MADRIGAL

MEXICO, D.F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

	Páginas
Resumen	1
Introducción	2
Características generales de <u>Mycobacterium tuberculosis</u>	3
Factores de predisposición	5
Vigilancia epidemiológica de México	6
Manifestaciones clínicas y patogenicidad de la tuberculosis	8
Procedimientos diagnósticos	15
Planteamiento del problema	37
Objetivos	38
Hipótesis	39
Diseño experimental	40
Material	41
Método	42
Diagrama de flujo	45
Resultados	46
Discusión de resultados y conclusiones	51
Anexos	53
Lista de referencias	59

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO EN LA UNIDAD DE NEUMOLOGÍA Y EN EL INSTITUTO NACIONAL DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICO, DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN INMUNOLÓGICA.

AGRADECIMIENTOS

- ✘ A mis padres Enrique y Josefina por su apoyo y confianza incondicional.
- ✘ A mi hermano Enrique por la ayuda y estímulos que me brindó durante este trabajo.
- ✘ Al Q.B.P. Francisco Salinas y todos los que laboran en la unidad de Neumología del Hospital General de México
- ✘ Al Dr Alejandro Hernandez por su ayuda durante la investigación.
- ✘ A todos los que laboran en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico, en el Departamento de Investigación Inmunológica por el apoyo brindado en esta investigación.
- ✘ Al Q.F.B Víctor Hugo Becerra López por sus consejos.
- ✘ A mi tía Guadalupe Cortes Ocaña por su fe que siempre ha tenido en mí.

RESUMEN

Tres pruebas serológicas, immunotect-TB, sero-TB y ELISA fueron evaluadas simultáneamente con 72 muestras de sueros a partir de cuatro grupos de pacientes: 42 personas con tuberculosis pulmonar y extrapulmonar confirmadas por un estudio bacteriológico (cultivo en Lowenstein-Jensen y MGIT, además de la baciloscopía como un método complementario considerandolos el estándar de oro) y 30 personas en el grupo de control, las cuales 16 de ellas padecieron de patologías diversas como: neumonía, enfermedad respiratoria obstructiva crónica y cáncer broncogénico, los 14 individuos restantes se encontraban en perfecta salud tomando en cuenta que se excluyeron al inicio del estudio aquellos pacientes que se encontraban bajo tratamiento anti-tuberculoso y fueran portadores del virus de inmunodeficiencia humana, debido a la disminución de su respuesta inmunológica.

El plan de análisis incluyó la comparación del método de ELISA con dos casas comerciales y finalizando con el estándar de oro donde se encontró que la técnica de ELISA tuvo una baja especificidad de 80%, contraria a la sensibilidad que fue de 86%, debido a una reacción cruzada de anticuerpos IgG con los demás padecimientos respiratorios no tuberculosos.

En sero- TB reportó una sensibilidad y especificidad del 22% y 100% respectivamente, indicando que immunotect-TB fue más sensible en un 52% pero con una especificidad igual al sero-TB. El valor predictivo positivo en ELISA fue de 64% en cambio su valor predictivo negativo fue de 95%, y tuvo un 92% en eficiencia de prueba contrario a sero-TB que fue de 54% y un valor predictivo positivo y negativo de 8% y 81.103% respectivamente, aunque en immunotect-TB el valor predictivo positivo fue de 25% y el negativo de 87.54% encontrando que sero-TB tuvo una deficiencia de prueba mucho menor al de immunotect-TB que fue de 76.38%.

Es evidente que la técnica de ELISA proporcionó un mejor diagnóstico para la determinación de la tuberculosis, siendo más sensible y eficiente comparado con los equipos comerciales y poder incluirla como una prueba alternativa seguidas de las convencionales.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis aún no es una enfermedad derrotada porque sigue siendo una de las enfermedades más frecuentes entre la población sobre todo en los pacientes con el virus de inmunodeficiencia humana que determina un aumento en incidencia de tuberculosis en muchos países, tanto en desarrollo como desarrollados, incluyendo aquellos que se aprestaban a erradicar esta enfermedad.

Actualmente el diagnóstico de la tuberculosis consiste esencialmente en la aplicación de los mismos métodos bacteriológicos que realizó Robert Koch hace más de 100 años, si bien la baciloscopia tiene una alta especificidad pero es poco sensible en las formas menos avanzadas, además de ser un procedimiento que requiere de personal entrenado y de laboratorios especiales, mientras que en el cultivo aumenta la sensibilidad a expensas de un mayor costo y de una demora de 4-8 semanas.

Por esta misma razón para lograr erradicar la tuberculosis es importante mejorar los estudios de diagnóstico y seguir perfeccionando el tratamiento pero sin caer en una farmacoresistencia volviendo más virulenta la cepa. Es así como se han estado introduciendo nuevas técnicas, que prometen revolucionar en un futuro próximo el manejo no sólo de la tuberculosis si no de otras enfermedades infecciosas.

Los kits comerciales son las nuevas técnicas que han surgido, reportando un grado de confianza del 90-100% en el diagnóstico de Mycobacterium tuberculosis que tiene como ventaja de ser sencillos, baratos, rápidos y no requiere de personal capacitado utilizando equipos que ya están disponibles en muchos laboratorios de los países en desarrollo además de requerir poca muestra, lo que los convierte en excelentes procedimientos de tamizado por lo cual muchos laboratorios ya sean públicos o privados ya los usan.

Es así como se decidió realizar este trabajo por la cuestión de que se habla poco sobre kits comerciales sobre todo los que determinan la presencia del Mycobacterium tuberculosis. Se eligió el sero-TB e immunotect-TB por ser los más difundidos y utilizados en México por otros laboratorios (sobre todo dentro del IMSS) además de quererlos implementar como pruebas de diagnóstico en el laboratorio de Neumología del Hospital General de México comprobando que tan sensibles y específicos son con respecto a las pruebas convencionales (como son los métodos bacteriológicos).

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE Mycobacterium tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa, generalizada y producida por el agente etiológico Mycobacterium tuberculosis, descrito por Robert Koch en 1882 clasificando al bacilo en la siguiente forma:

ORDEN: Actinomycetaceae
FAMILIA: Mycobacteriaceae
GENERO: Mycobacterium
ESPECIE: Tuberculosis

Lo llamamos bacilo por la tendencia de formar nódulos llamados tubérculos localizados en la superficie de tejidos y serosas sobre los que se asienta. Esta bacteria se localiza principalmente en los pulmones, aunque es capaz de afectar a cualquier órgano de la economía, en forma progresiva y crónica, por lo que su cuadro clínico está en relación con el órgano o sistema que ataque¹.

La pared celular del bacilo es la más compleja de todas las bacterias conocidas formada por un esqueleto de peptidoglicano con moléculas de arabinogalactano-micolato, unidas por fuerzas covalentes, cubierto por una capa de lípidos libres y polipéptidos altamente antigénicos que contribuyen a sus propiedades hidrofóbicas de las micobacterias, incluyendo el glucolípido sulfatado (sulfatido) que impide la fusión de los fagosomas con los lisosomas y favorece la supervivencia intracelular del Mycobacterium tuberculosis en el interior de los macrófagos, aunque es más lenta cuando se trata de cepas virulentas que cuando son avirulentas aumentan la toxicidad del factor cordón (6,6-dimicolato de trehalosa) responsable de la alineación paralela de hileras de bacilos (formación de cordones) cuyo efecto inhibitorio se presenta en la respiración y fosforilación en mitocondria, incluyendo la producción del factor necrótico y el mismo glicolípido organizado en monocapas para adsorber el fibrinogeno facilitando la liberación del fibrinopeptido- β , que es un potente quimiotáctico, una de tantas características de las cepas virulentas de Mycobacterium tuberculosis e incluso inhibe la migración de los polimorfo nucleares (PMN)^{2,3} de esta manera conforman una membrana dos veces más gruesa y fuerte que la de los bacilos gram negativos, además poseen una verdadera coraza lipídica la cual interactúa con proteínas y forman una barrera permeable que engloba al citoplasma.

De todos estos lípidos depende entre muchas otras propiedades la alcohol-ácido resistencia que hace que una vez teñidas sean capaces de resistir a la decoloración con ácidos y alcohol; de ahí el nombre de BAAR.⁴

El bacilo tuberculoso depende de la producción de micobactinas, sustancias que pueden recuperar el hierro a partir de la transferrina y permiten así su crecimiento siendo esenciales para este propósito pudiendo considerarse como factor de virulencia, pese a no causar efectos perjudiciales directos sobre el huésped.⁵

Es muy importante remarcar este apartado debido a la sobrevivencia del bacilo dentro del organismo del huésped, en cambio la transmisión del microorganismo se lleva a cabo cuando una persona inhala uno o más bacilos contenidos en el núcleo de una gotita de pflüger, que es el material infectante que un tuberculoso nebuliza a su alrededor al toser, hablar, reír, gritar, cantar o estornudar, pero sin duda la más capaz de generar aerosoles potencialmente infectantes es la tos y estas gotitas se evaporan, dejando unos núcleos tan pequeños que se dispersan fácilmente con cualquier corriente de aire, manteniéndose suspendidos en el ambiente y resistir por largo tiempo.

Sin embargo cada una de estas partículas, por su tamaño, sólo puede contener unas pocas micobacterias, hay que tener presente que en los contagios masivos, intra-familiares son muchas las gotitas infectantes que pueden ser inhaladas.

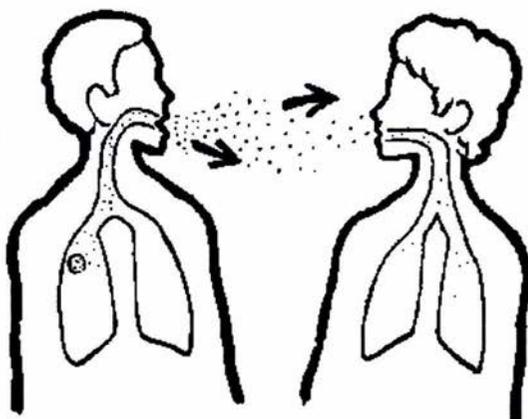


Figura 1: La bacteria de la tuberculosis se transmite a través del aire de una persona enferma por tuberculosis a otra persona sana.

FACTORES DE PREDISPOSICIÓN

Aun no sabemos en forma precisa cual es el mecanismo íntimo por el cual un individuo pasa de infectado a enfermo, sólo se conocen algunos de los factores que favorecen este evento y pueden distinguirse los que dependen del bacilo, los derivados del ambiente y los atribuibles al huésped.

◆ FACTORES DEPENDIENTES DEL HUÉSPED:

Poco a poco se han ido identificando factores de riesgo más definidos, que aumentan la probabilidad de pasar de infección a enfermedad y por ende, de hacer más grave la tuberculosis. Entre ellos está la desnutrición, especialmente la carencia proteica; el alcoholismo, las enfermedades debilitantes; las infecciones virales, notablemente el SIDA; la silicosis, la diabetes, la gastrectomía, las enfermedades malignas, especialmente de los órganos linfáticos, los tratamientos prolongados con corticosteroides o drogas inmunosupresoras, pero hay un factor que merece una mención especial; la edad, podría decirse que hay distintas formas de tuberculosis un ejemplo de ello es la primo-infección en el lactante que tiende a diseminarse en la sangre y es más grave, en cambio, la edad escolar parecería ser el momento menos peligroso para infectarse y enfermar, mientras entre los 6 y 14 años, la tendencia a la progresión o a las diseminaciones se presenta solo en el 1-3% de los casos. Con la llegada de la pubertad la tuberculosis se hace de peor pronostico.⁶

◆ FACTORES RELACIONADOS CON EL COMPORTAMIENTO DEL PACIENTE

Actualmente el problema fundamental no se centra en descubrir nuevos esquemas o medicamentos, si no en como ser eficientes ya que las principales causas de fracaso son prescripción de regimenes inadecuados, el abandono del tratamiento o irregularidad en su toma y la presencia de resistencia bacteriana en muchas ocasiones consecuencia de lo anterior. Una de los principales problemas para controlar al paciente infeccioso es que cerca del 30% con enfermedad clínica manifestada y que no reciben tratamiento, se recuperan lo suficiente para regresar a sus labores, a su vez el tratamiento no supervisado da como resultado una curación aparentemente cercana al 60%. Sin embargo en un estudio reciente se refiere que en México las principales causas fueron la falta de información de la enfermedad y no poder identificar los síntomas entre el grupo familiar y el equipo médico, aunque no se señala como se determinaron estas variables. También uno de los motivos de diserción que manifestaron los pacientes fueron: No tenían permiso en el trabajo, desconocían la importancia de la enfermedad, otras causas (no se le proporcionó cita subsecuentemente, distancia de la clínica, baja del IMSS, trato impersonal, prefiere consultar con médico particular, problemas familiares, etc.) Sin embargo hubo pacientes que tenían conciencia crítica respecto al padecimiento.⁷

Otro punto importante es la escolaridad, uno de los indicios socioeconómicos del individuo que traduce su nivel, pero indudablemente representa, de manera indirecta, el conocimiento acerca de la enfermedad y la capacidad de seguir un régimen medicamentoso independientemente de la mejoría relativa que experimenta a poco de

iniciado el tratamiento. Esto refuerza a que los enfermos en zonas rurales, analfabetas o aquellos que viven alejados de la unidad de atención médica, tienen un mayor riesgo de abandono al tratamiento resultando claro que en la actualidad el reto es conseguir un buen control del paciente tuberculoso, con una vigencia de la normatividad que es adecuada y operativa, no obstante la identificación y la intervención dirigida a grupos poblacionales específicos, pueden ser estratégicas y efectivas para el control de la enfermedad.^{8,9}

VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE MÉXICO

A más de 100 años de que Robert Koch lograra la identificación del bacilo causante de la tuberculosis en el humano, el cuadro epidemiológico no es halagador.

La tuberculosis (TB) en la forma pulmonar es la de mayor importancia por su transmisión, un caso no tratado puede infectar de 10 a 15 personas; sin embargo debido a diversos problemas como: VIH/SIDA, a la farmacorresistencia y al poco impacto de las acciones de control, en 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS) la declaró como enfermedad reemergente y calcula que anualmente 8 millones de personas contraen la tuberculosis y 3 millones mueren a causa de ella.

México ocupa el tercer lugar en América Latina en número de casos, pero en problemática e incidencia se ubica en la posición número 20, de este modo se demuestra que no se considera re-emergente si no endémica.

Al respecto, la Secretaría de Salud pública, afirma que en México, ese padecimiento ocupa el decimoquinto lugar como causa de muerte y 95% de los fallecimientos se registran en la población mayor de 15 años por lo mismo se desarrolló un programa de tuberculosis en el país y se ha estado modificando para estar acorde con el nuevo comportamiento del padecimiento de ahí que a pesar de su asociación con el VIH/SIDA y que cada año se registran de 18-20 mil nuevos casos de tuberculosis pulmonar, se ha logrado una disminución anual de 4-5% en la mortalidad por este padecimiento.^{10,11} En cuestión a la morbilidad se mostró una tendencia ascendente durante 1994-1997, este último año con 19,577 casos (19.6 por 100,000 habitantes) aunque en el año de 1998 se presentó una ligera reducción.

En suma, basados en las estimaciones de la Coordinación de Vigilancia Epidemiológica en el año 2000 se reportaron 15,781 casos (15.8 por 100,000 habitantes); en el país 50% de los estados de: Guerrero, Tamaulipas, Baja California norte, Veracruz, Nuevo León, Nayarit, Tabasco, Sinaloa, Chiapas, Colima, Durango, Sonora, Oaxaca, Baja California Sur, Coahuila, Quintana Roo, se encontraba por arriba del promedio nacional.

Debido a que la población más afectada es la económicamente activa, en el año 2000, 82% de los casos nuevos notificados fue confirmado por laboratorio, 95% ingresó a tratamiento y 25% presentó otro padecimiento como:

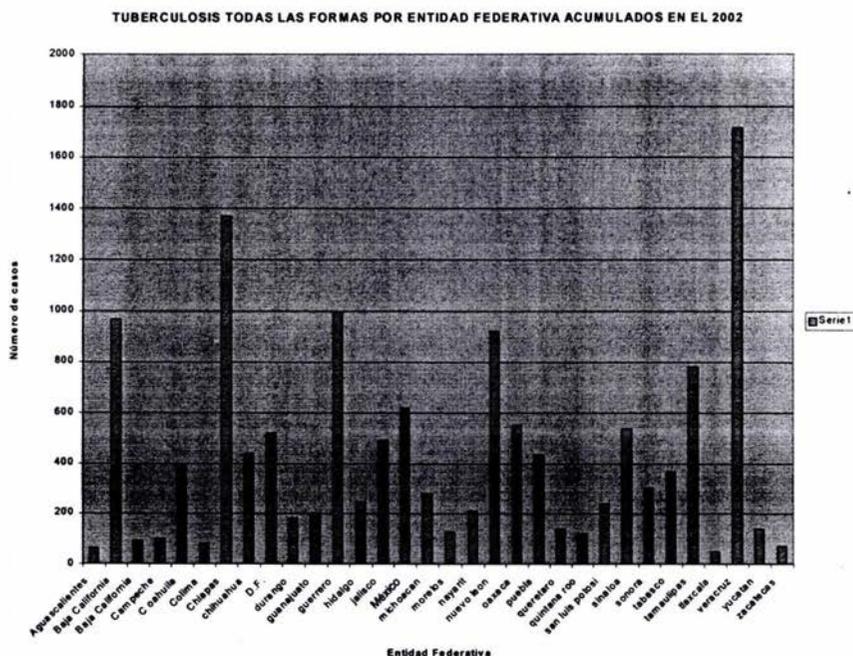
Diabetes Mellitus (11%), desnutrición (5%), alcoholismo (4%), VIH/SIDA (2.5%). Aunque existe evidencia de farmacorresistencia en el país puede complicar el control de

la tuberculosis y hace más evidente la sugerencia que la detección oportuna, el tratamiento supervisado, el evitar el abandono y el asegurar la curación contribuyen a reducir el riesgo de la farmacoresistencia estimando que cada año los casos nuevos de tuberculosis representan de 2.5-2.9%. Para la isoniacida se estima una resistencia primaria de 12% y secundaria de 56%.

Hasta hace 2 años se desconocía el número de casos, hoy se cuenta con información nominal de 29 estados, Campeche, Querétaro y Zacatecas no reportan problemáticas.

En conclusión en México al igual que en otros países conforme se van haciendo estudios sobre como erradicar la enfermedad, se van descubriendo los factores que agravan su ocurrencia y control los cuales son: crecimiento de la población, pobreza, migración, hacinamiento, mala ventilación, mal nutrición, alcoholismo y uso de otras drogas, VIH/SIDA, diabetes, desnutrición, manejo y tratamiento inadecuado de pacientes y falta de recursos; cada uno deteriora su control y favorece la resistencia. ¹⁰

Fuente: 10



Grafica 1: Datos epidemiológicos de la tuberculosis en la Republica Mexicana en el 2002

MANIFESTACIÓN CLÍNICA

Los síntomas hacen su aparición cuando las lesiones son extensas, de forma que el diagnóstico suele establecerse cuando la enfermedad está avanzada y pueden ser generales o locales y no son específicos, ya que pueden presentarse en otras enfermedades crónicas.

Estos síntomas varían desde una fiebre hasta sudoración, adelgazamiento progresivo y astenia, pero la temperatura puede alcanzar los 39-39.5 °C, generalmente siendo más alta por la tarde acompañada de sudoraciones nocturnas y a diferencia de la fiebre e incluso en ocasiones esta pasa inadvertida¹⁴.

También cuando las lesiones son pequeñas, la tos es débil o no existe y no hay expectoración por el contrario, existen cavernas, seguida de esputo que inicialmente suele ser mucopurulento. Otro síntoma como consecuencia de la cavitación es la hemoptisis que es bastante común y se manifiesta en forma de estrias sanguinolentas mezcladas con el esputo y son raras las hemorragias pulmonares masivas y si la infección se propaga a la pleura, aparece dolor pleural y disnea, por lo tanto es importante señalar que el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar no debe establecerse con base exclusivamente a radiografías, ya que otras enfermedades pulmonares dan unas imágenes idénticas o en similares.

PATOGENICIDAD DE LA TUBERCULOSIS

Al analizar los síntomas se podrá determinar la patogenicidad de Mycobacterium tuberculosis, así como los tipos de lesiones y evolución de la enfermedad además el estado de resistencia e hipersensibilidad del huésped.

La patogenia de la tuberculosis se basa en 4 consideraciones:

1. La virulencia de Mycobacterium tuberculosis
2. El papel desempeñado por la hipersensibilidad inducida
3. El papel de la inmunidad o resistencia
4. La génesis del patrón tan característico (aunque no necesariamente diagnosticada) de reacción granulomatosa que se observa en la tuberculosis.

La primera vez que la micobacteria llega a un pulmón virgen, es arrastrado por la corriente aérea hasta las partes más periféricas del parénquima, alcanzando generalmente las regiones sub-pleurales, produciendo en cualquier segmento, al azar, una infección frecuentemente en los tercios medios de los pulmones y al llegar el bacilo a los alvéolos hay una inflamación inespecífica, inicialmente de grado mínimo, caracterizada por hiperemia, edema e infiltración a base de polinucleares neutrófilos los cuales después de 48 h aparece una respuesta monocitaria, residente del pulmón, seguida de una fagocitación de la bacteria como si fuera una partícula inerte de carbón o de polvo y eventualmente la transportan a los ganglios linfáticos hiliares, produciendo toxicidad primaria, las micobacterias se multiplican libremente dentro de estas células, pudiendo

llegar a destruirlos, liberándose en el medio extracelular como se observa en la figura 2 y algunos de estos bacilos son transportados por la circulación linfática o dentro de los macrófagos a los ganglios hiliares y del mediastino; desde allí se vacían a la sangre venosa y se diseminan por todo el organismo, produciendo las llamadas siembras orgánicas de la tuberculosis. Esto transcurre durante dos semanas en las que se activa el sistema inmunitario.

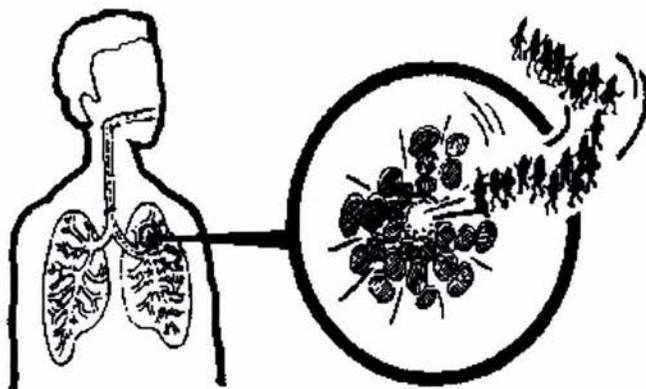


Figura 2: Cuando las defensas del cuerpo están débiles, las bacterias inactivas de la tuberculosis se reactivan y se salen de las paredes de los macrófagos.

TUBERCULOSIS PRIMARIA

El primer encuentro con el bacilo es el hecho más importante en la historia natural de la tuberculosis en un individuo. “La tuberculosis primaria” se define como la infección de una persona que no había tenido contacto previo con el bacilo tuberculoso observándose una lesión (denominada foco de Ghon) a menudo de tamaño pequeño y difícil de detectar mediante técnicas anatomopatológicas o radiológicas llegando a medir aproximadamente de 1-1.5cm. Consiste en una consolidación inflamatoria de coloración gris-blancuecina bien delimitada del parénquima pulmonar adyacente adquiriendo un carácter granulomatoso y posteriormente sufre una necrosis blanda y de apariencia caseosa en la parte central que al cabo de dos semanas iniciándose la acción de los bacilos libres o en el interior de fagocitos, drenan a través de los canales linfáticos peribronquiales regionales, hasta los ganglios linfáticos traqueo bronquiales, dando lugar a la aparición de granulomas caseificantes.

Sin embargo estos microorganismos infectantes no son erradicados de forma completa y los bacilos pueden persistir durante años e incluso quizá durante toda la vida como lo muestra en la figura 3. Aunque no siempre presenta una evolución autolimitada.

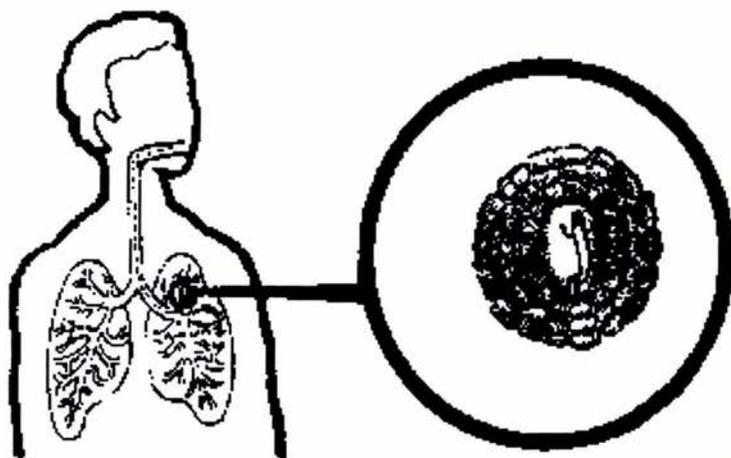


Figura 3: Las bacterias inactivas de la tuberculosis no pueden hacer daño ahora.

TUBERCULOSIS POS-PRIMARIA

La tuberculosis secundaria o pos-primaria es la fase de la infección tuberculosa que se produce en una persona previamente sensibilizada, tanto si los bacilos proceden de un origen endógeno o exógeno ya que la mayor parte de los casos de tuberculosis secundaria representa una reactivación de la enfermedad primaria asintomático, produciéndose en cualquier momento, en ocasiones después de décadas cuando disminuyen las defensas del paciente si llegara a reinfectarse. Este comenzaría en los segmentos apicales o posteriores de uno o ambos lóbulos superiores con afectación radiológica en las proximidades de la clavícula denominadas focos de Simón las cuales aparecen durante el periodo precoz de la bacteriemia tuberculosa, favorecidas por la elevada presión de oxígeno de la zona.

Para reconocer este tipo de lesiones principalmente en el pulmón, consiste en una zona focal de 1-3 cm de consolidación caseosa, habitualmente a una distancia de 1-2 cm de la superficie pleural, con una frecuencia menor, pero por otro lado a nivel histológico, la reacción habitual consiste en la formación de tubérculos con células epitelioides, células gigantes de tipo langhans, necrosis de caseificación, fibrosis e infiltración linfocitaria.

Pero cuando la tuberculosis afecta a pacientes inmunodeprimidos puede observarse una ausencia de células reactivas y por tanto las lesiones pueden estar representadas únicamente por focos necróticos inespecíficos, prácticamente acelulares y con abundantes micobacterias. La evolución de la infección apical es extremadamente variable y se presenta a continuación:

1. El proceso patológico puede sufrir cicatrización y calcificación, dando lugar a la tuberculosis fibrocalcificada detenida de localización apical.
2. La infección parenquimatosa inicial puede diseminarse a otras zonas del pulmón a través de diferentes vías originando la tuberculosis pulmonar progresiva.
3. Se puede extender hacia la pleura produciendo fibrosis, adherencias o derrames inflamatorios pleurales; en los casos en los que los bacilos presentan una extensión directa hacia la cavidad pleural, se produce un empiema tuberculoso.
4. Cuando las lesiones pulmonares erosionan y se introducen en los bronquios, el material puede ser eliminado mediante la tos y se observa una afectación del revestimiento mucoso de bronquios y traquea (tuberculosis traqueobronquial) o bien los microorganismos se pueden implantar en la laringe produciendo la tuberculosis laríngea.
5. La deglución de los bacilos permite que se afecten los acumulos linfoides del intestino delgado y grueso, produciendo la tuberculosis intestinal.
6. La tuberculosis miliar se debe a la aparición de lesiones blanquecinas/amarillentas de pequeño tamaño con un aspecto similar a semillas de mijo o alimento de canarios y su diseminación puede estar limitada a los pulmones pero cuando invaden una arteria, ó un foco caseoso se introducen en una vena pulmonar, produciendo un daño fatal en los órganos principales del paciente. Ciertos tejidos son especialmente resistentes a la infección tuberculosa y es raro observar bacilos en el corazón, músculo estriado, la glándula tiroides y el páncreas. Pero hay zonas de localización miliar más frecuentes como son: la médula ósea, estructuras oculares, ganglios linfáticos, hígado, bazo, riñones, glándulas suprarrenales, próstata, vesículas seminales, trompas de Falopio, endometrio y meninges, como lo muestra la figura 4. ^{6,13,14}

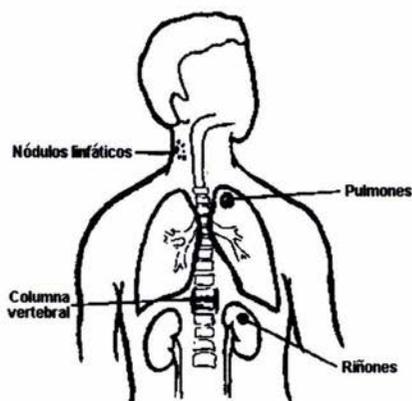


Figura 4: Sitios en donde se presenta comúnmente la tuberculosis.

Cuando ha fallado la primera línea de defensa representada por la inmunidad innata el organismo pone en marcha mecanismos de defensa más específicos, que despiertan un tipo de inmunidad especial de tipo retardado y mediada por células, que es la que nos defiende de las infecciones intracelulares.¹⁶

Una vez que el microorganismo ha penetrado en la superficie epitelial, encontramos células fagocitarias de la estirpe monocito/macrófago, las cuales al ingerir se transportan desde los ganglios linfáticos hacia los ganglios hiliares, donde se encuentra los linfocitos T, con numerosos receptores en su membrana, CR1 y/o CR3 que tienen un papel crucial en la adherencia o ingestión regulando de esta forma la fagocitosis de Mycobacterium tuberculosis fijándose en la superficie del microorganismo producido durante la activación del complemento de la vía alternativa facilitando su adherencia a la célula fagocítica, estimulando mecanismos dependientes e independientes del oxígeno, así los macrófagos son parte inductores de la respuesta inmune, actuando como células presentadoras de antígenos a los linfocitos T y al mismo tiempo, serían los efectores de la inmunidad retardada, al ser activados por las linfocinas liberadas por estos mismos linfocitos ya estimulados.

También la fibronectina es una glucoproteína con peso molecular relativamente alto, puede actuar como opsonina y molécula de adherencia en interacciones celulares presente tanto en las células como en el plasma, e incluso puede reaccionar con componentes del complemento por estas mismas razones.

Una de las desventajas es que la respuesta inmune frente al bacilo tuberculoso es muy variable, dependiendo principalmente del contenido genético del individuo, de su edad, de sus condiciones nutritivas y del ambiente epidemiológico que lo rodea.¹⁹

Dentro del organismo del huésped el bacilo se multiplica cada 20 h aproximadamente, así a los 10 días de ocurrida la infección constituyendo una población de 4000 bacilos, que sólo son capaces de formar un pequeño nódulo, fácilmente controlable por unos pocos linfocitos T y macrófagos por ellos activados, pero basta que un individuo demore 14 días en montar la respuesta inmune, para que la población bacilar alcance más de 130,000 bacilos y cuando llega a este número, el equilibrio tiende a volcarse en contra del paciente, los anticuerpos aunque presentes en muchos huéspedes no juegan un papel protector en la tuberculosis, sin embargo puede haber factores que ayuden a minimizar o controlar el incremento de los bacilos en el huésped como son:^{6,18,19}

1. Los CD4 ya activados proliferan produciendo factores como INF- γ (interferón gamma) que activa a los macrófagos transformándolos en células grandes y muy activas capaces de limitar la multiplicación de los Mycobacterium tuberculosis eliminando a los bacilos en el tubérculo.
2. Las células CD8 atacan a los macrófagos infectados, expresando antígenos bacterianos y lisándolos de manera que se liberan los bacilos, ya estando desprotegidos y expuestos a los macrófagos activados se desarrolla resistencia a la enfermedad dependiendo en buena medida de la predominación a la respuesta Th1, así la subpoblación de linfocitos sigue produciendo IL-2, INF- γ , IL-12, que promueve las reacciones inflamatorias e inmunidad celular^{20,21} como se observa en la figura 5.

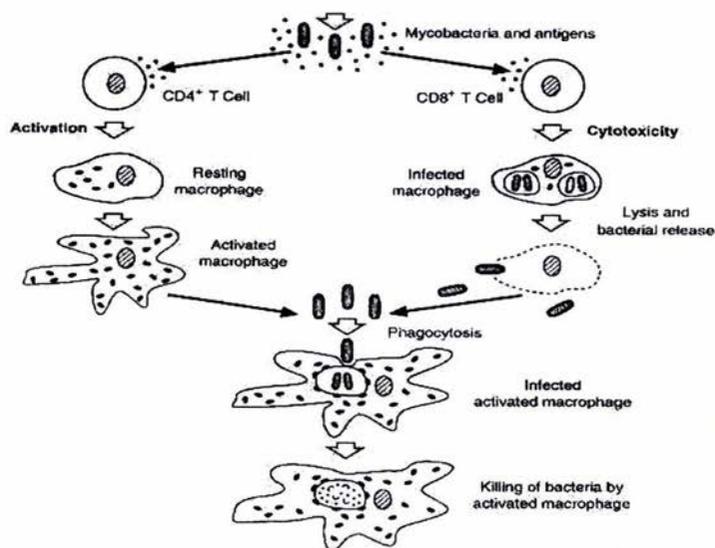


Figura 5: Mecanismo de acción de Mycobacterium tuberculosis

Además la micobacteria usa varias defensas para evitar que la maten los fagocitos uno de ellos son los sulfátidos y micobacterinas que impiden la fusión de los fagosomas con los lisosomas, favoreciendo su sobre vida dentro de los macrófagos.

De esta manera varios componentes de su pared lipídica, sin ser antígenos, actúan como modificadores de la respuesta inmune celular y de las reacciones de hipersensibilidad retardada. Entre ellos están el muramil-dipeptido, los ácidos micolicos, las ceras D, el lipoarabinomanano y al glicosil fosfatido linositol.

Sin embargo al inhibir la acción del antígeno por LAM puede ser relevante para la aparente inhabilidad a largo plazo para los infectados por Micobacterias para presentar antígenos a las células T CD4. Una proteína que ha despertado considerablemente interés, por sus propiedades supresoras de la respuesta linfocitaria, es el arabinogalactano, otro importante componente de la pared micobacteriana. Sea como fuere, según que antígeno procesa determinada sub-población de linfocitos T, la respuesta podría ser protectora o dañina.

Otro factor para la protección contra la micobacteria es la Apoproteína A surfactante (SP-A) que tiene un papel multifuncional en el pulmón que es una proteína componente del surfactante, de tipo C-lecitina y contiene una región en la molécula conocida como el carbohidrato reconocido como dominante, esta porción presenta características estructurales con el factor del complemento C₁₉ y enlazando la manosa a la proteína la cual funciona como una opsonina no-inmune para una variedad de patógenos

bacterianos y virus, aunque también juega un papel importante en la modulación de la respuesta inflamatoria e inmunológica, sugiriendo además que el SP-A altera la producción de oxígeno radical y bloquea la señal co-estimuladora crucial en la activación de linfocitos T, pero cuando los macrófagos son incubados con SP-A tienden a decrecer la producción del súper óxido indicando una disminución del estallido respiratorio y sugiriendo que SP-A tiene un papel protector contra las heridas con el oxidante causado por los macrófagos en el pulmón, además el SP-A puede aumentar la fagocitosis y regular la función del receptor fagocítico.^{22,23,24,25}

Esta respuesta clásica histológica a la infección por *Mycobacterium tuberculosis* varía en cada huésped, dependiendo del grado de respuesta celular inmune y de la concentración tisular de antígeno tuberculoso y cuando la respuesta celular es eficaz y la carga antigénica escasa, se producirá una respuesta proliferativa constituida por granulomas que estarán formados por linfocitos, macrófagos, células de Langhans y fibroblastos capaces de contener eficazmente la infección.

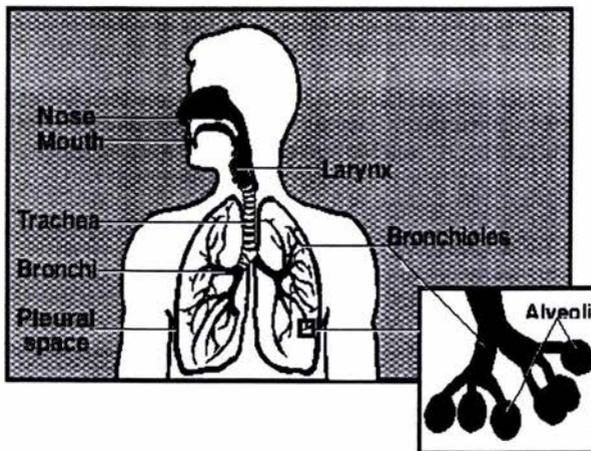


Figura 6: La tuberculosis empieza cuando las bacterias alcanzan los alvéolos, esto es cuando la persona inhala aire contaminado, las gotitas van hacia el tracto respiratorio superior, donde la infección se desarrolla.

PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS

A través de los datos epidemiológicos nos damos una idea de cómo la tuberculosis empieza de nuevo hacer estragos, en México debido a varios factores. Actualmente se han estado diseñando nuevos fármacos para combatir este mal, además de nuevos hallazgos para la identificación del agente causal de la tuberculosis, más rápidos y sencillos de realizar, aunque aún no se ha demostrado que tan eficientes y certeros son en sus resultados.

Enseguida se mostrará los métodos rutinarios para el diagnóstico de la tuberculosis que puede realizarse en laboratorios con instalaciones y equipo de poca y mediana complejidad, ya que los procedimientos para ambos casos son muy similares.

TINCIONES

BACILOSCOPIÁS:

La baciloscopía es una prueba que se realiza en primera instancia para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar, permitiendo observar a los bacilos ácido-resistentes que casi siempre corresponden a una tuberculosis. Hay que tener en cuenta que si en la muestra hay pocos bacilos pueden no visualizarse, inclusive la sensibilidad de la técnica guarda íntima relación con la cuantía de la presencia bacilar en la muestra a investigar, su rendimiento será diferente según la localización de la enfermedad:

- ◆ En la zona pulmonar con lesiones extensas o cavitarias alcanza su máxima eficiencia debido a la abundante presencia de bacilos en la expectoración.
- ◆ En las zonas extrapulmonares, en cambio la cuantía y la presencia bacilar es menor, de ahí su baja confiabilidad

Sin embargo la baciloscopía no debe omitirse en ninguna circunstancia, considerando la sencillez del método, su bajo costo y rapidez con que entrega un diagnóstico, se estima que para que la muestra sea positiva con una probabilidad del 80% debe haber de 5000-10,000 bacilos/ ml de la muestra y alrededor de 50,000 bacilos o más para que la probabilidad sea del 90-95%³².

Una de las razones por la cual se fija el colorante a la micobacteria se debe a que la mezcla de fucsina-fenol (carbolfucsina) es más soluble en los constituyentes celulares altos en lípidos, formando un complejo único y estable con fucsina-fenol y RNA bacteriano, pero se necesita calor o un detergente para que la tinción penetre en la envoltura lipídica del bacilo y una vez teñidas, resisten a la decoloración de una solución alcohol-ácido de este modo los bacilos se visualizan de color rojo sobre un fondo azul por el colorante de contraste que en consecuencia otros microorganismos por carecer de una gran cantidad de lípidos no retienen la coloración siempre y cuando se realice por el método de Ziehl-Neelsen o también llamado tinción de BAAR.^{26,27}

La sencillez del estudio permite monitorear al paciente, mensualmente durante su tratamiento, para controlar la evolución de la enfermedad y calificar la terapia como éxito o fracaso.

Existen dos tipos de coloración:

1. Carbofucsina: una mezcla de fucsina con fenol (ácido carbólico)
 - ❖ Ziel-Neelsen (coloración caliente)
 - ❖ Kinyoun (coloración fría)
2. Fluorocromo/ auramina O, con un segundo fluorocromo, rodamina o sin él.

Con estas técnicas, los extendidos con carbofucsina deben ser observados con un objetivo de inmersión 100x, por el contrario a los preparados teñidos con auramina se observan en un objetivo de 25x, aumentando la visión de campo y reduciendo el tiempo necesario para observar un área determinada del preparado.

Otra técnica de fluorescencia es con fluorocromo que necesita una fuente luminosa intensa: Un quemador de vapor de Hg^o de 200 watt o una luz intensa con un filtro de isocianato de fluoresceína (FITC), de esta manera las bacterias teñidas con este método son amarillas brillantes contra un fondo oscuro, lo que permite la observación del preparado con poco aumento sin perder sensibilidad. Por otro lado se puede hacer modificaciones de la tinción del fluorocromo auramina incluyendo solamente rodamina, dando una apariencia dorada a las células o el uso de naranja de acridina como contra coloración, que produce un fondo rojo a anaranjado.²⁷



Figura 7: Tinción de Ziehl-Neelsen de Mycobacterium tuberculosis

EXAMEN BACTERIOLÓGICO

El diagnóstico definitivo para la identificación del Mycobacterium tuberculosis es mediante el cultivo sin embargo su crecimiento es lento y los resultados quizás no se obtengan hasta después de 2-8 semanas por los métodos convencionales de los cuales los más empleados son los medios Lowenstein-Jensen, Middlebrook y Mitchison no pudiendo considerarse negativas hasta transcurridos 2 meses de la siembra.

Otros métodos de cultivo como los radiométricos (BACTEC) pueden conseguir detectar crecimiento en 7 días, en el cual se emplean unos frascos que contienen medio de cultivo de Middlebrook enriquecido con ácido palmítico y otros ácidos grasos marcados con C^{14} que es un isótopo radiactivo que ocurre naturalmente en la naturaleza y que emite radiaciones beta es decir electrones de muy baja frecuencia, lo que representa una radiactividad mínima inofensiva para el personal de laboratorio y si hay micobacterias vivas al metabolizar los ácidos grasos con C^{14} liberan el isótopo en forma de dióxido de carbono marcado con C^{14} al medio ambiente, desde la botella que contiene el medio de cultivo donde es aspirado y llevado a una cámara de ionización donde produce una corriente eléctrica proporcional a la cantidad de bacilos en crecimiento.²⁸

Las aplicaciones de este método son:

1. Detección rápida de micobacterias para diagnóstico
2. Prueba de diferenciación P-Nitro- α -Acetil amino-Hidroxi propiofenona (NAP) del complejo Mycobacterium tuberculosis de las otras micobacterias.
3. Pruebas de susceptibilidad a los medicamentos antituberculosos.



Figura 8: Colonias de Mycobacterium tuberculosis en el medio Lowenstein-Jensen.

DIAGNÓSTICO POR BIOLOGÍA MOLECULAR

La biología molecular es un método diagnóstico que se utiliza en muchas enfermedades como en el caso de la tuberculosis a través de la reacción en cadena de la polimerasa se ha empleado con excelentes resultados, debido a su alta sensibilidad y especificidad, así como la rapidez con que se obtiene los resultados.

Conocida también como PCR (siglas en inglés de polymerase chain reaction o sea reacción en cadena de la polimerasa) se pueden encontrar cantidades mínimas de un agente infeccioso en una muestra clínica, gracias a la amplificación selectiva y repetitiva de una secuencia de nucleótidos de un microorganismo, en síntesis la PCR consta de 3 pasos:

1. La desnaturalización del ADN en la muestra, al somerterla a altas temperaturas (95°C) para lograr la separación de las cadenas.
2. La hibridación de los cebadores (a 55°C) que son unos fragmentos cortos de ADN complementarios a los extremos 5' y 3' de las secuencias por amplificar y a partir de los cuales se inicia la síntesis, estos son específicos de la secuencia del microorganismo que ha de descubrir.
3. La extensión de estos cebadores por la enzima ADN polimerasa (a 72°C) termoestable (la taq polimerasa es extraída de la bacteria Thermus aquaticus) que produce 2 bandas de ADN que son idénticas a la banda blanco original.

En resumen todas estas reacciones se llevan a cabo de una forma automatizada en un equipo denominado termociclador. Así, en cada ciclo de estos 3 pasos, se duplica el material genético en un factor de 2n (donde n es el número de ciclos) hasta que éste se evidencia fácilmente en un gel de agarosa y se confronta con una sonda específica para confirmar la identificación final del material encontrado (figura y tabla 9).

La desventaja de la técnica está en que es compleja, costosa y que puede haber problemas por la contaminación ambiental con fragmentos libres del DNA micobacteriano, que dan lugar a reacciones falsas positivas^{29,30}

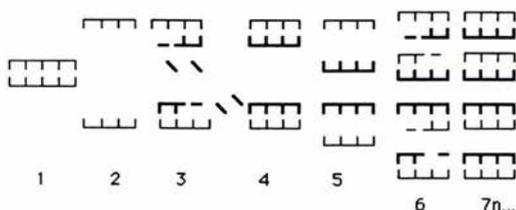


Figura 9: Reacción en Cadena de la Polimerasa Fuente 36

1= Primer paso. Mezcla de reacción	5= Desnaturalización
2= Desnaturalización	6= Hibridación y extensión
3= Hibridación y extensión	7= ADN duplicado
4= ADN duplicado	

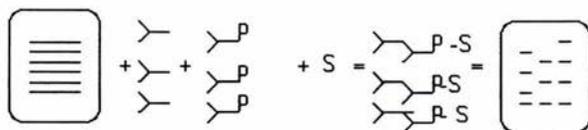
WESTERN BLOT

Otra técnica que también se usa es el Western blot que se refiere a la transferencia de proteínas de un gel a una membrana, en el cual se busca caracterizar cierto antígeno proteico que está mezclado con otros antígenos, realizando primero una separación analítica, habitualmente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio, de forma que las posiciones de las diferentes proteínas en el gel sean en función a sus tamaños moleculares.

Una vez que el grupo de proteínas separadas se transfiere del gel separador a una membrana de soporte por acción capilar o por electroforesis de forma que la membrana adquiere una replica del conjunto de macromoléculas separadas presentes en el gel. Así el dodecil sulfato de sodio es desplazado del gel por las proteínas durante el proceso de transferencia y solemos recuperar los determinantes antigénicos nativos a medida que la proteína se vuelve a plegar.

Subsecuentemente se corta en tiras delgadas verticales, y se ponen a reaccionar los anticuerpos específicos para las proteínas bacterianas que se hallan en la membrana y después de un lavado se aplica el conjugado que es un anti-anticuerpo marcado con peroxidasa de rábano, se incuba, se vuelve a lavar y se adiciona el sustrato enzimático, una reacción de unión antígeno-anticuerpo se observará una banda de color café que hace evidente a los anticuerpos que reaccionaron con las proteínas que migraron en ese sitio (figura y tabla 10).

Al comparar con un control se ubica y se determina el tipo de proteína para la cual hay antígenos específicos; de esta forma se puede definir exactamente contra cuáles proteínas están dirigidos los anticuerpos del paciente y así mismo determinar la fase de la infección en que se encuentra.



Electroforesis de proteínas transferidas a nitrocelulosa	Anticuerpos (suero)	anti-anticuerpo positivo peroxidasa	sustrato	reacción antígeno-anticuerpo	Visualización de la reacción
--	---------------------	-------------------------------------	----------	------------------------------	------------------------------

Figura 10: western-blot Fuente 36

IDENTIFICACIÓN DE CEPAS POR POLIMORFISMO DE LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP)

Este tipo de técnica se utiliza en estudios de epidemiología para establecer relaciones genéticas entre cepas aisladas en distintos pacientes de una comunidad por lo que se emplean cepas puras de Mycobacterium tuberculosis cultivadas en medio de Löwenstein-jensen.³⁰

La técnica utilizada es la siguiente:

1. Las bacterias se rompen con lisozima, proteinasa K y dodecil sulfato de sodio.
2. El ADN obtenido de las bacterias lisadas se precipita con isopropanol.
3. Se toma una alícuota del ADN obtenido y se digiere con la enzima de restricción PvuII.
4. Los fragmentos resultantes se separan por electroforesis y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa, la cual es sumergida en una solución que contiene la secuencia de inserción IS-6110 marcada con digoxigenina para formar híbridos.
5. Los híbridos se detectan con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina.
6. El sustrato que se emplea es quimioluminiscencia y la luz que emite se registra en una película radiográfica, así se obtienen patrones de banda que son características para la cepa de la bacteria.

PRUEBAS INMUNOLÓGICAS

PRUEBA DE LA TUBERCULINA (PT)

La prueba de la tuberculina sigue constituyendo hoy en día una herramienta útil para el diagnóstico de la tuberculosis, con ella se pone de manifiesto una respuesta inmunológica mediada por células y para la realización de la prueba de la tuberculina debe administrarse como dosis inicial de 2-5 unidades de tuberculina (UT) del derivado proteínico purificado ambos bioequivalentes a 5 UT del derivado proteínico purificado estándar definido así por la OMS (Organización Mundial de la Salud) como la medida estándar internacional.

La administración al paciente es por vía intradérmica, en la cara anterior del antebrazo, lejos de las venas y libre de lesiones, utilizando una jeringuilla graduada en décimas de centímetros cúbicos, con una aguja corta y biselada, realizando a las 48-72 h una medición en milímetros en los límites de la induración que presenta según el diámetro transversal al eje longitudinal del antebrazo dando lugar a reacciones locales intensas, efectuándose inicialmente con 5 unidades de tuberculina pero, si no presenta alguna induración se puede inyectar 100 UT o 250 unidades.⁵

Recientemente para evitar el deterioro antigénico producido en la elaboración de las PPD por autólisis, calentamiento y precipitación se están elaborando las denominadas nuevas tuberculinas (NT), que parecen tener un mayor contenido en antígenos específicos de especie del tipo IV.

En la actualidad existen 18 variedades disponibles de nuevas tuberculinas, entre las que se encuentran las de Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium avium, Mycobacterium ulcerans, Mycobacterium kansasii, Mycobacterium scrofulaceum, Mycobacterium marinum, Mycobacterium xenopi y Mycobacterium fortuitum.³²

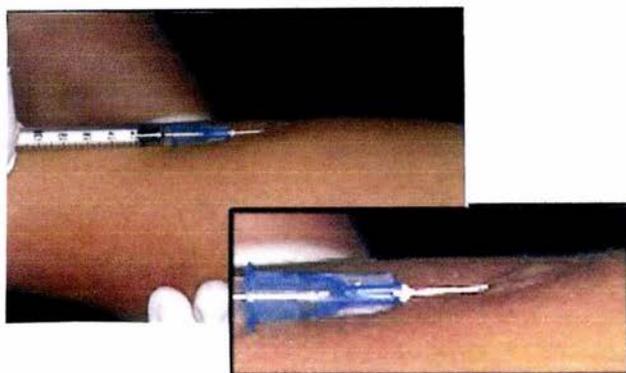


Figura 11: Administrando la prueba Mantoux o prueba de la tuberculina

Rangos que hay que tomar en cuenta en la medición de la induración al aplicar el PPD

No vacunados con BCG	5 mm o más
Vacunados con BCG	15 mm o más o presencia de vesiculación o necrosis
Contactos con enfermos bacilíferos	5 mm o más (no se tendrá en consideración el antecedente de vacunación BCG)
Enfermos de SIDA *	Cualquier tamaño de induración

*Es difícil establecer un límite exacto, cuanto mayor es la induración y cuanto más tiempo ha transcurrido desde la vacunación, mayor probabilidad de que la positividad de la prueba sea por infección tuberculosa.³⁰

Se ha demostrado que cuando una persona es positiva frente a la prueba de mantoux habitualmente lo sigue siendo durante el resto de su vida, pero se ha observado que algunas personas sensibilizadas pasan a ser negativas frente a la tuberculina tras un ciclo intensivo de quimioterapia, lo que se considera una erradicación completa de todos los bacilos viables.

También puede haber reacciones falso negativos, cuando no se deben a un artefacto de tipo técnico, pudiendo estar producidas por infecciones virales o vacunación, fármacos, hormonas esteroideas, mal nutrición, tumores, sarcoidosis, inmunológicas celulares al avanzar la edad de las personas, pero hay una forma infrecuente de falsos negativos denominada anergia verdadera pudiendo deberse a una tuberculosis diseminada masiva que acompañada de una supresión no selectiva de las respuestas cutáneas frente a otros antígenos. ¹⁴

ADENOSINA DESAMINASA

Esta actividad enzimática e indirecta se ha correlacionado últimamente con la tuberculosis y puede ayudar en casos en los que el diagnóstico es difícil sobre todo a partir de líquidos con pocos bacilos, basándose en una enzima derivada del metabolismo de los nucleótidos purínicos encontrándose elevada en los exudados provenientes de pleuresía, peritonitis y meningitis tuberculosa incluso en el suero de pacientes con tuberculosis activa.

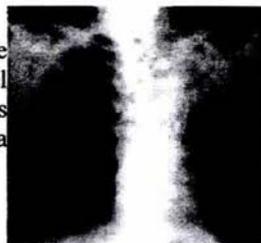
Como el diagnóstico de la tuberculosis en suero es difícil, así como la confirmación bacteriológica es infrecuente y en la mayoría de las ocasiones tardía, la determinación de la actividad de ADA es muy útil para su diagnóstico, teniendo niveles de actividad superiores a 43 U/l en derrames pleurales, pericardios y peritoneales y valores superiores a 9U/l en líquido cefalorraquídeo permitiendo establecer la etiología tuberculosa en estos procesos. ^{31,33}

TÉCNICAS DE IMAGEN

La tuberculosis pulmonar se sospecha a menudo por primera vez basándose en datos radiográficos, una lesión apical es lo más frecuente.

1. Radiografía de tórax anteroposterior y lateral: Es prescindible su realización ya que la apariencia radiológica de la enfermedad varía ampliamente dependiendo de varios factores: ya sea la edad del paciente, su estado inmunológico y la agresividad del patógeno presente.

Figura 12: Paciente de 52 años con padecimiento de tuberculosis pulmonar, muestra un desplazamiento del mediastino hacia la izquierda y lesiones pulmonares de ambos campos superiores, la tráquea no sólo está desplazada a la izquierda sino que está incurvada (traqueoescoliosis)



2. Tomografía Axial Computada (TAC) de tórax: La tomografía axial computada con técnica helicoidal, así como, con cortes finos de alta resolución, proporciona muy buena información en tuberculosis pulmonar y afectación mediastínica, siendo muy útil para valorar adenopatías, incluso la sensibilidad de la tomografía es muy superior a la radiología de Tórax en un 72%, pudiendo incluso detectar un nódulo miliar menor de 2 mm. 34

Figura 13: La tomografía axial computada de tórax pone de manifiesto el desplazamiento de la tráquea y la extensa destrucción parenquimatosa. La hemoptisis en un enfermo con secuelas tuberculosas puede responder a varias causas:



1) Bronquiectasias, 2) Sangrado de Aneurismas venosos de la pared cavitaria, 3) Reactivación de la tuberculosis, 4) Aspergiloma intracavitario.

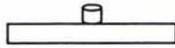
ELISA

La técnica de ELISA fue descrita en 1971, por dos equipos de trabajos diferentes, el de Engvall y Perlmann en Suecia y el de Van Weemen y Schuurs en Holanda.

Definiendo esta técnica como un inmunoensayo que permite determinar la concentración de un antígeno o un anticuerpo mediante el uso de uno de ellos en fase sólida y el otro en solución, detectándose la formación del complejo antígeno-anticuerpo mediante un trazador enzimático y sus distintas modalidades se pueden clasificar en los siguientes grupos ³⁵:

2. Técnicas no competitivas: Un antígeno específico o anticuerpo está unido a una fase sólida que puede ser en tubo o microplaca añadiendo el suero del paciente que posee los anticuerpos y después se adiciona el conjugado constituido por un anti- anticuerpo IgG o IgM unido a una enzima seguido del sustrato específico para la enzima que lo va a modificar y produciendo un compuesto coloreado, cuya intensidad es proporcional a la concentración de anticuerpo en el suero del paciente. ^{31,36}
3. Técnicas competitivas: Para detectar antígenos o haptenos con frecuencia se utiliza una reacción ELISA de enlace competitivo en fase sólida. En este análisis el ligando no marcado compite con un ligando conjugado con enzimas por un número limitado de sitios de enlace con el anticuerpo inmovilizado, tras una incubación breve, se procede a separar el ligando enzimático conjugado enlazado y libre mediante la técnica de separación en fase sólida agregando un sustrato y la enzima presente en la fracción enlazada lo transforma en un producto coloreado que se relaciona de manera inversa con la concentración del ligando no marcado en la muestra problema. ^{33,36,37} se entenderá mejor como lo muestra en las figuras 14, 15 y 16.

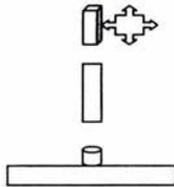
1. Antígeno fijado a una superficie de fase sólida.



2. Añadir el suero de prueba.



3. Añadir la anti-inmunoglobulina marcado con enzima.



4. Añadir el sustrato enzimático y después color.

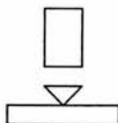
Figura 14: ELISA no competitivo detección de anticuerpos. Fuente 33

1. Anticuerpo absorbido a placas.



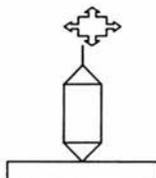
Lavar

2. Añadir antígeno en estudio.



lavar

3. Añadir anticuerpo específico marcado con enzima.

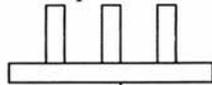


4. Añadir sustrato enzimático y después desarrollo de color.

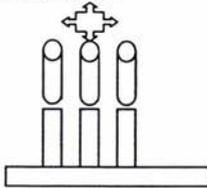
Figura 15: ELISA no competitivo para detección y determinación de antígeno.

Los métodos competitivos y no competitivos son muy sensibles y detectan picogramos de hormona y otras sustancias.

1. Absorber antígeno a superficie.

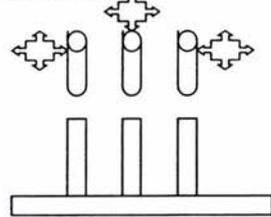


2ª. Añadir anticuerpo marcado con enzima + anticuerpo desconocido.



Añadir sustrato.

2b. Añadir anticuerpo marcado con enzima.

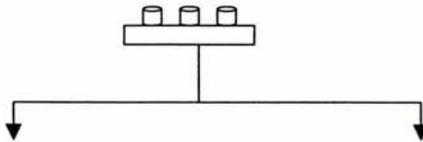


Añadir sustrato.

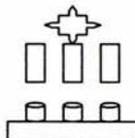
Figura 16: ELISA competitivo para detección y determinación de anticuerpos.

Fuente 33

1. Absorber anticuerpo a superficie.



2ª. Añadir antígeno marcado con enzima y antígeno desconocido.



Añadir sustrato.

2b. Añadir antígeno marcado con enzima.

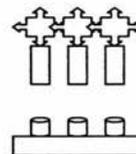


Figura 17: Método competitivo para análisis de antígeno. Fuente 35

El método indirecto es ampliamente utilizado para la determinación de anticuerpos, ya que se necesitan sólo unos pocos conjugados para analizar estos de una variedad de enfermedades.³⁵

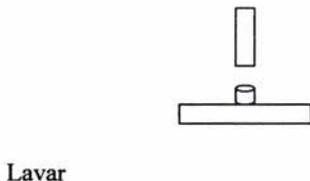
Un ejemplo es la tuberculosis que valora la cantidad de anticuerpos IgG que se ligan al antígeno A-60 del Mycobacterium tuberculosis mediante el método de ELISA, utilizando un marcador enzimático conjugado con un ligando, que puede ser un antígeno, un anticuerpo específico para el antígeno de interés o un anticuerpo para el anticuerpo primario. Casi todas las pruebas ELISA son ensayos en fase sólida en los cuales se absorbe un antígeno sobre un soporte sólido.

Solamente son de utilidad la presencia de títulos altos asociados a antecedentes epidemiológicos y clínicos del paciente pero puede haber anticuerpos con especificidad para micobacterias en el líquido cefalorraquídeo teniendo una utilidad diagnóstica que normalmente no existe ningún tipo de anticuerpos en este tipo de muestra.³⁰

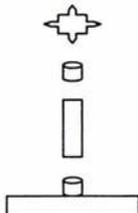
1. Antígeno absorbido a la placa.



2. Añadir suero (el anticuerpo específico se une al antígeno).



3. Añadir anti-globulina marcado con enzima que se une al anticuerpo.



4. Añadir sustrato.

Figura 18: Método indirecto para la detección y determinación de anticuerpos. Fuente 35

Actualmente, con el empleo de la técnica de ELISA es posible hacer el diagnóstico serológico de la tuberculosis con una sensibilidad vecina al 90% y una especificidad cercana al 100%, sin embargo, la sensibilidad es menor en la tuberculosis extrapulmonar cuando existe un número limitado de bacilos, que es justamente cuando las técnicas bacteriológicas también muestran sus mayores limitaciones.

Ahora se ha estado utilizando el antígeno A-60 con el que se ha obtenido una alta especificidad cercana al 100% pero va disminuyendo en antiguos enfermos tuberculosos o enfermos respiratorios, o sujetos con VIH ⁺, pero recientemente la técnica de ELISA emplea varios antígenos micobacterianos por ejemplo glicolípidos de Mycobacterium bovis BCG (Bacilo Calmette y Guérin), antígenos 5 y 6 de Mycobacterium tuberculosis, proteína 64Kda de Mycobacterium bovis BCG y proteína antigénica 32Kda, todas ellas han sido usadas para el diagnóstico serológico de la tuberculosis.^{31,33}

Uno de los componentes más abundantes del citoplasma es el antígeno A-60 preparado del Mycobacterium bovis BCG y purificado por cromatografía en gel. Es una macromolécula (106-107Da) complejo proteico lipopolisacárido, que se ha usado en las pruebas de ELISA para el sero-diagnóstico de tuberculosis y estima anticuerpos IgM e IgG en el suero de los pacientes.^{38,39}

Entre los diferentes antígenos que se han ido utilizando (antígenos 5,6,38Kda) el A-60 ha sido el mejor comparado con las otras pruebas, todas ellas utilizan suero o plasma del paciente, aunque el Kp90 es un kit comercial basado en la medición del anticuerpo IgA que difiere de los otros métodos y con una sensibilidad del 62.58% y una especificidad del 66.3% respectivamente.

Por otro lado el antígeno A-60 determina la medición de anticuerpos IgG con una sensibilidad del 80.77% y especificidad del 88.4% para el diagnóstico de la tuberculosis activa, mientras que el 38Kda determina anticuerpos IgG pero con una sensibilidad de 64% y especificidad del 80.74% más bajo comparado con la prueba de A-60.³⁹

REACTIVOS:

Los anticuerpos que se emplean en el método ELISA pueden ser de origen monoclonal (que son anticuerpos producidos contra epitopes específicos de un antígeno; por lo tanto son altamente específicos) o son anticuerpos policlonales (generalmente son purificados de animales inmunizados con el antígeno de interés en consecuencia, los anticuerpos producidos contra un antígeno complejo reaccionan con una variedad de determinantes antigénicos o epitopes distintos) que se suministran como antisuero no fraccionado o fracciones de inmunoglobulinas purificadas.²⁸

Esta diversidad de anticuerpos va de ser solubles o estar inmóviles sobre un soporte sólido o enzimático reaccionando con determinantes antigénicos específicos de un antígeno o con un anticuerpo ligando-específico (anticuerpo primario).

Por otro lado los antígenos purificados con tecnología recombinante, se utilizan como conjugados marcados o enzimáticos y son inmóviles o solubles, dependiendo del protocolo de análisis, incluyendo a los estándares y controles que son materiales liofilizados de origen humano determinando así las concentraciones de antígenos.

También es posible marcar en forma no covalente anticuerpos o enzimas con biotina y agregar avidina, esta posee 4 sitios de enlace para la biotina y no todos ellos participan en la interacción con el anticuerpo marcado en donde los sitios de enlace libres restantes funcionan como aceptores para la enzima de este mismo. Así el procedimiento se acorta utilizando anticuerpo marcado con biotina y avidina marcada con enzima. Es importante incluir soluciones amortiguadoras para mantener el pH de la reacción y la concentración iónica, para diluir las muestras o como diluyente para reconstruir los reactivos liofilizados para el análisis.

Las combinaciones de enzima y sustrato que se emplean en los diversos métodos ELISA incluyen:

2. Peroxidasa de rábano y su sustrato, peróxido de hidrógeno, que en presencia de cromógeno 0-fenilendiamina produce un producto de color amarillo-naranja medible.
3. Galactosidasa β y su sustrato O-nitrofenil- β -D-galactopiranosido que se transforma en un producto nitrofenolado amarillento medible.
4. Fosfatasa alcalina y su sustrato P-nitrofenilfosfato que también se transforma en nitrofenolato.^{34,37,36}

APLICACIONES DE ELISA

La técnica de ELISA es utilizable para el análisis de cualquier anticuerpo, si el antígeno adecuado se puede inmovilizar convenientemente en una fase sólida. Hasta ahora ELISA se ha usado especialmente en el campo de las enfermedades infecciosas, sin embargo existen métodos inmunoenzimáticos disponibles para medir el antígeno relacionado con el factor VIII, marcadores de tumores, antígeno carcinoembrionario, fetoproteínas α , gonadotropina coriónica humana y anticuerpos IgG e IgM que produce el huésped como respuesta a diversas infecciones virales.

Recientemente se desarrollo una modificación al método de ELISA para detectar antígenos al VIH en suero, plasma y LCR pero no es tan sensible como las demás pruebas de enzimoanálisis. La tendencia actual en detección de antígenos es utilizar anticuerpos monoclonales para identificar antígenos virales, específicos ya que estos anticuerpos se generan con más facilidad ante las proteínas virales de bajo peso molecular.

VENTAJAS Y DESVENTAJAS

- ◆ La ventaja de emplear antígenos conjugados con enzimas y anticuerpos es que pueden almacenarse en condiciones estériles y utilizarse durante años, sin pérdida apreciable de su actividad enzimática e inmunológica.
- ◆ El uso de enzimas como marcadores conlleva un riesgo mínimo de contaminación y los procedimientos son relativamente fáciles de ejecutar. No requiere de equipo costoso y el análisis puede llevarse a cabo en laboratorios equipados con espectrofotómetro simple.
- ◆ La especificidad de la prueba depende, de la especificidad de los anticuerpos que se utilicen, además incluye bajo costo, seguridad, sensibilidad y facilidad de realización.³⁶
- ◆ La sensibilidad que puede llegar a tener es de un 90-92% en la tuberculosis post-primaria activa o extrapulmonar y del 60-65% en la tuberculosis primaria y hasta el 50% en la tuberculosis inactiva. Siempre y cuando se realice en este tipo de enfermedad.^{1,32}
- ◆ Algunas desventajas son que la mayoría de los análisis requieren pasos múltiples de separación e incubación, por lo cual toman más tiempo para realizarlo, lo que incrementa la posibilidad de error.³⁶

KITS COMERCIALES PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS

En los últimos años se han introducido nuevas técnicas, que prometen revolucionar en un futuro próximo el manejo de la tuberculosis y otras enfermedades infecciosas y el de muchas otras enfermedades crónicas.

Durante el último decenio se ha tomado conciencia de que para lograr la erradicación de la tuberculosis, es muy importante mejorar nuestros métodos diagnósticos para que de esta manera se trate al enfermo en etapas tempranas de la enfermedad.

A los nuevos métodos bacteriológicos se han sumado nuevos ensayos inmunológicos:

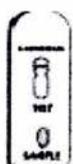
IMMUNOTECH-TB

Es una prueba inmunocromatográfica para la detección precoz de anticuerpos contra el bacilo de la tuberculosis. La prueba emplea una mezcla única de antígenos que pueden ser capaces de diferenciar los anticuerpos presentes en una infección de tuberculosis activa.

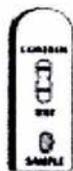
Usan tanto suero, plasma o sangre entera, detectándose la presencia de la inmunoglobulina G (IgG), ya que actúan directos contra los antígenos purificados incluyendo entre algunos a los antígenos 38 Kda y 30/31 Kda de Mycobacterium tuberculosis inmovilizados en una membrana de nitrocelulosa, el diluyente que se utiliza consiste en un anticuerpo contra IgG humano marcado con una partícula de oro coloidal enlazada a una proteína.

Una vez que la muestra es agregada al cassette con el diluyente, la mezcla fluye lateralmente a través de la membrana, así el anticuerpo específico contra IgG humano enlazado a una proteína marcado con una partícula de oro coloidal se conjuga al anticuerpo IgG de la muestra.

Posteriormente si contiene el anticuerpo para la tuberculosis el complejo se une a los antígenos fijados en la fase sólida y por lo tanto en el área de prueba produce una banda rosa / púrpura, en la prueba negativa no hay presencia de banda y la muestra sigue fluyendo a lo largo de la membrana produciendo una banda rosa / púrpura en el área de control demostrando que los reactivos están funcionando apropiadamente como se observa en la figura 19.^{41,42}



Muestra de un resultado negativo a Mycobacterium tuberculosis.



Muestra de un resultado positivo a Mycobacterium tuberculosis

Figura 19: Immunotect-TB

El immunotect-TB es estable a una temperatura de 8-30°C pudiendo durar hasta 24 meses desde el día de su fabricación, siendo designado para detectar anticuerpos contra Mycobacterium tuberculosis activa, pero si se utiliza en cualquier otro fluido corporal no da resultados confiables.

Obteniendo muestras de pacientes que han recibido recientemente antibióticos o que están frecuentemente experimentando terapias diversas no rendirán buenos resultados por los bajos niveles de anticuerpos después de ingerir medicamentos estando aún la infección presente, recomendando suspenderlos 5-8 días, antes de hacer la toma.

SERO-TB

El reactivo sero-TB (prueba de Calderón) que es una suspensión homogénea de micobacterias tuberculosas muertas (3 cepas de Mycobacterium tuberculosis y 2 cepas de Mycobacterium bovis) en una solución amortiguadora adicionada de colorantes de contraste y conservadores. Se utiliza para el diagnóstico serológico de la tuberculosis activa en todas sus localizaciones (pulmonar, visceral, ósea, meníngea etc), cubriendo las diferentes respuestas humorales del enfermo, detectándose las infecciones en forma temprana, las reacciones cutáneas utilizadas para el diagnóstico de tuberculosis, se muestran positivas tanto en los procesos activos, como en los inactivos o en los vacunados con BCG.

Por lo tanto las reacciones serológicas con sero-TB se muestran positivas, solo en las infecciones activas, a partir de la tercera semana de iniciada la infección. Para hacer un diagnóstico preciso se recomienda suspender cualquier medicamento durante 5-8 días antes de hacer la toma de muestra.

Los antígenos de los patógenos (Cepa Mycobacterium tuberculosis y Mycobacterium bovis) se absorben en esferas de látex, así cuando el paciente ha tenido una experiencia inmunológica con tuberculosis, sus anticuerpos aglutinarán de manera pasiva las partículas. Estos ensayos generalmente son pruebas de filtro (Tamizaje) pues sólo determinan la presencia o no de anticuerpos.^{31,43}

Los mecanismos de acción que ocurre en la prueba es que los anticuerpos de alguna manera se fijan a la superficie de los antígenos mediante fuerzas eléctricas intramoleculares o por uniones covalentes así la aglutinación de las partículas de látex ocurre como un indicador de las interacciones antígeno-anticuerpo sobre la superficie de estos soportes.

Son necesarios métodos rápidos, fáciles de realizar y de bajo costo para mejorar el diagnóstico de la tuberculosis en los países de bajos ingresos, especialmente para aquellos pacientes con baciloscopias negativas.

En la medida en que se establezca un conocimiento del funcionamiento de los kits comerciales es preciso destacar las ventajas y desventajas, especialmente del sero-TB e immunect-TB que a continuación se dan:

VENTAJAS

1. Detecta directamente a los anticuerpos micobacterianos en el suero o sangre entera empleando antígenos cada vez más específicos.
2. Son simples de ejecutar y no requieren de personal especializado
3. Utilizan equipos que ya están disponibles en muchos laboratorios de los países en desarrollo
4. Requieren de la extracción de una cantidad mínima de muestra, lo que los convierte en excelentes procedimientos de tamizado o monitoreo

5. Podrían aplicarse a todos los enfermos sintomáticos respiratorios lo que permitiría identificar a los sospechosos de tuberculosis activa con el fin de someterlos a otros métodos diagnósticos.
6. Los resultados están en pocos minutos ya que su procedimiento es muy rápido.

DESVENTAJAS

1. No se utilizan como pruebas confirmatorias para determinar la ausencia o presencia de la infección de la tuberculosis.
2. Solamente se pueden usar suero, plasma o sangre dependiendo del kit comercial que se utilice por lo cual si usan otros tipos de fluidos corporales diferentes al que está indicado en las instrucciones los resultados no serían confiables.
3. Se debe procurar en realizar inmediatamente las pruebas, o se pueden almacenar máximo 3 días con el fin de evitar la disminución de los niveles de anticuerpo en la muestra.
4. Tienen una duración de 2 años, pasando este tiempo ya no es recomendable su uso.
5. Se utilizan sólo como pruebas presuntivas para someter al paciente a otros métodos de diagnóstico confirmando sus resultados con los anteriores.

Recientemente se ha visto una variedad de equipos de reactivos determinando con rapidez y eficiencia la infección tuberculosa. De hecho la mayoría presenta una similitud en cuestión a su uso y funcionamiento, aunque con ciertas modificaciones, enseguida se muestran unos ejemplos de diversos equipos para el diagnóstico de tuberculosis.

OTRAS OPCIONES DE EQUIPOS COMERCIALES

QuantiferON-TB: En 1990, Wood y colaboradores desarrollaron un ensayo de la citosina simple y rápida para el diagnóstico de la tuberculosis bovina, basada en la detección del interferón gamma ($INF-\gamma$) liberada en la sangre incubado in vitro con tuberculina o un derivado proteínico purificado (PPD) Mycobacterium bovis. Subsecuentemente largos campos de estudios mostraron que esta prueba significativamente mejoró la sensibilidad del método para la infección de Mycobacterium bovis en el ganado.

En 1991 fue acreditado por el comité de salud animal australiana como una prueba oficial para la tuberculosis bovina, pero en 1994 una adaptación de esta prueba fue desarrollada para el diagnóstico de Mycobacterium tuberculosis y Mycobacterium avium en el humano y ha sido mostrado para discriminar entre las dos infecciones y para correlacionar con las reacciones de la prueba de tuberculina en individuos con o sin infección de VIH.⁴⁴

Es una prueba cuantitativa in vitro que ayuda a diagnosticar la infección de Mycobacterium tuberculosis en humanos, detecta las respuestas inmunitarias mediadas por células incluyendo a los individuos que han sido previamente vacunados con varias cepas de BCG (bacilo Calmette Guérin).

La muestra sanguínea con anticoagulante es estimulada in vitro con el derivado proteínico purificado (PPD) humano, avian PPD o con un mitógeno Fitohemaglutinina (PHA) posteriormente se incuba toda la noche a 37°C en una atmósfera húmeda, la cantidad de Interferón- γ en el plasma subsecuentemente se cuantifica (en IU/ml) usando la prueba de ELISA.

Los resultados son obtenidos dentro de 24 h y con una sola visita del paciente a la clínica. Es rápida de realizar comparado con otros métodos convencionales y utiliza material y equipo básico de laboratorio. El QuantiFERON-TB provee un diagnóstico para diferenciar entre una infección por Mycobacterium tuberculosis o de micobacterias atípicas, así como Mycobacterium avium que puede causar linfadenitis en niños y se necesita ser excluido de otras causas como inflamación en los nódulos linfáticos causados por cáncer. La toma sanguínea es relativamente libre de riesgos y no afecta a la reactividad inmunitaria incluso no hay efecto del fenómeno anérgico porque el PPD no se administra in vivo.



Figura 20: kit comercial QuantiFERON-TB

- ✘ MYCO-DOT: Se basa en la detección del anticuerpo IgG utilizando el antígeno lipoarabinomano que se encuentra fijado a la membrana de nitrocelulosa y se usa un marcador de oro coloidal. Se maneja tanto suero como sangre entera, no requiere de equipo especializado y los resultados se leen visualmente en 20 minutos, la desventaja es que realiza varios lavados con solución buffer que podrían causar errores durante su desarrollo.

Los resultados son positivos cuando aparecen dos puntos de color rosa / rojo tanto en el área de prueba como en el área de control, si por consiguiente fuera negativo solamente aparecerá un punto rosa / rojo en el área de control.⁴⁷

La prueba de MycoDOT es cualitativa y se lleva a cabo en 3 pasos:

- ✘ Primero los antígenos de Mycobacterium tuberculosis son fijados en la membrana de nitrocelulosa.
- ✘ El anticuerpo de la muestra reacciona con el antígeno y forma un complejo antígeno-anticuerpo.
- ✘ El anti-anticuerpo monoclonal es marcado con un conjugado de oro coloidal y se fija al anticuerpo de la muestra.⁴⁶

Las ventajas al usar esta prueba son:

- ✘ No requiere de equipo especializado y los resultados se leen visualmente en 20 minutos.
- ✘ No requiere de personal capacitado y utiliza una mínima cantidad de muestra.
- ✘ Su ejecución es sencilla de realizar y rápida.

Pero por otro lado hay sus desventajas:

- ✘ Se deben utilizar sueros recientes no almacenados por más de 3 días.
- ✘ No se recomienda el uso del plasma porque podría bloquear los canales de la membrana de nitrocelulosa.
- ✘ Cada equipo comercial se utiliza una sola vez, esta prohibido el multiproceso en un solo estuche.
- ✘ Procurar no hemolizar las muestras sanguíneas ya que al extraer el suero el color rojo del hemolizado podría dar resultados falsos positivos.
- ✘ Después que ya se realizó la prueba se debe guardar el resto del material para evitar exponerlo al medio ambiente y que se contamine.
- ✘ Realizar varios lavados con solución buffer que podría causar errores durante su desarrollo, verificar bien el orden de los lavados que se vayan a hacer.⁴⁶



Figura 21: kit comercial MycoDOT

- ✱ Rapid test-TB: Es una prueba inmunocromatografica, y se realiza en una tira reactiva (diferente al immunotect-TB que es un cassette) detectando anticuerpos específicos para el antígeno 38 Kda, proveniente del Mycobacterium tuberculosis. Se utiliza solo suero ó plasma con una dilución de 100µl enseguida se coloca en un tubo de ensayo junto con la tira reactiva, después de 15 minutos de incubación, la presencia de 2 bandas de color rosa / púrpura se considera como positivo ^{48,49}
- ✱ Pathozyme-TB: Detecta la presencia del anticuerpo IgG en el suero del paciente para recombinarse con el antígeno 38Kda del Mycobacterium tuberculosis, su procedimiento es similar a la técnica de ELISA, los resultados son obtenidos en 2 h considerando que los kits sero-TB e immunotect-TB están en pocos minutos.
- ✱ Pathozyme IgG, IgA, IgM: Detecta la presencia de los anticuerpos IgG, IgA e IgM respectivamente, utilizando 2 tipos de antígenos 38Kda y LAM (Lipoarabinomannano) a la vez que también detecta la presencia de micobacterias atípicas. Los procedimientos son similares a los realizados por el método de ELISA, y los resultados se leen aproximadamente en 2 h. ^{48,49}

El avance tecnológico de las unidades de cuidados intensivos, plantea la necesidad de utilizar pruebas que brinden resultados más rápidos, una prueba de laboratorio en la evaluación de una emergencia, podría contribuir a estratificar el riesgo del paciente de manera que se pueda elegir la opción terapéutica más adecuada, ese sería uno de los objetivos para el futuro manejo de los equipos comerciales, además que disminuyen el tiempo de elaboración y el costo para países de bajos presupuestos como México. ^{50, 51}

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente el método inmunológico para el diagnóstico de la tuberculosis es el de ELISA siendo una prueba que incluye bajos costos, estabilidad de los reactivos, seguridad, sensibilidad y facilidad de realización, presenta algunas desventajas como son los pasos múltiples de separación e incubación, que requieren de más tiempo para efectuarlo, además que puede incrementar el riesgo de error, otro es conseguir antígenos purificados que son específicos para que la reacción sea confiable.

Los equipos comerciales sero-TB e immunotect-TB son métodos más sencillos de manejar que el ELISA, requieren menos tiempo de realización (2-3 minutos); y utilizan equipos y material básico que ya tienen en muchos laboratorios de los países en desarrollo, como México, además se utiliza una mínima cantidad de muestra del paciente lo que los convierte en excelentes procedimientos de tamizaje o monitoreo.

Podrían aplicarse a los enfermos sintomáticos respiratorios lo que permitiría identificar a los sospechosos de tuberculosis activa, con el fin de someterlos rápidamente a una terapia adecuada.

¿ Tendrán una sensibilidad y especificidad comparable para la determinación de anticuerpos de Mycobacterium tuberculosis diagnosticados por sero-TB e immunotect-TB que por el método de ELISA?.

OBJETIVOS

- ❖ Determinar la sensibilidad y especificidad de los equipos comerciales sero-TB e immunotect-TB comparados con el método de ELISA para el diagnóstico de Mycobacterium tuberculosis
- ❖ Determinar la utilidad de las pruebas sero-TB e immunotect-TB para la identificación rápida en pacientes con tuberculosis pulmonar y extrapulmonar.

HIPÓTESIS

Los equipos comerciales sero-TB e immunotect-TB tendrán una sensibilidad y especificidad comparable con el método de ELISA, además serán métodos reproducibles en cualquier laboratorio de diagnóstico microbiológico y un ahorro de tiempo significativo por ser más sencillos de realizar para el diagnóstico en pacientes con tuberculosis.

DISEÑO EXPERIMENTAL

TIPO DE ESTUDIO

Es un estudio transversal, descriptivo, y comparativo del método de ELISA con dos casas comerciales realizado en pacientes confirmados con tuberculosis y otros pacientes no tuberculosos, pero que padecían de otras patologías como: enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cáncer broncogénico, neumonías etc. que acuden a la Unidad de Neumología del Hospital General de México.

POBLACIÓN

Al azar

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se usaron muestras sanguíneas de pacientes que llegaron al laboratorio de Neumología del Hospital General de México con diagnóstico clínico de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar y que contaron con la comprobación bacteriológica por aislamiento de micobacterias, se tomaron los datos generales del paciente: nombre, localidad de origen, edad, tipo de paciente de diagnóstico o control de tratamiento además se manejaron muestras de control de pacientes que se confirmaron no tener tuberculosis pero padecían de otras patologías y se aseguro que la cantidad de muestra fuera suficiente para realizar toda la metodología.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se excluyeron del presente estudio, los cultivos positivos que resultaron no ser Mycobacterium tuberculosis.

CRITERIOS ÉTICOS

Debido a que en la Unidad de Neumología del Hospital General, estas pruebas del protocolo no entraron en el diagnóstico solicitado por el médico tratante se les solicitó su consentimiento para someterse a la toma de sangre asegurando las condiciones adecuadas evitando poner en riesgo su salud, siendo importante para el diagnóstico de la tuberculosis.

VARIABLES

Independiente: Los antígenos.

Dependiente: Los anticuerpos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Regla de Bayes, cálculo de especificidad y sensibilidad así como valor predictivo positivo y negativo.

EQUIPO:

- ✘ Centrífuga
- ✘ Campana de bioseguridad NUAIRE clase II tipo A / B3
- ✘ Micropipetas de 5-20µl
- ✘ Micropipetas de 200µl
- ✘ incubadora
- ✘ pipetas Pasteur
- ✘ Autoclave
- ✘ Estufa
- ✘ Microscopio.

MATERIAL

CULTIVO EN MGIT (TUBOS INDICADORES DE CRECIMIENTO MICOBACTERIANO)

- ✘ Tubos BBL MGIT indicadores de crecimiento micobacteriano de 7 ml caja de 100 tubos.
- ✘ Equipo automatizado BACTEC MGIT 960.
- ✘ El kit contiene: caja de 6 frascos, 15ml suplemento de crecimiento BACTEC MGIT y 6 frascos liofilizados, mezcla antibiótica BBL MGIT PANTA.

SERO-TB

- ✘ Antígeno: contiene 5 ml de suspensión de bacilos tuberculosos muertos por calor (2 frascos)
- ✘ Suero control positivo: 2 ml de suero normal de conejo reactivo para tuberculosis
- ✘ Suero control negativo: 2 ml de suero normal de conejo no reactivo para tuberculosis
- ✘ Cristal para serología.

IMMUNOTECT-TB

- ✘ 25 Cassete individuales
- ✘ Diluyente
- ✘ Instrucciones para su uso.

ELISA

- ✘ Extracto soluble de BCG (Cepa Danesa ATCC 1331 de 5-6 semanas de cultivo).
- ✘ Una placa de microtitulación de poliestireno
- ✘ Conjugado anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulina humana Marcado con peroxidasa.
- ✘ Albúmina sérica Bovina.
- ✘ Sustrato de peroxidasa.
- ✘ Lector de ELISA (Espectrofotómetro)
- ✘ Ácido sulfúrico 2N
- ✘ PBS (solución salina amortiguadora de fosfatos).

CULTIVO EN LÖWESTEIN-JENSEN

- ✂ Fenol 5%
- ✂ Tubos de medio de cultivo Löwestein-Jensen.
- ✂ Hidroxido de sodio al 4% con rojo fenol como indicador de pH.
- ✂ Ácido sulfúrico al 8%.
- ✂ Agitador vortex.

BACILOSCOPIA

Colorantes de Ziehl-Neelsen:

- ✂ Carbolfucsina
- ✂ Alcohol-ácido
- ✂ Azul de metileno
- ✂ Portaobjetos.

MÉTODO

DESCONTAMINACIÓN DE MUESTRAS POR EL MÉTODO DE PETROFF MODIFICADO Y SU CULTIVO EN LÖWENSTEIN-JENSEN

- I. Obtener los siguientes datos de los pacientes: Nombre, localidad de origen, edad y diagnóstico o control de tratamiento.
- II. Descontaminar las muestras no estériles, tales como esputo, orina, etc., previamente a su cultivo, trabajando en un gabinete de seguridad biológica con las precauciones debidas.

EXPECTORACIONES, LAVADOS BRONQUIALES Y JUGO GÁSTRICO

- I. Colocar aproximadamente 10 ml de la muestra en tubos de plástico de centrifuga de 50 ml con tapas de rosca, agregando una cantidad igual de solución hidróxido de sodio AL 4% (NaOH) con rojo de fenol como indicador de pH sin tocar la boca del tubo al transferir y cerrar perfectamente.
- II. Mezclar las muestras en agitador mecánico (vortex) por 30 segundos, comprobando su homogeneidad invirtiendo los tubos y se incubaron 15 minutos a 37°C, tomando en cuenta el tiempo que tarda agitarlos.
- III. Centrifugar las muestras a 3000 r.p.m. x g durante 15 minutos.
- IV. Decantar el sobrenadante de todos los tubos en un frasco con fenol al 5% con un embudo para evitar salpicaduras.
- V. Neutralizar el sedimento con ácido sulfúrico al 8% antes de sembrar. El proceso de la neutralización debe ser muy cuidadoso de manera que el pH no sea mayor de 6.5 ni mayor de 7.2 (amarillo claro).
- VI. El sedimento se conservó para su inoculación.

ORINAS (MÉTODO DE PETROFF)

- I. Centrifugar 50 ml de la muestra a 3000 r.p.m. x g durante 30 minutos, de ser más de 50 ml decantar una parte y verter el resto en el tubo de centrifuga.
- II. Decantar el sobrenadante en un frasco con fenol al 5% con un embudo para evitar salpicaduras, al sedimento añadir una cantidad igual de NaOH sin tocar la boca del tubo al transferir, y cerrar perfectamente.

- III. Mezclar las muestras en el agitador mecánico (vortex) por 30 segundos, comprobando su homogeneidad invirtiendo los tubos y se incubaron 15 minutos a 37°C, tomando en cuenta el tiempo que tarda agitarlos.
- IV. Centrifugar las muestras a 3000 r.p.m. x g durante 15 minutos.
- V. Decantar el sobrenadante de los tubos en el frasco con fenol al 5% con un embudo para evitar salpicaduras.
- VI. Neutralizar el sedimento con ácido sulfúrico al 8% antes de sembrar. El proceso de la neutralización debe ser muy cuidadoso de manera que el pH no sea mayor de 6.5 ni mayor de 7.2 (amarillo claro).
- VII. Conservar el sedimento para su inoculación.

MATERIALES DE BIOPSIA

- I. Las biopsias de tejido en general se deben homogenizar.
- II. Se utiliza instrumental quirúrgico estéril y un mortero de porcelana previamente esterilizados envueltos en papel.
- III. Dentro del mortero y con ayuda de un bisturí se fracciona el material biológico.
- IV. Se muele el material con la mano del mortero y se añade agua estéril hasta obtener una suspensión que se inocula en el medio de cultivo.

MUESTRAS ESTÉRILES

- I. En el procedimiento de las muestras estériles como líquido cefalorraquídeo, líquido de ascitis, líquido pleural, líquido peritoneal, etc., sólo se requiere la concentración por centrifugación de la muestra a 3000 r.p.m. x g durante 30 minutos, separando el sobrenadante del sedimento.
- II. Inocular 0.1 ml del sedimento en dos tubos de Löwenstein-Jensen.

INOCULACIÓN DE LAS MUESTRAS EN LOS TUBOS MGIT

- I. Reconstituya un tubo liofilizado de mezcla antibiótica MGIT PANTA con 15ml de suplemento de crecimiento BACTEC MGIT.
- II. Rotule el tubo MGIT con el número de la muestra.
- III. Desensaque el tapón y añada asépticamente 0.8ml de suplemento de crecimiento/mezcla antibiótica MGIT PANTA. Para obtener los mejores resultados, la adición de suplemento de crecimiento/mezcla antibiótica MGIT PANTA debe hacerse justo antes de la inoculación de la muestra.
- IV. Añada 0.5ml de la suspensión de la muestra concentrada y preparada.
- V. Vuelva a tapar el tubo firmemente y mezcle bien.
- VI. Los tubos que se ponen en el instrumento serán analizados automáticamente durante el procedimiento del análisis recomendado de 42 días.
- VII. Los resultados positivos por el instrumento se confirma mediante un frotis de BAAR.

SERO-TB

Sistema de diagnóstico de sero-aglutinación para la detección de anticuerpos contra la tuberculosis.

- I. Poner en la placa de vidrio para aglutinaciones los siguientes volúmenes de suero, utilizando una micropipeta de 5-20 μ l; 0.02, 0.01 y 0.005ml (20, 10, 5 μ l).
- II. Adicionar a cada una de las muestras una gota de suspensión de antígenos (0.03ml), Mezclar con aplicador cuidadosamente en forma circular durante 3 minutos y hacer la lectura con una fuente de luz indirecta, considérese las aglutinaciones 4+, los títulos serán: 1:2.5, 1:4 y 1:7.

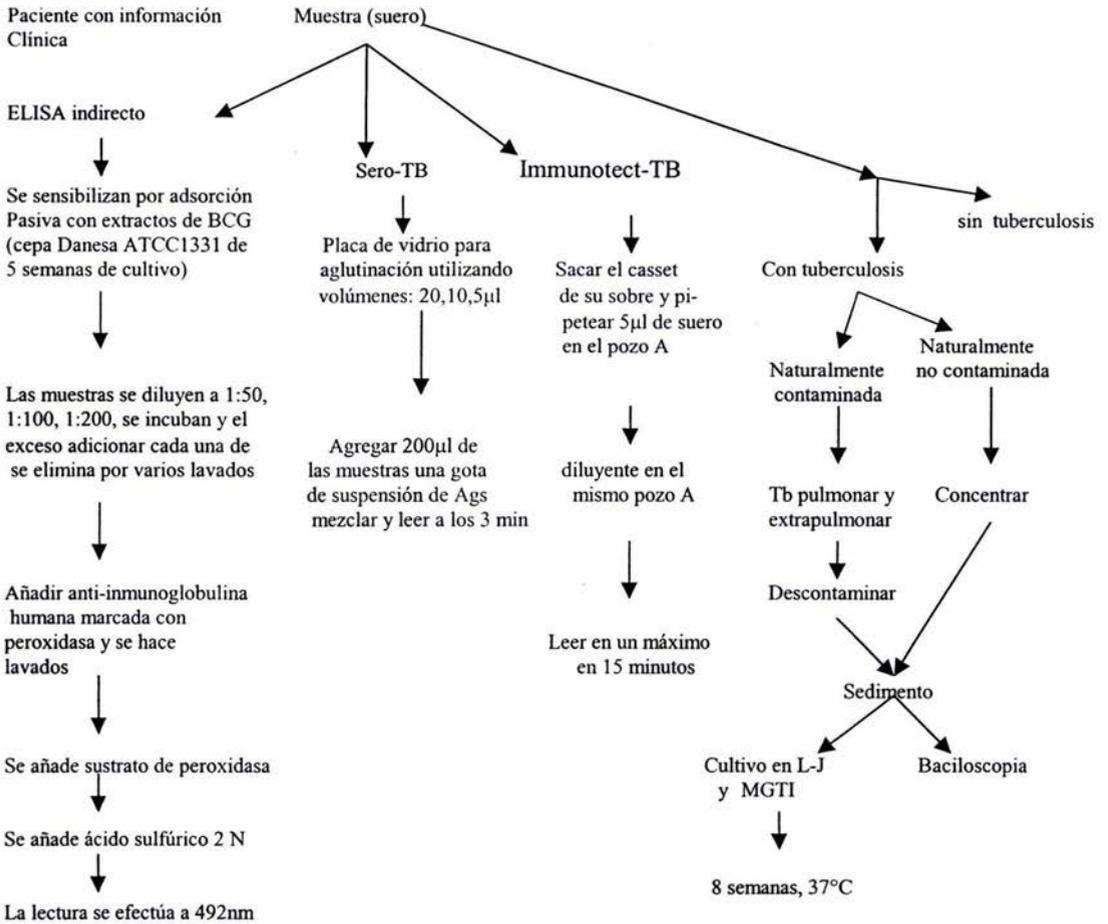
IMMUNOTECT-TB

- I. Sacar el cassette de su sobre y colocarlo en una superficie plana
- II. Pipetear 5 μ l de suero en el pozo A
- III. Enseguida pipetear 200 μ l de diluyente en el mismo pozo A
- IV. Leer el resultado en un tiempo máximo de 15 minutos para positivos leves y 5 minutos si son positivos fuertes
- V. Si se usa sangre total en lugar de suero pipetear 10 μ l.

ELISA

- I. Las concavidades de placas de poliestireno para microhemaglutinación se sensibilizan por adsorción pasiva con extractos semipurificados de BCG (cepa Danesa 1331 de 5-6 semanas de cultivo) poniendo 100 μ l en cada pozo y se incuban las placas en refrigeración durante 24 h.
- II. Se lavan las microplacas con PBS (solución amortiguadora de fosfatos).
- III. A cada pozo se agregan 100 μ l de sero-albumina bovina al 0.4%.
- IV. Se incuban las placas a 37 °C durante 1 h.
- V. Se lavan las placas con PBS.
- VI. Se agregan 50 μ l del suero problema previamente diluido a 1:50, 1:100 y 1:200, se agregan, se dejan incubar y el exceso que no reaccionó se elimina por varios lavados. El anticuerpo presente en el suero reacciona con el antígeno inmovilizado en la superficie de las concavidades.
- VII. Se agregan 25 μ l del conjugado de cabra anti-inmunoglobulina humana IgG marcado con peroxidasa diluido 1:1000 y se incuba a 37 °C durante 1 h, y el exceso se lava con PBS.
- VIII. Se añade 100 μ l del sustrato de peroxidasa a cada pozo y se espera 10 minutos a que aparezca un color rojo pardo.
- IX. Se añade inmediatamente 50 μ l de ácido sulfúrico 2N.
- X. Simultáneamente se usaron sueros testigo que cubrieron los intervalos de lectura alto reactivo, bajo reactivo (cercano al valor de corte) y suero negativo.
- XI. La lectura de ensayo se efectúa a 492 nm de longitud de onda en un lector de ELISA. El resultado se informa como positivo o negativo de acuerdo con el valor de corte.

DIAGRAMA DE FLUJO



RESULTADOS

La confirmación de la presencia de Mycobacterium tuberculosis se llevó a cabo mediante baciloscopia por la técnica de ziehl-Neelsen, además de la realización del cultivo por Löwestein-Jensen y MGIT de muestras de esputo y biopsias en pacientes con manifestaciones clínicas y radiológicas compatibles con la enfermedad.

Se obtuvieron en primera instancia tres muestras de esputo de cada paciente en los casos que presentaban tos y expectoración con flemas, pero hubo casos en que los síntomas no eran específicos por lo cual se internaron estos pacientes y de acuerdo al sistema y órgano afectado simplemente se pensó en una infección por el bacilo tuberculoso realizando un estudio histológico en biopsias de ganglio linfático, riñón, piel pleura, etc., las cuales se enviaron a la Unidad de Neumología para confirmar la existencia de la enfermedad.

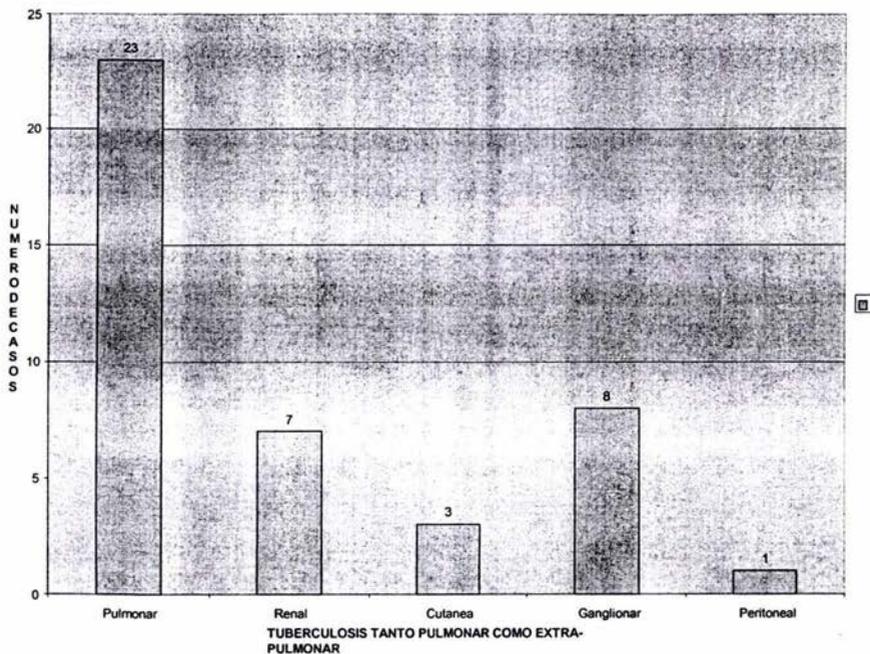
Para garantizar el éxito del cultivo se tomo en cuenta que siempre las micobacterias van a coexistir con otros microorganismos de la flora normal dependiendo de los sitios en donde se obtuvo la muestra. Siendo indispensable llevar a cabo un proceso de descontaminación previo a la siembra utilizando el método de Petroff para evitar que los constituyentes de la flora u otras bacterias se multipliquen e impidan el desarrollo adecuado del bacilo.

Una vez identificado al paciente con tuberculosis se extrajeron 5 ml de sangre venosa para la determinación de anticuerpos, usando el método de ELISA indirecto, reportando los resultados como positivos o negativos si eran iguales o mayores, o si eran menores respectivamente de acuerdo al valor de corte que fue de 0.216 DO determinado previamente en un grupo representativo de 100 personas de la población en general sin antecedentes de infecciones micobacterianas.

Se excluyeron al inicio del estudio aquellos pacientes que se encontraban bajo tratamiento anti-tuberculoso y fueron portadores del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH +) debido a la disminución de su respuesta inmunológica.

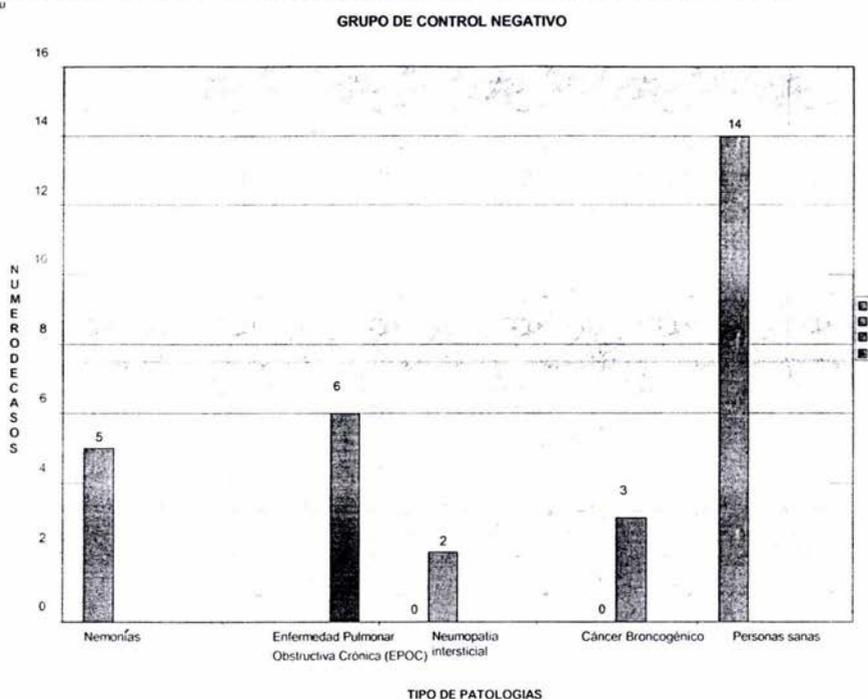
El cuadro clínico que predominó en los pacientes confirmados con tuberculosis fue: tos 90%, astenia y adinamia 80%, fiebre 71%, baja de peso 61%, disnea 59%, supuración pulmonar 18% y hemoptisis 16%. Incluyendo un mayor predominio de tuberculosis pulmonar contrario a los casos con tuberculosis extrapulmonar, ilustrado en la gráfica 2.

GRAFICA 2.TIPO DE TUBERCULOSIS MÁS COMÚN ENTRE LOS PACIENTES DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO



Simultáneamente se evaluaron tres pruebas serológicas: immunotect-TB, sero-TB y ELISA manejando 72 muestras de sueros a partir de 4 grupos de paciente: 42 personas con tuberculosis pulmonar y extrapulmonar comprobada y 30 personas en el grupo de control, de los cuales 16 padecieron de diversas patologías: Neumonía, Enfermedad Obstructiva Crónica y cáncer Broncogénico, los otros 14 individuos restantes se encontraban en perfecta salud. Ilustrado en la gráfica 3.

GRAFICA 3: GRUPO DE CONTROL DE PACIENTES NO TUBERCULOSOS Y PERSONAS SANAS



En la tabla 1 la prueba de ELISA mostró 6/30 falsos positivos en el grupo de control. Contrario al Sero-TB e Immunotect-TB que no mostró ningún falso positivo, siendo los más específicos. Lo mismo sucedió en el cultivo en Löwestein-Jensen, baciloscopia y MGIT.

Pero referente a la especificidad ELISA reportó un 80% contrario a los equipos comerciales que fueron del 100% al igual que el estándar de oro.

Tabla 1. Grupo de control de pacientes con enfermedades respiratorias ajenas a la tuberculosis.

Grupo de control negativo	Falsos positivos	Verdaderos negativos
ELISA	6	24
Sero-TB	0	30
Immunotect-TB	0	30
MGIT	0	30
Lowenstein Jensen	0	30
Baciloscopia	0	30

Referente a los cálculos realizados en las diferentes pruebas; los resultados de sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y eficiencia de prueba (EP) se muestran en la tabla 2 donde ELISA tuvo una sensibilidad mayor con respecto al Sero-TB e Immunotect-TB, pero en cuestión al cultivo la sensibilidad fue de 100% al igual que la baciloscopia. Por otro lado la eficiencia de prueba en ELISA fue comparable al cultivo y la baciloscopia, totalmente opuesto a los equipos comerciales.

Tabla 2.

Tipo de estudio	Número de casos	Positivos	Negativos	%S	%E	%VPP	%VPN	%EP
ELISA	42	36	6	86	80	64	95	92
Immunotect-TB	42	22	20	52.38	100	25	87.54	76.38
Sero-TB	42	9	33	22	100	8	81.103	54
L-J	42	42	0	100%	100%	100%	100%	100%
MGIT	42	42	0	100%	100%	100%	100%	100%
Baciloscopia	42	42	0	100%	100%	100%	100%	100%

El valor predictivo positivo y negativo en ELISA demostró que clasifica mejor a los pacientes que tuvieron tuberculosis de los sanos, mientras que en sero-TB e Immunotect-TB no son confiables para este propósito.

En la tabla 3 se presenta la distribución por edad de los sujetos de estudio, que oscilaba entre los 23 – 87 años, y en la tabla 4 la distribución por sexo de los cuales el 61.1 % eran de sexo femenino y 39% de sexo masculino, mostrado en la tabla4. De estado civil casados o solteros y con una incidencia del 42% que demostraban ser económicamente activos en los casos de tuberculosis.

Tabla 3. Edades de los pacientes.

Edad (años)	No de pacientes	% del total
23-32	9	12.5
33-42	6	8.3
43-52	9	12.5
53-62	6	8.3
63-72	7	9.72
73-82	3	4.16
83-92	1	1.38
Sin registro	31	43.05

Tabla 4. Distribución por sexo de los paciente.

SEXO	Numero	Porcentaje %
Masculino	28	39
Femenino	44	61.11

En la tabla 5 se encuentran los datos sobre el lugar de origen de los pacientes, quienes en su mayoría provinieron de la ciudad de México y del Estado de México (Nezahualcóyotl, Tlanepantla, Ecatepec, Chimalhuacan y Texcoco).

Tabla 5. procedencia de los pacientes

Entidad de origen	Número	Porcentaje %
México D.F	22	30.55
Puebla	1	1.38
Veracruz	6	8.3
Edo de México	5	7
Chiapas	5	7
Guerrero	2	2.77
Sin registro	31	43.05

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se determino la sensibilidad del método de ELISA con un resultado del 86% considerado bajo, lo cual pudo deberse a una disminución de anticuerpos circulantes en los casos de tuberculosis primaria, extrapulmonar o en antiguos enfermos bacilíferos.^{29,6}

Por otra parte su especificidad fue del 80% menor al resultado anterior debido a que hubiera una reacción cruzada de anticuerpos IgG con los otros padecimientos respiratorios no tuberculosos³⁸. Pero con respecto a los valores predictivos no solo dependen de la sensibilidad y especificidad si no también de la prevalencia de la enfermedad, este último tanto la tuberculosis pulmonar como extra-pulmonar se considera del 23% en México^{12,48} dando un 64% del VPP de que realmente la prueba de ELISA identifica la enfermedad, mientras que el VPN es de 94% rechazando aquellos que no están enfermos, estos últimos resultados fueron similares en comparación con Kuan-Jen Bai⁴⁰ de VPP 71% y el VPN 93% con la diferencia que la prevalencia fue del 26% en la provincia de Taiwán, manejando además distintos rangos variando del 5-40%, dependiendo de la región de estudio. En este caso se manejo en general a la población basado en que en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica llegan pacientes de toda la República Mexicana al igual que en el Hospital General de México por otra parte el procedimiento de ELISA que se manejo en el INDRE fue muy semejante al que realizo Kuan-Jen Bai, utilizando en ambos casos la cepa BCG que contiene en mayor cantidad al antígeno A-60.

En la prueba immunotect-TB (inmunocromatográfica) dio una sensibilidad de 52.38% contraria a la especificidad que fue del 100% similares a los obtenidos por Gounder Celine y col⁴¹ S= 65% y E=100% y Sudha Pottumarthy⁴⁹ S=41% y E=96%, con respecto al VPP= 25% y VPN=87.54% utilizando el mismo valor de prevalencia de la enfermedad..

A diferencia del anterior el sero-TB (prueba de sero-aglutinación) reporto una sensibilidad del 22%, exceptuando que la especificidad dio del 100% en tanto que el VPP y VPN fueron del 8 y 81.103% respectivamente.

Los resultados tan bajos pudieron deberse a una disminución de los anticuerpos IgG en algunos pacientes que tuvieron su primer encuentro con el bacilo en donde existe una fase de latencia en la que predomina más los anticuerpos IgM⁵⁰

Otro motivo debió ser un fenómeno de prozona en el que un exceso de anticuerpos no permite la formación del complejo antígeno-anticuerpo o como se menciona con anterioridad en las infecciones extrapulmonares hay una disminución de bacilos por lo que hay una cantidad mínima de anticuerpos en el suero.

El método que realizó un mejor diagnóstico fue ELISA con una eficiencia de prueba del 92%, clasificando correctamente a los pacientes que en realidad padecían tuberculosis y los que no padecían tuberculosis. Comparado con Sero-TB que tuvo una eficiencia de 54%, perdiendo su eficacia para detectar a los anticuerpos. En igual forma sucedió con immunotect-TB con una eficiencia de 76.38%.

Pero se realizó una segunda comparación donde el método de ELISA mostró una eficiencia de prueba comparable al estándar de oro (Löwestein-Jensen, MGIT, baciloscopia) pero con una sensibilidad y especificidad menor, lo que no significa que ELISA deba ser descartado como análisis de rutina, ya que una de sus principales ventajas con respecto al cultivo es que más rápida en obtener un resultado del paciente con un menor costo en su instalación, sin embargo los medios de cultivo seguirán siendo las pruebas más confiables para la determinación de la tuberculosis pero necesitando de personal capacitado de alto grado y no disponiendo de resultados pasando de dos semanas, pero tienen una sensibilidad y especificidad bastante altos en casos de infecciones tempranas.

CONCLUSIONES

El método de ELISA resultó ser una opción adecuada para el diagnóstico de la tuberculosis, superando a los equipos comerciales (Sero-TB e Immunotect-TB). Sin embargo tuvo una sensibilidad y eficiencia de prueba comparable al estándar de oro que todavía sigue siendo la elección recomendada para la detección del bacilo tuberculoso. Con la ventaja de ser más sensible y específico en lo referente a muestras escasas en bacilos de micobacterias.

La desventaja de los equipos comerciales frente al método de ELISA y el estándar de oro radica en que tuvieron una sensibilidad demasiado baja para determinar aquellos enfermos con tuberculosis y sin importar que tan específicos fueron no son una adecuada elección para el diagnóstico de tuberculosis por sí mismos, siendo de poca utilidad, lo cual no lo estipula el fabricante. Se recomienda como método de apoyo a ELISA y medios de cultivo de alta sensibilidad.

ANEXOS

Teniendo en cuenta que el principal objetivo del presente estudio fue en determinar la sensibilidad y especificidad así como su utilidad para la identificación rápida en pacientes con tuberculosis pulmonar y extrapulmonar de los equipos comerciales sero-TB e immunotect-TB y comparándolos con ELISA además de otros métodos ya conocidos (baciloscopia, cultivo en Löwenstein-Jensen y MGIT), se calcularon los siguientes parámetros:

- ◆ Sensibilidad es la probabilidad de obtener un resultado positivo en los individuos que tienen la enfermedad.

$$VP/(VP+FN) \times 100$$

VP= verdaderos positivos son el número de individuos con la enfermedad, en los que el resultado de la prueba diagnóstica es positivo.

FN= falsos negativos son el número de individuos con la enfermedad, en los que el resultado de la prueba diagnóstica es negativo.

- ◆ Especificidad es la probabilidad de obtener un resultado negativo en individuos que no tienen la enfermedad.

$$VN/(FP+VN) \times 100$$

VN= verdaderos negativos son el número de individuos sin la enfermedad en los que el resultado de la prueba diagnóstica es negativo.

FP= falsos positivos son el número de individuos sin la enfermedad en los que el resultado de la prueba es positivo.

- ◆ Eficiencia de prueba esta indicada por el porcentaje de individuos (enfermos y no enfermos) correctamente clasificados por los exámenes.

$$[(VP+VN)/(VP+FP+FN+VN)] \times 100$$

- ◆ VPP el valor predictivo positivo es la probabilidad de que un individuo que presenta un resultado de la prueba positiva tenga la enfermedad.

$$VPP = (\text{prevalencia})(\text{sensibilidad}) / (\text{prevalencia})(\text{sensibilidad}) + (1 - \text{prevalencia})(1 - \text{sens})$$

- ◆ VPN el valor predictivo negativo es la probabilidad de que un individuo que presenta un resultado de la prueba negativa no tenga la enfermedad.

$$\text{VPN} = \frac{(1 - \text{prevalencia})(\text{especificidad})}{(1 - \text{prevalencia})(\text{especificidad}) + (\text{preva})(1 - \text{sens})}$$

Considerando que la prevalencia de la tuberculosis es del 23% incluyendo la incidencia de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar, sustituyendo este dato en el teorema de Bayes.

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE LÖWENSTEIN-JENSEN

Composición del medio:

Fosfato monopotásico anhidro (KH_2PO_4)	2.40 g
Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.24 g
Citrato de magnesio	0.60 g
L-asparagina	3.60 g
Glicerina bidestilada	12 ml
Agua destilada	600 ml
Huevos enteros	1000 ml
Verde de malaquita al 2% recién preparada	20 ml

- Disolver las tres primeras sales y la asparagina en 200 ml de agua destilada. Es necesario calentar suavemente a baño María para la disolución de la asparagina.
- Filtrar en un matraz de 2, 000 ml de capacidad. Agregar la glicerina y el resto del agua destilada hasta completar 600 ml.
- Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 120°C y deja enfriar.
- Los huevos deben ser frescos, se limpian cuidadosamente con un cepillo, agua y jabón y dejan pocos minutos en agua jabonosa. Se enjuagan con agua corriente y limpian con una gasa embebida en alcohol de 70° .
- Con las manos bien lavadas, se quiebran los huevos uno a uno en un vaso estéril. Observar cada huevo, que para ser usado debe tener yema firme, que permanezca redonda, sin aplastarse, ni romperse. Homogeneizar un 1 L de huevos en un matraz con padecería de vidrio, ambos estériles.
- Vaciar los huevos homogeneizados en el matraz que contiene la solución con sales, asparagina y glicerina.
- Agregar enseguida 20 ml de la solución acuosa de verde de malaquita recién preparada, filtrada y esterilizada.
- Mezclar bien agitando manualmente el matraz y luego dejar reposar para que las burbujas de aire contenidas en el medio asciendan a la superficie y se eliminen.
- Para distribuir el medio en tubos, todo el material de vidrio a emplear debe estar escrupulosamente limpio y enjuagado antes de ser esterilizado.
- Para la filtración del medio se emplean un embudo de vidrio de 15 a 30 cm de diámetro con la parte superior cubierta con doble capa gasa. Al extremo del embudo se le coloca un tubo de látex y a éste un tubo de vidrio. La parte superior y la punta deben estar protegidos con papel para ser esterilizados. Antes de envasar se coloca en el tubo de látex una pinza de Mohr.
- Levantar un costado del papel que recubre el embudo y vaciar el medio de cultivo, para filtrarlo a través de la gasa.
- Distribuir el medio en tubos, en condiciones de esterilidad, abriendo y cerrando la pinza de Mohr. La cantidad de medio en cada tubo (5 ml) debe ser la suficiente para obtener, una vez coagulado el medio, un plano inclinado. Para ello es conveniente tener un tubo patrón marcado al nivel correspondiente. Es

importante que queden por lo menos 3 cm entre la boca del tubo y el extremo del plano inclinado.

- Al distribuir, evitar la formación de burbujas dejando escurrir el medio de cultivo por la pared interna del tubo. Colocar en el coagulador los tubos evitando girarlos. Con esto se evita que el medio opaque la pared del tubo.
- El coagulador debe tener una temperatura de 85°C. El tiempo de coagulación deberá contarse a partir del momento en que la temperatura interna del equipo alcance los 85°C. La coagulación debe hacerse durante máximo 50 minutos.
- Terminado el tiempo de coagulación, retirar los tubos evitando su enfriamiento brusco. Una vez a temperatura ambiente llevarlos a la cámara de cultivos a 37°C, dejándolos durante 48 horas para controlar su esterilidad y eliminar el agua de condensación; los tapones deben quedar ligeramente flojos. Se guardan los tubos en el refrigerador con la tapa bien ajustada, si se usan tapones de algodón se guardan en bolsas de plástico cerrados herméticamente, para que mantengan su humedad. Es recomendable no usar el medio después de dos meses de su preparación.

MGIT (TUBO INDICADOR DE CRECIMIENTO MICOBACTERIANO)

- El tubo indicador de crecimiento micobacteriano contiene 110µl de indicador fluorescente y 7ml de caldo Middlebrook 7H9. El indicador contiene cloruro pentahidratado de Tris-4,7-difenil-1,10-fenantrolina rutenio en una base de silicona. Los tubos se limpian con un chorro de CO₂ al 10% y se cierra con tapones de propileno.
- El suplemento de crecimiento BACTEC MGIT contiene 15ml de caldo de enriquecimiento Middlebrook OADC.

Fórmula aproximada por litro de agua purificada:

I.	Albúmina bovina	50.0g
II.	Dextrosa	20. 0g
III.	Estearato de polioxietileno (POES)	1.1g
IV.	Catalasa	0.03g
V.	Ácido oléico	0.1g

- El frasco BBL MGIT PANTA contiene una mezcla liofilizada de agentes antimicrobianos:

Fórmula aproximada por frasco liofilizado de PANTA:

I.	Polimixina B	6000 unidades.
II.	Anfotericina B	600µg.
III.	Ácido nalidixico	2.400µg.
IV.	Trimetoprima	600µg.
V.	Azlocilina	600µg.

PREPARACIÓN DE LOS AGENTES DE LA TINCIÓN DE ZIEHL-NEELEN

1. Carbolfucsina

- Solución 1. Disolver 0.3 g de fucsina básica en 10 ml de etanol al 95%.
- Solución 2. Disolver 5.0 g de cristales de fenol en 100 ml de agua destilada. Calentar ligeramente si se necesita.
- Combinar la solución 1 con 90 ml de la solución 2. Etiquetar la botella con el nombre de la solución y fecha de preparación. Guardar a temperatura ambiente 3 meses.

2. Agente decolorante: alcohol-ácido 3%

- Cuidadosamente agregar 3 ml de HCl concentrado a 97 ml de etanol al 95%. Etiquetar la botella con el nombre de la solución y fecha de preparación. Guardar a temperatura ambiente 3 meses.

3. Colorante de contraste: azul de metileno

- Disolver 0.3 g de cloruro de azul de metileno en 100 ml de agua destilada. Etiquetar la botella con el nombre de la solución y fecha de preparación. Guardar a temperatura ambiente 3 meses.

PROCEDIMIENTO

- Primero se debe filtrar el colorante de carbolfucsina para minimizar la formación de cristales.
- Usar el colorante filtrado para cubrir toda la laminilla. Calentar lentamente hasta que haya emisión de vapores por 5 minutos. Agregar más colorante si se seca la laminilla pero no recalentar.
- Dejar enfriar.
- Eliminar el colorante y enjuagar brevemente con agua.
- Decolorar la preparación hasta que no quede rastro de color.
- Enjuagar con agua.
- Cubrir con azul de metileno y dejar reposar 1 minuto.
- Enjuagar con agua.
- Permitir secar el frote al aire.
- Examinar con objetivo de inmersión (100x).

PBS(SOLUCION SALINA AMORTIGUADORA DE FOSFATOS)

NaCl (cloruro de sodio) 8.0g
KH₂PO₄ (fosfato monopotásico) 0.2 g
Na₂HPO₄ . 12 H₂O (fosfato di sódico dodecahidratado) 2.9g
KCl (cloruro de potasio) 0.2g

Llevar a un litro con agua destilada ajustando el pH en 7.4 y guardar a 4°C

SUTRATO DE PEROXIDASA

Ácido cítrico 0.1 M
Fosfato di sódico anhidro 0.2 M
O-fenilendiamina 40 mg y disolverla en 100ml de amortiguador del sustrato y
adicionarle 40μl de peroxido de hidrógeno al 30%.

El sustrato se prepara antes de usarlo pues lo daña la luz.

LISTA DE REFERENCIA

1. Murray R P, Manual of Clinical Microbiology, 7th ed, Ed. ASM PRESS, 1999 p. 399-408, 320-33
2. Rastogi N. Structure and functions of the cell envelope in relation to mycobacterial virulence pathogenicity and multiple drug resistance. Res Microbiol, 1991, 142, p. 419-22
3. Minnikin DE, Chemical principles in the organization of lipid components in the mycobacterial cell envelope. Res Microbiol, 1991: 142, p. 423-26
4. Laneelle G. and Daffé M, Mycobacterial cell wall and pathogenicity a lipodologist's view. Res Microbiol, 1991, 142, p. 433-36
5. Pumarola AM, Microbiología y parasitología medica, 2a ed, Ed Salvat, 1994, p. 510-47
6. Farga V, Tuberculosis Ed Mediterráneo, 1992, p. 17-42, 67-102, México
7. Sepúlveda JA, Devenir de la Salud Pública en México durante el siglo XX, México, Instituto Nacional de Salud Pública, 2000 p. 126-130
8. Casas GS, Perfil Sociocultural del paciente tuberculosis Rev.Med IMSS (México); 1996:34(3): 229-32
9. Manjarrez ME, Serrano MV, Cano PG, et.al. Principales causas del abandono del tratamiento contra la tuberculosis pulmonar. Gaceta Médica de México, Vol. 129, No 1, 1993, p. 57-61
10. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica No 19, Vol. 18, 6-12 Mayo 2001 p. 1-7
11. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Semana 30, Vol. 17, Julio del 2000 p. 33
12. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Semana 50, Enero del 2002.
13. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Semana 33, No 31 Vol. 18, Octubre 2001 p. 3-5
14. Robbins S, Patología estructural y funcional 4^a ed, Ed Interamericana McGraw-Hill, 1991, p. 394-403. México.
15. Rook W, Hernandez GA, Pando A, The pathogenesis of tuberculosis. Annu Rev Microbiol, 1996, 50: 259-84
16. Schlesinger SL, Bellinger G, Kawahara CR. Payne N, and Horwitz AM, Phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. The Journal of immunology, 1990, 144(7): 2771-80
17. Schorey SJ, Carroll CM, Brown JE, A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria . Science, 1997, 277 p. 1091-93
18. Roitt MI, Inmunología 2a ed, Ed Salvat, 1991, p. 1.1-2-18
19. Bach F, Inmunología Ed Limusa, México. P. 288-90, 1994
20. Cooper AM, Roberts AD, Rhoades ER., Callahan .E., Getzy DM. and Orme IM, The role of interleukin 12 in acquired immunity to Mycobacterium tuberculosis infection. Immunology, 1995. 84: p. 423-32
21. Wang J, Wakeham J, Harkness R and Xing Z, Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during Mycobacterial infection. J. Clin Invest; 103:1023-29, 1999.

22. Pasula R, Rae W, Kachel JL, Surfactant Protein A Suppresses reactive nitrogen intermediates by alveolar macrophages in response to Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of Clinical Invest*, 103: 483-90, 1999
23. Gaynor DC, McComarck XF, Voelker R, Dennis, E. McGowan S, Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis by a direct interaction with human macrophages. *The Journal of Immunology*, 1995, 155(11): 5343-51
24. Ratledge C, *Mycobacteria molecular biology and virulence* Ed. Blackwell Science, 1999. p. 180-98, 217-396.
25. Clemens LD, and Horwitz AM, Characterization of the Mycobacterium tuberculosis phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J.Exp.Med.* 181: 257-70, 1995
26. Behr MA, Warren SA, Salamon H, Hopewell PC, Ponce de León A, Daley CL, Small PM, et.al, Transmission of Mycobacterium tuberculosis from patients Smear-negative for acid-fast bacilli. *The Lancet*, 355: 444-448, 1999.
27. Koneman WE, *Diagnóstico Microbiológico texto y atlas* Ed Panamericana, 1997 p. 620-55
28. Koneman WE, *Diagnóstico Microbiológico, texto y atlas 5ª ed*, Ed Panamericana, 1999, España. P. 34-59, 868-919.
29. García GR, Lara HA, Arzate BP, Detección del Mycobacterium tuberculosis en niños, con empleo de dos sistemas de cultivo y su confirmación con la reacción en cadena de la polimerasa. *Rev de Enferm infecciosas en pediatría*, 13(50): 1999
30. Balandrano S, *Manual de procedimientos de laboratorio, tuberculosis, México. INDRE/SAGAR*, 1996, 13-21, 75-77.
31. Crespo MP, El diagnóstico viral por el laboratorio, *Colombia Medica* 2000;31: 135-150.
32. Perea PE, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Ed Doyma, 1992, p. 225-301
33. Caminero LJA, Casal RM, Ausina RV, Piña GS, Valet J, Diagnóstico de la tuberculosis. *Arch Bronconeumol*, 1996, 35-85, vol 99.
34. Álvarez MT, Merino AJM, Amso OS, Montero AR, Gil MT, Aldea MJ, Sanchez MJ, Características clínicas y radiológicas de la tuberculosis pulmonar primaria en el adolescente. *An Esp Pediatr*, 2000; 52: 15-19.
35. Lennette HE, *Manual de Microbiología Clínica 4ª ed*, Ed panamericana, México, 1991 p. 414-426.
36. Murray RP, *Manual of clinical microbiology 5ª ed*, Ed American Society for Microbiology, 1995 p. 110-120, 123-28, 423-30.
37. Henry BJ, *Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio 9ª ed*, Ed salvat, 1993, México. P. 100-105
38. Gupta S, Bhatia R, Datta KK, Serological diagnosis of childhood tuberculosis by estimation of mycobacterial antigen 60 specific immunoglobulins in the serum. *Tubercle and Lung Disease*: 1997; 78(1): 21-27.
39. Carlos G, Cocito MD, Properties of the Mycobacterial antigen complex A-60 and its applications to the diagnosis and prognosis of tuberculosis. *Chest*; 1991; 100: 1687-93.

40. Chiang IH, Sou J, Bai KJ, Lin TP, Luh KT, Yu CJ, Ynag PC, Serodiagnosis of tuberculosis: a study comparing three specific mycobacterial antigens. *Am J. Respir Crit Care Med*, 1997; 156: 906-11.
41. Gounder C, Carvallo F, Conde BM, Bishai RW, Kritski LA, Chaisson ER, et.al. Field evaluation of a rapid immunochromatographic test for tuberculosis. *J. Clin Microbiol*, 40(6): 1989-1993, 2002.
42. Ludgerus ChCh, Yup IE, Chul SH, Kew SP, Evaluating the usefulness of the ICT Tuberculosis test kit for the diagnosis of tuberculosis. *J. Clin Pathol* 2000; 53: 715-17.
43. Barret. TJ, *Inmunología Médica. Texto y revisión Ed. McGraw-Hill, México, 1993. p. 292-93*
44. Streeton JA, Desem N, Jones SL, Sensitivity and specificity of a gamma interferon blood test for tuberculosis infection. *Int J. Tuberc Lung Dis* 2(6): 443-50, 1998.
45. Somi GR, O'brien RJ, Mfinanga GS, Ipuge YA, Evaluation of the MYCODOT test in patients with suspected tuberculosis in a field setting in Tanzania. *Int J. Tuberc Lung Dis* 3(3): 231-38, 1999.
46. Maekura R, Okuda Y, Nakagawa M, Hiraga T, Yokota S, Ikuya Y, et. Al. Clinical evaluation of anti-tuberculous glycolipid immunoglobulin G antibody assay for rapid serodiagnosis of pulmonary tuberculosis. *J. Clin Microbiol* 39(10): 3603-3608, 2001.
47. Mahadevan S, Serodiagnosis of tuberculosis in children. *JIMA*; 100(2): 2002p. 1-4
48. Pottumarthy SC, Wells V and J. Morris A, A comparison of seven tests for serological diagnosis of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38(6): 2227-2231.
49. Wilkins GL, Ivanyl J, Potential value of serology for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Lancet*, 1990: 336: 641-44
50. Truque AM, La tecnología en el laboratorio clínico del futuro. *Acta Medica Costarricense*, 1999: 41(2): 1-16
51. Grange JM, Laszlo A, Serodiagnostic, tests for tuberculosis: a need for assessment of their operational predictive accuracy and acceptability. *Bulletin of the world Health Organizations* 68(5): 571-76, 1990
52. Kane OJ, Ebert AT, Hallaway JB, Roberts GS, Tenner SK, A laboratorian's perspective on evaluation and implementation of new laboratory tests. *Clinical Chemistry*, 1997, 43(9): 1771-80.
53. Chembio Diagnostic System, INC. TB STAT-PAK, A rapid two step immunochromatographic test for the detection of antibodies to Mycobacterium tuberculosis in human, serum, plasma or whole blood for in vitro diagnostic use, March 2000 [3 screen], available from: <http://www.chembio.com>
54. Kenneth todar university of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology, Textbook of bacteriology, Jun 2000 [11 Screen], available from: <http://www.textbookofbacteriology.net/tuberculosis.htm>
55. Universidad de Nueva York, Lo que usted necesita saber acerca de la tuberculosis, Jun 2000 [11 screen] disponible en: <http://www.holonet/1t.htm>

56. Shangai Uppergold Bio-Tech Pharma co. LTD, TB-DOT detection of antibody of Mycobacterial tuberculosis by DGFA method, May 2001: [3 screen], available from: <http://www.uppergold.com>
57. Cellestis Ltd, Kits for cell mediated immune responses, [serial on line] 2002 May, [2 screen] available from: <http://www.cellestis.htm>