

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS**

**INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNOSTICO E INVESTIGACION EN SALUD  
-SELADIS-**



**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA HUMORAL FRENTE A  
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS Y MYCOBACTERIUM BOVIS (BCG) POR  
EL METODO DE INMUNODOTT EN PACIENTES INTERNADOS EN EL HOSPITAL  
LUIS URIA Y EN EL HOSPITAL DE CHULUMANI DEL DEPARTAMENTO DE LA  
PAZ GESTION 2003**

**TESIS DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIATURA EN BIOQUIMICA**

**POSTULANTE: DANIELA VILLEGAS DIAZ**

**TUTORA: Dra. JACQUELINE CALLA**

**LA PAZ – BOLIVIA  
2006**

## TABLA DE CONTENIDOS

Dedicatoria	
Agradecimientos	
RESUMEN.	1
SUMMARY.	3
I. INTRODUCCION.	5
II. MARCO TEORICO.	7
II.A. DEFINICIÓN.	7
II.B. AGENTE ETIOLÓGICO (8).	8
II.B.1. Genoma de M. tuberculosis (10).	17
II.B.2. Genoma y biología de M. tuberculosis.	19
II.B.3. Genómica comparativa.	21
II.C. RESPUESTA INMUNE FRENTE A MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.	26
II.D. PATOGENIA.	31
II.E. DIAGNÓSTICO.	35
II.E.1. Técnicas serológicas en general (26).	35
II.E.1.a. Sensibilidad.	36
II.E.1.b. Especificidad	36
II.E.1.c. Valor predictivo positivo:	38
II.E.1.d. Valor predictivo negativo:	38
II.E.2. Reacción antígeno anticuerpo.	38
II.E.3. Inmunodott para tuberculosis.	39
II.E.4. Diagnóstico de Mycobacterium tuberculosis.	40
II.F. NUEVAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS (29).	44
II.F.1. Detección de anticuerpos.	44
II.F.2. Determinación de antígenos micobacterianos.	45

II.F.3. Recombinación de ácidos nucleicos.	47
II.F.4.Nuevas tuberculinas.	48
III. ANTECEDENTES.	49
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	58
V. JUSTIFICACION.	59
VI. OBJETIVOS.	60
VI.A. OBJETIVO GENERAL.	60
VI.B. OBJETIVOS ESPECIFICOS.	60
VII. HIPOTESIS.	61
VIII. DISEÑO DE LA INVESTIGACION.	62
VIII.A.Tipo de estudio.	62
VIII.B. Población.	62
VIII.C. Lugar de la investigación.	63
VIII.D.Material y métodos.	63
VIII.D.1. Recolección de muestra.	63
VIII.D.2.Cultivo y Determinación de las cepas a ser utilizadas como antígeno.	63
VIII.D.2.A. Descontaminación de las muestras de esputo.	63
VIII.D.2.B. Medios de cultivo.	64
VIII.D.2.C. Desarrollo de las cepas.	64
VIII.D.2.D. Antígenos empleados.	64
VIII.D.2.E. Titulación del conjugado.	65
VIII.D.2.F. Procesamiento de la muestra.	66
VIII.D.2.G. Correlación de resultados.	66
IX. RESULTADOS.	60
IX.1.a. Relación diagnóstico GOLD STANDARD y resultado de las pruebas con antígeno BCG y antígeno M. tuberculosis.	67
IX. 2.a. Relación pacientes con baciloscopía (+), (++) , (+++) y resultado de las pruebas con antígeno BCG y antígeno M. tuberculosis.	70
IX.3.a. Determinación de valores de Especificidad, Sensibilidad, Valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de inmunodott BCG y M. tuberculosis frente al gold estándar.	73

IX.3.b. Determinación de valores de Especificidad, Sensibilidad, Valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de inmunodott BCG y M. tuberculosis frente a baciloscopia.	75
IX. 4. Porcentajes de la prueba inmunodott BCG e inmunodott M. tuberculosis y resultado comparativo final de ambas pruebas.	76
X. DISCUSION.	78
XI. CONCLUSIONES.	84
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	85
XI. ANEXOS	89

## Tabla de figuras

<i>Figura No. 1. Mycobacterium tuberculosis</i>	9
<i>Figura No. 2. Mycobacterium tuberculosis. Cord factor</i>	11
<i>Figura No. 3. Esquema de la conformación de lípidos de la pared celular de Mycobacterium tuberculosis.</i>	16
<i>Figura No. 4. Genoma de Mycobacterium tuberculosis.</i>	19
<i>Figura No. 5. Proteína de shock térmico Hsp60</i>	26
<i>Figura No. 6. Respuesta inmune frente a Mycobacterium tuberculosis</i>	30
<i>Figura No. 7. Papel de citocinas liberadas en infección frente a M. tuberculosis.</i>	31
<i>Figura No. 8. Patogénesis de la formación de granuloma.</i>	33
<i>Figura No. 9. Patogénesis de la formación de granuloma</i>	34
<i>Figura No. 10. Unión de proteína A de Staphilococcus aureus a fracción Fc del anticuerpo</i>	40
<i>Figura No. 11. Radiografía de tórax.</i>	41
<i>Figura No. 12. Baciloscopía.</i>	42

## Tabla de Tablas

<i>Tabla 1. Delección de genes en micobacterias</i>	24
Tabla 2. Mecanismo Patológicos de <i>M. tuberculosis</i>	35
Tabla 3. Tabla para realizar la determinación de sensibilidad y especificidad de un test.	37
<i>Tabla 4: Resultados de la prueba inmunodott con antígeno BCG en porcentajes en relación al gold estándar.</i>	68
<i>Tabla 5. Resultados de la prueba inmunodott con antígeno <i>M. tuberculosis</i> en porcentajes en relación al gold estándar.</i>	68
<i>Tabla 6. Especificidad y sensibilidad del test inmunodott con antígeno BCG y <i>M. tuberculosis</i> frente al gold estándar.</i>	74
<i>Tabla 7. Especificidad y sensibilidad del test inmunodott con antígeno BCG y <i>M. tuberculosis</i> frente a baciloscopía.</i>	75
<i>Tabla 8. Comparación de porcentajes para ambas pruebas inmunodott BCG e inmunodott <i>M. tuberculosis</i>.</i>	76

## **Tabla de anexos**

<i>Anexo no. 1: Encuesta</i>	89
<i>Anexo 2: Técnica de Inmunodott.</i>	90
<i>Anexo 3: Resultados de la prueba inmunodott frente a antígenos BCG y M. tuberculosis.</i>	91
<i>Anexo 4: Tabla de edades de la población en estudio</i>	93
<i>Anexo 5: Inmunodott BCG y M. tuberculosis (-) Vs. Baciloscopía</i>	94
<i>Anexo 6: Inmunodott BCG y M. tuberculosis 1/10 Vs. Baciloscopía</i>	94
<i>Anexo 7: Inmunodott BCG y M. tuberculosis 1/100 Vs. Baciloscopía.</i>	95
<i>Anexo 8: Inmunodott BCG y M. tuberculosis 1/1000 Vs. Baciloscopía.</i>	95
<i>Anexo 9: Cálculo para determinar especificidad y sensibilidad para ambos antígenos en relación al gold estándar.</i>	96
<i>Anexo 10: Cálculo para determinar valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para ambos antígenos en relación al gold estándar.</i>	97
<i>Anexo 11: Cálculo para determinar especificidad y sensibilidad para ambos antígenos en relación a baciloscopía.</i>	98
<i>Anexo 12: Cálculo para determinar valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para ambos antígenos en relación a baciloscopía.</i>	99
<i>Anexo 13: Resultado test inmunodott con antígeno BCG y M. tuberculosis Vs. diagnóstico.</i>	100
<i>Anexo 14: Tabla para determinar sensibilidad y especificidad del test</i>	101

inmunodott con antígeno BCG frente al Gold Standard.

*Anexo 15: Tabla para determinar sensibilidad y especificidad del test inmunodott con antígeno M. tuberculosis frente al gold estándar.* 101

*Anexo 16: Tabla para determinar sensibilidad y especificidad del test inmunodott con antígeno BCG frente a baciloscopía.* 102

*Anexo 17: Tabla para determinar sensibilidad y especificidad del test inmunodott con antígeno M. tuberculosis frente a baciloscopía.* 102

Anexo 18: Relación de resultados inmunodott con la situación clínica del paciente 103



## **Tabla de gráficos**

<i>Gráfico 1. Frecuencia de edades de la población en estudio.</i>	60
<i>Gráfico 2. Comparación de resultados de la prueba inmunodott con antígenos BCG y M. tuberculosis en pacientes con tuberculosis, sintomáticos respiratorios y pacientes aparentemente sanos.</i>	62
<i>Gráfico 3. Comparación de resultados de la prueba inmunodott BCG (-) y M. tuberculosis (-) con baciloscopía.</i>	63
<i>Gráfico 4. Comparación de resultados de la prueba inmunodott BCG y M. tuberculosis 1/10 con baciloscopía.</i>	64
<i>Gráfico 5. Comparación de resultados de la prueba inmunodott M. tuberculosis 1/100 con baciloscopía.</i>	65
<i>Gráfico 6. Comparación de resultados de la prueba inmunodott M. tuberculosis 1/1000 con baciloscopía.</i>	66
<i>Gráfico 8. Comparación de resultados de la prueba inmunodott con antígeno BCG y antígeno M. tuberculosis. Resumen final.</i>	70

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA HUMORAL FRENTE A  
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS Y MYCOBACTERIUM BOVIS (BCG)  
POR EL METODO DE INMUNODOTT EN PACIENTES INTERNADOS EN EL  
HOSPITAL LUIS URIA Y EN EL HOSPITAL DE CHULUMANI DEL  
DEPARTAMENTO DE LA PAZ  
Gestion 2003.**

**RESUMEN**

La tuberculosis es una enfermedad infecto contagiosa considerada como una enfermedad de la pobreza, agravada por el hacinamiento y la deficiente alimentación, entre otros. La enfermedad es especialmente devastadora en los países en desarrollo donde cerca de la cuarta parte de las muertes en adultos causadas por tuberculosis podrían ser prevenidas.

El diagnóstico temprano de ésta enfermedad juega un papel importantísimo para el paciente ya que es una enfermedad que detectada a tiempo puede tratarse en mejores condiciones que cuando ya ha causado demasiado daño al organismo dadas las complicaciones que conlleva.

En los últimos años se han desarrollado muchos estudios en los que se busca una prueba de laboratorio que pueda coadyuvar en el diagnóstico de tuberculosis. Dichos trabajos fueron realizados principalmente con el fin de desarrollar una prueba serológica de laboratorio que pueda establecer la presencia de infección activa y diferenciarla de la presencia de la vacunación o de memoria inmunológica.

En el Instituto SELADIS se ha desarrollado una prueba serológica donde se detecta la presencia de anticuerpos, utilizando como antígeno BCG y usando la técnica del inmunodott. En el presente estudio se ha investigado la diferencia en la producción de anticuerpos en sujetos sanos y enfermos usando dos diferentes antígenos: BCG y Mycobacterium tuberculosis sobre todo en la intención de mejorar la sensibilidad y especificidad del método.

Muestras de sangre y esputo fueron tomadas de pacientes del Hospital Luis Uría de la ciudad de La Paz y del Hospital del Municipio de Chulumani.

Las muestras de esputo fueron cultivadas para recuperar la bacteria y luego usarla como antígeno. Las muestras de sangre fueron centrifugadas para recuperar el suero.

Esto permitió evidenciar que si bien son dos antígenos que presentan diferencias, pueden estimular la producción de anticuerpos en forma similar, existiendo otros anticuerpos específicos de cada uno, diferencia que serviría para mejorar la eficiencia del método.

Se pudo verificar que existe diferencia en la respuesta frente a ambos antígenos y que teniendo como referencia a la baciloscopía el inmunodott con *M. tuberculosis* como antígeno tiene mayor sensibilidad que el inmunodott con BCG como antígeno.

También se observó que en cuanto al diagnóstico convencional incluyendo la baciloscopía los signos, síntomas y radiografía el inmunodott con BCG como antígeno es mas sensible pero menos específico que el inmuinodott que emplea *M. tuberculosis* como antígeno.

Esta diferencia es lógica al tratarse de pacientes que no presentan los mismos síntomas y que no en todos los casos tienen baciloscopía positiva pero si un diagnóstico de tuberculosis.

El estudio mostró que usando *M. tuberculosis* como antígeno se puede mejorar el método y que estudios en este sentido podrían servir para optimizar el mismo y así ofrecer una alternativa al diagnóstico de tuberculosis.

Los resultados mostraron 80,6% de sensibilidad para *M. tuberculosis* y 83,0% para BCG así como una especificidad de 75% para *M. tuberculosis* frente a una especificidad del 50% para BCG, en cuanto a valores predictivos se observo un 96,2% en valor predictivo positivo para *M. tuberculosis* y 92,8% para BCG, en cuanto al valor predictivo negativo se tiene un 33,3% para *M. tuberculosis* y un 28,6% para BCG.

## **SUMMARY.**

Tuberculosis is a contagious disease, and is considered a "sickness" of the poverty. This disease is caused by deficient life conditions and an inappropriate nutrition that is why tuberculosis is a great health problem especially in developing countries. In these countries one-fourth of deaths among adults due to tuberculosis could be prevented, if treated and diagnosed on time.

Early detection of this dreadful disease could allow a quick healing of the patients, since the patient has a better chance of recovering, before the bacteria causes destruction of the tissues.

Since many years ago, studies are being done looking for a diagnostic test that could contribute to the final diagnosis of tuberculosis. These studies are related principally trying to develop a serological test that can establish differences between active infection and vaccination or immunologic memory.

In SELADIS institute (La Paz-Bolivia) it has been developed a serologic test that investigates specific antibodies against BCG, using an immunodott method.

In this study the differences in healthy people and people with the active infection using two different antigens: BCG and Mycobacterium tuberculosis were analyzed. The main goal was to improve the sensibility and specificity of the method.

Spittle and blood samples were collected from patients of the Hospital of La Paz and of the Hospital of Chulumani Municipality. The spittle samples were cultured for recovering of the bacteria, then characterized it and use as the antigen later on. The blood samples were centrifuged to recover the serum.

Significant differences were seen when comparing both antigens, due to the differences between them. These differences have determine different sensibility and specificity for each one of the antigens. The sensibility was higher when using MT as antigen compared with BCG. When conventional diagnostic was used as gold standard: baciloscopia, signs, symptoms, and x-rays, inmunodott with BCG as an antigen showed higher sensibility, but lower specificity compared with Mtb.

Nevertheless this is a logical difference; because not all the patients showed the same symptoms and also not all cases had positive bacilloscopy. But all the patients had one thing in common which was the diagnosis of tuberculosis.

This study showed that using MT as antigen can improve the immunodott method and that further studies could optimize and that future investigations are necessary. This investigation also helped us to optimize the method that would help the diagnosis of tuberculosis.

## **I. INTRODUCCION.**

Hoy en día, debido al SIDA el resurgimiento de la tuberculosis (TBC) es uno de los más graves problemas de salud que existen en el mundo; en 1995 se reportaron más de nueve millones de casos nuevos de tuberculosis y más de 3 millones de muertes a pesar de ser una enfermedad infecciosa y hoy en día curable. *Mycobacterium tuberculosis* agente causal de esta enfermedad ocasiona mas mortalidad que cualquier otro agente infeccioso y las muertes por tuberculosis corresponden al 25 % de la mortalidad prevenible en países en desarrollo. La incidencia y prevalencia varían de una zona geográfica a otra y están relacionadas con la presencia de factores socioeconómicos, de salud y culturales que facilitan la diseminación de la enfermedad y dificultan su tratamiento. Se estima que el 32% de la población mundial ha sido infectada por tuberculosis, la incidencia de enfermedad estimada es de 136 por 100000 habitantes, la prevalencia de 277 por 100000 habitantes, la prevalencia de enfermedad con baciloscopía positiva de 121 por 100000 habitantes; pero tan sólo se detectan el 42 % de los casos esperados de tuberculosis. En América la incidencia de casos de tuberculosis BK+ es de 23/100.000 hab. y la prevalencia es de 32/100.000 hab **(1)**. En el año 2002 entre Enero y Diciembre en Bolivia se observó una incidencia de 8.186 casos de tuberculosis pulmonar siendo 6.828 BAAR + con un total de casos de 10.477 entre nuevos, recaídas, fracasos y abandonos **(2)**.

Para Agosto del 2003 se tiene un número de casos sospechosos reportados de tuberculosis pulmonar BAAR + de 826, tuberculosis pulmonar BAAR+ previamente tratados en número de 146 **(3)**.

La incidencia de tuberculosis pulmonar en los diferentes departamentos del país para el año 2002 fue como sigue, para La Paz 1.685 con BAAR+ 1.372, para El Alto 468 con BAAR+ 404, para Oruro 146 BAAR+ 127, Potosí 462 BAAR+ 363, Cochabamba 1.267 BAAR+ 1.163, Chuquisaca 518 BAAR+ 404, Tarija 383 BAAR+ 342, Santa Cruz 2.817 BAAR+ 2.339, Beni 381 BAAR+ 282 y Pando 32 con BAAR+ 27 **(4)**.

En las últimas décadas se han encontrado cepas resistentes a los fármacos de primera línea, siendo la más importante la resistencia a Isoniazida, que es el fármaco mayormente utilizado durante toda la quimioterapia del paciente tuberculoso.

La isoniazida es la hidrazida del ácido isonicotínico actúa inhibiendo la síntesis de ácido micólicos, necesarios para la composición de la pared bacteriana mediante la formación de un radical a partir de la activación de la isoniazida por el gen katG. Con la unión de este radical a una molécula de NAD da como resultado un aducto, el cual puede interaccionar con la InhA reductasa, proteína codificada por el gen inhA, provocando así la inhibición de la síntesis de ácidos micólicos necesarios para la formación de la pared bacteriana (Scior, 2001).

Existen dos razones principales por las cuáles una cepa puede ser resistente a isoniazida.

- 1) La primera mutación se encuentra en el gen kat G, que es el encargado de llevar a cabo la oxidación de las moléculas para que tome su forma activa. Si se encuentra mutado este gen, no habrá activación de la Isoniazida (Chouchane, 2000).
- 2) La segunda mutación se encuentra en el gen inhA, que codifica para la proteína InhA reductasa y es la encargada de la síntesis de los ácidos grasos necesarios para la composición de la pared bacteriana. El ácido isonicotínico interactúa con el InhA inhibiendo esta síntesis, pero si se encuentra una mutación, no podrá haber esta interacción, por lo que habrá producción de ácidos micólicos, volviéndose la bacteria resistente a la Isoniazida (Scior, 2001).

Es urgente saber esta información, sobre todo porque la Tuberculosis no sólo es una enfermedad mundial que afecta a todos los niveles socioeconómicos, sino porque es una de las enfermedades más importantes asociadas al virus de VIH, ya que las alteraciones inmunológicas de este síndrome facilitan la reactivación y la progresión rápida de la enfermedad.

Uno de los fenómenos más dramáticos del comportamiento epidemiológico de la tuberculosis en los últimos años, es la inusitada fuerza con que ha resurgido la

enfermedad, no sólo en los países en vías de desarrollo, sino en naciones industrializadas y con eficientes sistemas de salud pública. Por tal razón, es de gran importancia contar con pruebas confiables de diagnóstico precoz.

La necesidad de encontrar una estrategia eficaz para frenar la expansión global de la tuberculosis sigue siendo muy urgente. Cada año, unos tres millones de personas mueren como consecuencia de esta epidemia. Además, la reciente aparición de cepas resistentes a los fármacos que existen en estos momentos contra *Mycobacterium tuberculosis* hace temer que la situación pueda agravarse más en las próximas décadas.

En éste trabajo se pretende investigar si existen diferencias en la respuesta humoral frente a ambos antígenos mediante la presencia de anticuerpos formados en el suero de los pacientes.

## **II. MARCO TEORICO.**

### ***II.A. DEFINICIÓN.***

La tuberculosis (TBC) es una enfermedad infecciosa, crónica, causada por micobacterias del "complejo de la tuberculosis", principalmente *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis*. Se trata de una afección legendaria, cuya aparición se remonta al período neolítico, al inicio de las dinastías egipcias y la época precolombina. La enfermedad emergió por primera vez como un importante problema de salud pública durante la revolución industrial, en los siglos XVIII y XIX, cuando el crecimiento de las ciudades, la inmigración masiva de la población rural, el hacinamiento y las malas condiciones de higiene determinaron un brote epidémico de tal magnitud que se llegó a conocer como "la peste blanca". En aquella época era la principal causa de muerte en personas jóvenes alrededor de todo el mundo (5).

El desconocimiento de los mecanismos de infección y la patogenia de la enfermedad propiciaron su desarrollo epidémico durante mucho tiempo. Sólo a principios del siglo XIX Laennec reveló los signos físicos y la anatomía mórbida de la TBC, sugiriendo que se trataba de una sola enfermedad con afección de



muchos aparatos y sistemas. En 1868 Villemín demostró que la infección se debía a un agente transmisible, que fue aislado por Koch en 1882. Sólo hasta 1944 se empezaron a desarrollar los fármacos que se usarían con éxito en la quimioterapia de la enfermedad: estreptomina, ácido paraaminosalicílico, tiacetazona, pirazinamida, ethambutol y rifampicina **(6)**.

La tuberculosis reemerge como enfermedad epidémica en 1986, considerándose la epidemia concomitante de SIDA como factor contributivo importante.

Algunos enfermos no tratados o tratados de manera inadecuada pueden mostrar intermitentemente bacilos en el esputo, durante años y la enfermedad dura (en teoría) todo el tiempo que se expulsan en el esputo bacilos tuberculosos viables. El grado de transmisibilidad depende del número de bacilos expulsado y de su virulencia, la suficiencia de la ventilación, la exposición de los bacilos al sol o a la luz ultravioleta, y las oportunidades para dispersarse en aerosol por tos, estornudos, habla o canto. La quimioterapia antimicrobiana eficaz por lo común disminuye la transmisibilidad a niveles insignificantes en el término de días o semanas. Los niños con tuberculosis primaria por lo común no son infectantes.

Desde el momento de la infección hasta que aparece la lesión primaria o una reacción tuberculínica significativa, de 4 a 12 semanas, aproximadamente. Si bien el riesgo ulterior de tuberculosis pulmonar o extrapulmonar progresiva es mayor durante uno o dos años después de la infección, puede persistir durante toda la vida en forma de infección latente **(7)**.

## **II.B. AGENTE ETIOLÓGICO (8).**

Las micobacterias son bacilos aerobios no esporulados ácido-alcohol resistentes (BAAR). En líneas generales se les podría dividir en tres grupos: **patógenos frecuentes** (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* y *M. leprae*), **patógenos ocasionales** (*M. kansasii*, complejo *M. avium-intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. marinum*, *M. ulcerans* y complejo *M. fortuitum-chelonae*) y **no patógenos** (*M. phlei*, *M. gordonae*, *M. smegmatis* y *M. paratuberculosis*), según su capacidad de infectar y desarrollar enfermedad en el hombre y su frecuencia.

*M. tuberculosis* (figura 1) suele tener una morfología característica, bacilo delgado de forma recta o ligeramente curvada en frotis teñidos, y su tamaño suele ser de 1-4 micras de largo por 0,3-0,5 micras de ancho. Ocasionalmente, forma ramificaciones verdaderas que se observan en cultivos enriquecidos y en frotis de ganglios linfáticos caseosos.



**Figura No. 1.** *Mycobacterium tuberculosis*

Son bacilos ácido alcohol resistentes por lo que la tinción de Ziehl Neelsen es útil para la coloración de estos microorganismos obtenidos de muestras clínicas o de cultivo. Con esta tinción, los bacilos aparecen de color rojo brillante sobre un fondo azul. Los bacilos tuberculosos son difíciles de teñir con la tinción de Gram, y se observan como bacilos gram positivos con tinción irregular.

Son bacilos no formadores de esporas, sin flagelos ni cápsula. La estructura celular de *M. tuberculosis* consta de un gruesa pared, separada de la membrana celular por el espacio periplásmico, con cuatro capas. La mas interna es el glicopéptido o peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido-N-glucolilmurámico (en lugar del habitual N-acetilmurámico) con cortas cadenas de alanina, a diferencia de *M. leprae* que posee glicina. Esta capa es el esqueleto de la bacteria que le da forma y rigidez. Externamente hay otras 3 capas compuestas una por polímeros de arabinosa y galactosa, otra formada por ácidos micólicos (que son ácidos grasos derivados, de gran importancia taxonómica en micobacterias y otros géneros relacionados como Nocardia) y otra superficial formada por lípidos como los sulfolípidos, el *cord factor* O factor de

acordonamiento (6,6 - Dimicoliltrealosa) es uno de los principales componentes de la pared micobacteriana, y constituye un factor de virulencia, junto con micobactinas y sulfolípidos (trehalosa, 2-sulfato). Las cepas virulentas al producir esta molécula consiguen inhibir la migración de los leucocitos, y median una respuesta innata, a cargo de macrófagos. La expresión de esta molécula confiere un aspecto característico al organismo, en forma de serpiente.

No difiere del resto de las bacterias en cuanto al citoplasma y el ADN nuclear. Las micobacterias son aerobios estrictos y no crecen en ausencia de oxígeno. La mayoría de las micobacterias, y entre ellas *M. tuberculosis*, se desarrollan de forma adecuada en medios simples que contienen una fuente de carbono, una de nitrógeno e iones de metales esenciales entre ellos hierro y magnesio. Para el aislamiento primario de muestras clínicas, se requiere un medio más complejo que contenga una base de patata-huevo o una base de agar suero. Los bacilos tuberculosos tienen un crecimiento muy lento incluso en condiciones óptimas y requiere de 10 a 20 días de incubación a 37°C. Aunque la proliferación puede tener lugar a un pH que oscila entre 6 a 7.6, el pH óptimo de crecimiento es de 7. El tiempo de duplicación de *M. tuberculosis* en condiciones óptimas de cultivo es de 15 a 18 horas, tardando varias semanas (de 1 a 3) en aparecer colonias visibles en medios de cultivo.

La pared micobacteriana posee un elevado contenido en lípidos (50-60%) excepcionalmente complejos, altamente hidrofóbicos y refractarios al ataque hidrolítico por parte de enzimas celulares; de hecho, se habla de un componente externo de naturaleza ceroso. Todas estas características hacen de la pared micobacteriana una efectiva barrera frente a muchos de los agentes antimicrobianos convencionales.

A grandes rasgos, la pared micobacteriana se compone de tres macromoléculas interconectadas entre sí.

- En la capa más externa, se ubican los **ácidos micólicos**, que representan el principal constituyente de este complejo de macromoléculas, y que no son sino ácidos grasos de 70-80 carbonos ramificados que se estructuran formando una capa lipídica similar de algún modo a la membrana externa clásica de cualquier Gram negativo.
- Los ácidos micólicos ( beta-hidroxiácidos) están esterificados con el **arabinogalactán**, el componente medio; se trata de un polímero formado por residuos D-galactofuranosil y D-arabinofuranosil.
- El arabinogalactán se conecta con la macromolécula más externa, el **peptidoglicano**, a nivel del ácido murámico (en posición 6), vía un disacárido, que se conoce como "**cord factor**". (figura No. 2)



**Figura No. 2.** *Mycobacterium tuberculosis*. Cord factor

La pared, junto con otros componentes de *M. tuberculosis*, permiten la invasión de los macrófagos por parte del patógeno, evadiendo así los mecanismos de defensa propios del huésped, a la vez que el patógeno es capaz de crecer en el interior de dichos macrófagos, células que en condiciones normales actuarían fagocitando y destruyendo a los patógenos bacterianos.

Los principales antígenos de las micobacterias pueden dividirse en dos grandes grupos:

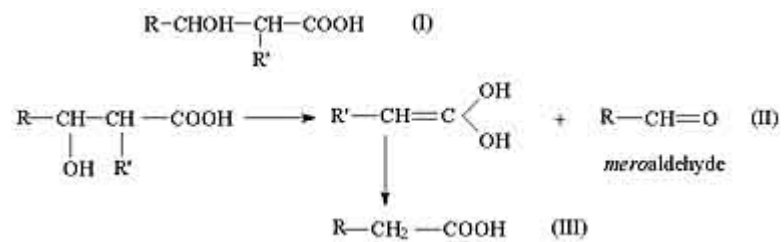
- los solubles o citoplasmáticos.
- los insolubles ligados a la pared celular.

En relación a la naturaleza de los antígenos solubles, se sabe que hay:

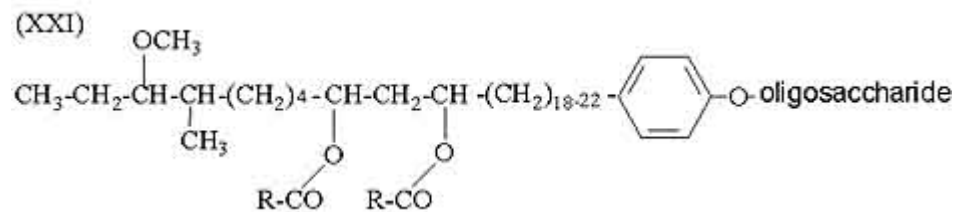
- a)** De naturaleza polisacárida, comunes a todas las micobacterias y constituidos por arabinomananos, arabinogalactanos, glucanos.
- b)** Proteínas, algunas están bastante estudiadas. Entre ellas la denominada tuberculina vieja (OT) o el Derivado Proteico Purificado (PPD). También el antígeno 5 o el de 65 Kda.
- c)** Lipídica, los monósidos de fosfatidil inositol (PIM) constituyen una familia de lípidos polares que se encuentran presentes en la membrana plasmática de las micobacterias. Entre ellos podemos citar los glicolípidos fenólicos, bastante específicos para *M. leprae* (PGL-1), para *M. kansasii* (PGL-kl) y para *M. tuberculosis* (PGL-Tbl).
- d)** El denominado antígeno 60 (Ag 60) es un complejo proteico-lipopolisacárido procedente del citoplasma y de la membrana celular de *M. bovis* BCG y es común a *M. tuberculosis*, *M. bovis* y otras micobacterias.

La cubierta celular altamente impermeable del bacilo tuberculoso contiene una rica variedad de lípidos como el ácido micólico, lipoarabinmanano (glicolípido inflamatorio) y sus variantes (figura 3).

### Acido Micólico.

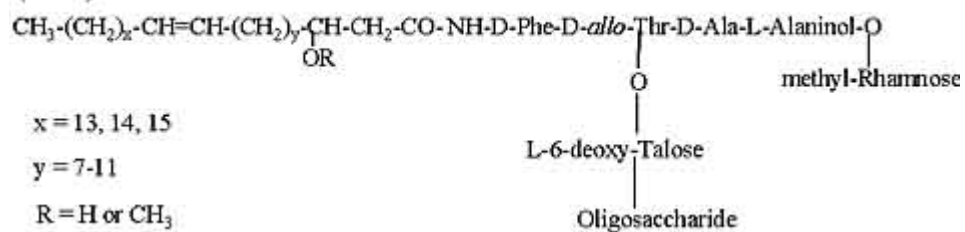


### Glicolípidos (PGL, pheoglicolípidos)

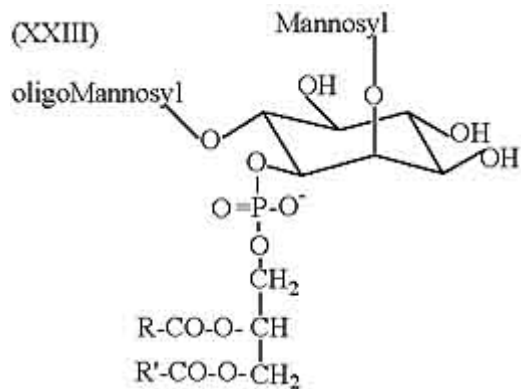


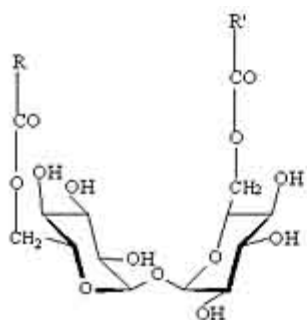
### Glicopeptidolípidos (GPL, Micósido C)

(XXII)



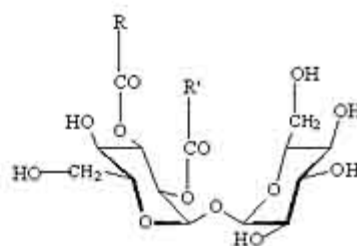
### Fosfatidilinositomanósido (PIM)





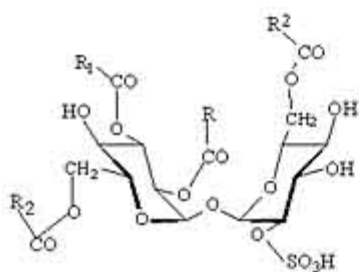
(XVII) 6, 6'-dimycoloyl- $\alpha$ -D-trehalose  
(DMT, Cord Factor)

R-CO- and R'-CO- = mycoloyl residues



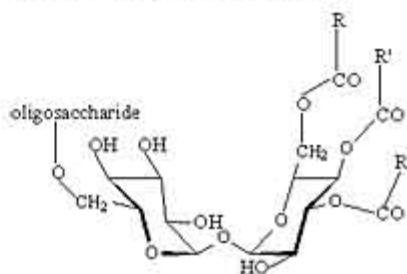
(XVIII) 2, 3-diacyl- $\alpha$ -D-trehalose  
(DAT)

R- and R'- = methyl-branched acyl chains



(XIX) Sulfolipid (SL)

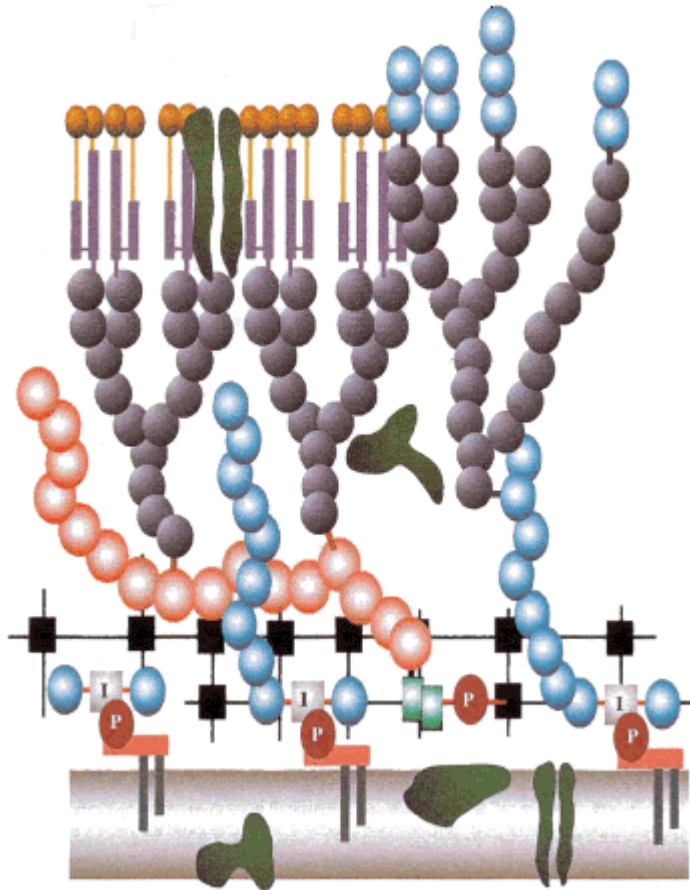
For SL1 : RCOO- = palmitate, stearate  
R<sub>1</sub>COO- = phthiocerate  
R<sub>2</sub>COO- = hydroxyphthiocerate



(XX) Lipooligosaccharide (LOS)

R, R' and R'' correspond either to  
straight or methyl-branched chains





**Figura No. 3.** Esquema de la conformación de lípidos de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*.

Otros como el fenoltiocerol que se une con el Ac. Micoceroso para formar el factor de virulencia fenoltiocerol-dimicocerosato (PDIM) y polisacáridos como arabinogalactano y arabinomano.

Estudiando los antígenos en doble difusión en gel se han establecido 4 grandes grupos con mayor o menor especificidad:

- Grupo I: compuesto de antígenos comunes compartidos por todas las micobacterias e incluso algún otro género bacteriano como *Nocardia* y *Corynebacterium*.
- Grupo II: serían antígenos propios de las micobacterias de crecimiento lento.

- Grupo III: lo formarían antígenos de micobacterias de crecimiento rápido y nocardias.
- Grupo IV: constituido por antígenos propios de cada especie.

Uno de los principales antígenos estudiados y sobre los cuales se realizan muchas investigaciones especialmente en el sentido de desarrollo de vacunas por su capacidad de estimulación del sistema inmune es el Antígeno 85B. *M. tuberculosis* expresa 3 micoliltransferasas relacionadas, conocidas como proteínas antígeno 85 (A, B y C). Las tres contribuyen a la síntesis de la pared, al catalizar la transferencia de micolato desde una trehalosa monomicolato a otra, dando lugar a una trehalosa libre y otra trehalosa dimicolato.

El antígeno 85B, es el mejor candidato a la hora de diseñar una vacuna, tal y como se ha demostrado en algunos modelos animales, en los que esta proteína de 30 kDa inducía una inmunidad más fuerte que la que proporciona la vacuna convencional BCG.

Además cataliza el último paso en la producción de ácidos micólicos “maduros”: media la esterificación del micolato con carbohidratos específicos de la pared, a través de esta molécula de trehalosa que no es sino un disacárido conocido como “cord factor” o cordina (9).

### **II.B.1. Genoma de *M. tuberculosis* (10).**

A diferencia de algunos aislados clínicos que comúnmente pierden su virulencia en el laboratorio, esta cepa H37Rv mantiene alta su virulencia en animales, desde su primer aislamiento en 1905. En una fase temprana del proyecto el mapa físico de las 4,4 Mpb del cromosoma se construyó en base a fragmentos de restricción lo que se relacionó con un mapa de genes que implica hibridación con una librería de cósmidos conocidos o marcadores genéticos.

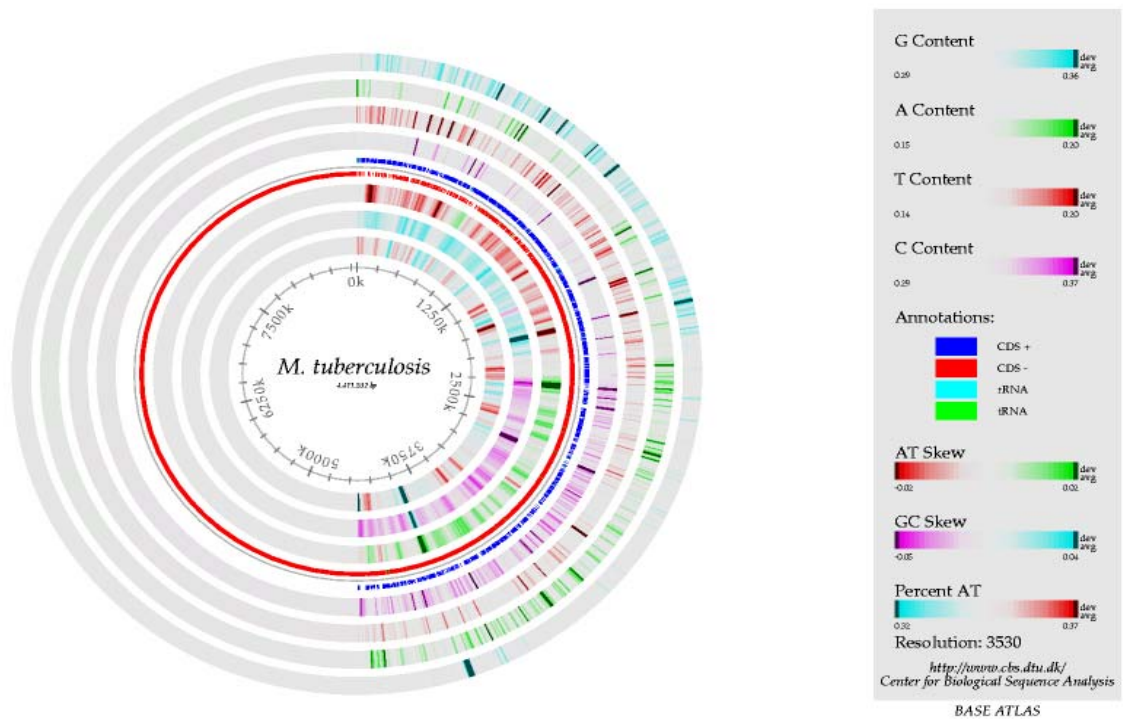
Luego se emplearon librerías de cromosomas artificiales de bacterias (BAC) construidos conteniendo largas inserciones de DNA de *M. tuberculosis* H37Rv lo

que permitió el casi completo tratamiento del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv para ser archivado.

También se observaron áreas extremadamente ricas en Guanina y Citocina del genoma que correspondían a los genes PE-PGRS y de secuencias de inserción de secuencia repetitiva (IS) que se hallan conocidas un número de 56 repartidas en familias: IS3, IS5, IS21, IS30, IS110, IS256, ISL3 en las cuales se basa uno de los métodos empleados para la caracterización de cepas de *M. tuberculosis* como el DRE-PCR. El genoma completo de *M. tuberculosis* contiene 4'411 532 pb con 65,6 mol% de zonas G-C (figura 4).

La secuenciación del genoma dió muchas luces sobre la biología del bacilo en cuanto a la importancia del metabolismo de los lípidos ya que al menos el 8% del genoma se dedica a ésta actividad.

Así como se encuentran en la envoltura del bacilo lípidos, glicolípidos y lipoglicanos y genes que revelan su producción, llamó la atención encontrar numerosos genes y proteínas que podrían conferir funciones lipolíticas.



**Figura No. 4.** Genoma de *Mycobacterium tuberculosis*

### **II.B.2. Genoma y biología de *M. tuberculosis*.**

*M. tuberculosis* realiza el ciclo de  $\beta$ -oxidación para el catabolismo de lípidos catalizado por enzimas de las familias FadA y FadB junto con otras enzimas involucradas en la degradación alternativa de lípidos que parecen ser las encargadas de degradar los lípidos de las células huésped.

Existen también otras familias de genes como PG y PPG de 100 y 67 miembros respectivamente que ocupan el 8% del genoma que mantienen dominios conservados con motivos Pro-Gli (PG) y Pro-Pro-Gli (PPG) en posiciones 8-9 u 8-10 respectivamente, las proteínas codificadas por estos genes pueden ser muy simples y repetitivas y en otros casos muy complejas, en el caso de las PG proteínas se hallan las secuencias PGRS (polymorphic GC rich sequence) y en las proteínas PPG las secuencias MPTR (major polymorphic tandem repeat), en un

principio se creyó que éstas eran simplemente secuencias repetitivas en tandem pero el descubrimiento de que formaban parte de secuencias codificadoras dio lugar a la reflexión sobre las funciones de éstas proteínas.

Realizando un análisis comparativo de genes en *M. tuberculosis* H37Rv se vio que las proteínas PG-PGRS muestran una variabilidad que es el resultado de inserciones o deleciones en la estructura de diferentes secuencias codificadoras ricas en Ala o Gly en los componentes del gen PGRS, estos hallazgos se realizaron mediante técnicas de Western Blot de éstas proteínas separadas de diferentes aislados clínicos utilizando anticuerpos específicos para PG-PGRS **(11)**.

Como era de esperar para una estructura repetitiva conservada los anticuerpos mostraron reacción cruzada con mas de una proteína PG-PGRS sugiriendo que las diferentes proteínas comparten estructuras antigénicas comunes, también existe creciente evidencia en estudios realizados sobre mutaciones identificadas en ciertas proteínas PG-PGRS en *M. tuberculosis* que podrían estar involucradas en la patogénesis **(12)**.

Estudios de fraccionamiento subcelular y pruebas de anticuerpos marcados con fluorescencia localizaron algunas proteínas PG-PGRS en la pared y membrana celular de *M. tuberculosis*. La disrupción del gen PG-PGRS codificador de la proteínas Rv1818c dió como resultado una gran reducción de la masa bacteriana sugiriendo que ésta proteína podría mediar la adición célula-célula siendo también reducida de manera importante la fagocitosis de las células mutadas **(13)**.

Otra proteína PG-PGRS, Rv1759c, variable entre cepas una fibronectina podría ser mediadora importante del ataque de la bacteria a la célula huésped **(14)**.

La inmunogenicidad de la proteína PG-PGRS Rv1818c ha sido grandemente estudiada en ratones, cuando fueron inmunizados con el dominio PG se indujo la respuesta tipo Th1 que no fue encontrada con el uso de la proteína completa PG-PGRS, en su lugar, el dominio PGRS produjo una respuesta de anticuerpos suprimiendo la respuesta Th1. Estas proteínas poseen algunas secuencias similares al EBNA (antígenos nucleares de Epstein Barr) que bloquean la

presentación antigénica por la vía MHC I, mediante su acción inhibidora del proteasoma.

Si éstas propiedades adhesivas e inmunológicas son compartidas por otros miembros de la familia es concebible que la gran variación observada a nivel genético pudiera otorgar fenotipos muy diferentes en cepas diferentes.

Las proteínas PPG de la clase MPTR también muestran variabilidad **(15)** y ha sido reportada una variación en una secuencia extensiva entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* **(16)**.

### ***III.B.3. Genómica comparativa.***

Muchos estudios se han realizado para comparar genomas de los miembros del complejo *M. tuberculosis* mediante la tecnología de DNA que detectaron el rango completo de nuevos arreglos genéticos en el polimorfismo de nucleótidos simples (SNPs), comparando cepas virulentas y no virulentas esperando cubrir las diferencias ligadas a cambios en la patogénesis.

Un descubrimiento particular y muy útil de la comparación de la secuencia completa del genoma de *M. tuberculosis* y *M. bovis* fue la presencia de los genes intactos *mmpS6* y *mmpL6* en *M. bovis* que en muchas cepas de *M. tuberculosis* no están presentes.

Estos cambios en SNPs ocurren en genomas de miembros de *M. tuberculosis* en niveles relativamente bajos de 1 cada 2000-4000 pb dependiendo de las especies por ejemplo, encontramos el punto de mutación en el gen *pncA* responsable de la resistencia a pirazinamida.

Un ejemplo reciente de delección es la de la secuencia de 7 Kb del locus *RvD2* en *IS6110* de *M. Tuberculosis H37Rv* que continúa presente en cepas avirulentas *H37Ra* **(17)** también se estudió la pérdida de la región *RD2* codificadora del antígeno *MPB64* en algunas cepas de *M. bovis* BCG. Otras delecciones son las de las regiones *RD7*, *RD8*, *RD9*, *RD10* en *M. microti*, *M. bovis* y BCG, que aún se hallan presentes en todas las cepas de *M. tuberculosis*. (*Tabla 1*).

Una inspección muy de secuencias de DNA alrededor de éstas regiones RD muestran aparentes deleciones dentro de regiones de codificación.

*Genes que están presentes en M. tuberculosis han sufrido disrupciones en cepas BCG, M. bovis, M. microti y M. canettii, estos hallazgos podrían indicar que el DNA de tales regiones en M. tuberculosis fue adquirido pero en su lugar hay fuertes argumentos a cerca de la pérdida del correspondiente material genético en otras especies.*

Algunas de estas regiones, principalmente RD9, RD1, RD2, RD4, RD7, RD8, RD10, RD12 y RD13 representan interesantes candidatos para el desarrollo de armas poderosas para el diagnóstico e identificación de miembros del complejo M. tuberculosis.

Uno de los objetivos de comparar la genómica del complejo M. tuberculosis fue el de identificar genes diferentes entre especies virulentas y no virulentas o atenuadas ya que su caracterización ayudaría no solo a definir mecanismos de patogenicidad si no que también proveería una guía para el desarrollo de nuevas vacunas lo que incluiría variantes recombinantes de BCG o incluso derivados atenuados de M. tuberculosis.

La vacuna BCG fue creada hace un siglo mediante la atenuación de M. bovis, especie muy próxima a M. tuberculosis (>90% de identidad), y desde entonces, son muchos los estudios que indican que la cepa ha ido acumulando un elevado número de mutaciones durante su propagación in vitro. Muchas de estas mutaciones, han comportado la pérdida de ORFs a nivel genético, algunos de ellos claves para los procesos de inmunidad, como los antígenos ESAT-60 o CFP10, ambos moléculas inmunodominantes, diana de células T.

Esto ha derivado en la aparición de múltiples cepas fenotípicamente distintas, cuya capacidad para inducir protección contra M. tuberculosis puede variar mucho entre sí. Es por ello que se están realizando estudios para investigar las bases genéticas de la variación en la eficacia de la vacuna BCG, sirviéndose de chips de DNA capaces de analizar genomas completos; se han analizado 12 cepas empleadas para la inmunización en zonas diferentes, hallándose 16 regiones

susceptibles de sufrir delecciones entre las distintas cepas examinadas. La hipótesis más aceptada es que las interacciones entre la cepa utilizada para la vacuna y otras micobacterias ambientales, interfieren en el papel protector que se espera que proporcione la primera. Esto se ha comprobado en países en desarrollo, de regiones tropicales sobre todo, donde la exposición a especies de *Mycobacterium* ambientales es mayor, y es consistente con los datos de estudios realizados en países como EUA, donde el potencial protector de la vacuna se conserva íntegramente. La naturaleza de este fenómeno de interferencia no se conoce del todo, pero se cree que las micobacterias proporcionan cierta protección que enmascara el efecto de una subsiguiente vacuna, o que incluso ejercen un papel antagónico.

Por otro lado, se ha visto que la multiplicación de la cepa atenuada BCG, necesaria para que tenga lugar la inducción de la inmunidad, queda inhibida en animales que previamente han entrado en contacto con micobacterias del ambiente, debido a que unas especies y otras comparten antígenos, de manera que se podría hablar de una primera inmunización contra BCG; la presencia de tales antígenos compartidos debería ser tenida en cuenta a la hora de diseñar nuevas vacunas.

Las estrategias que se suelen utilizar para esta búsqueda pasan por la identificación de los genes de *M. tuberculosis* que faltan a nivel de BCG, genes que pueden estar codificando para funciones específicas de *M. tuberculosis*, o posibles factores de virulencia **(18)**.

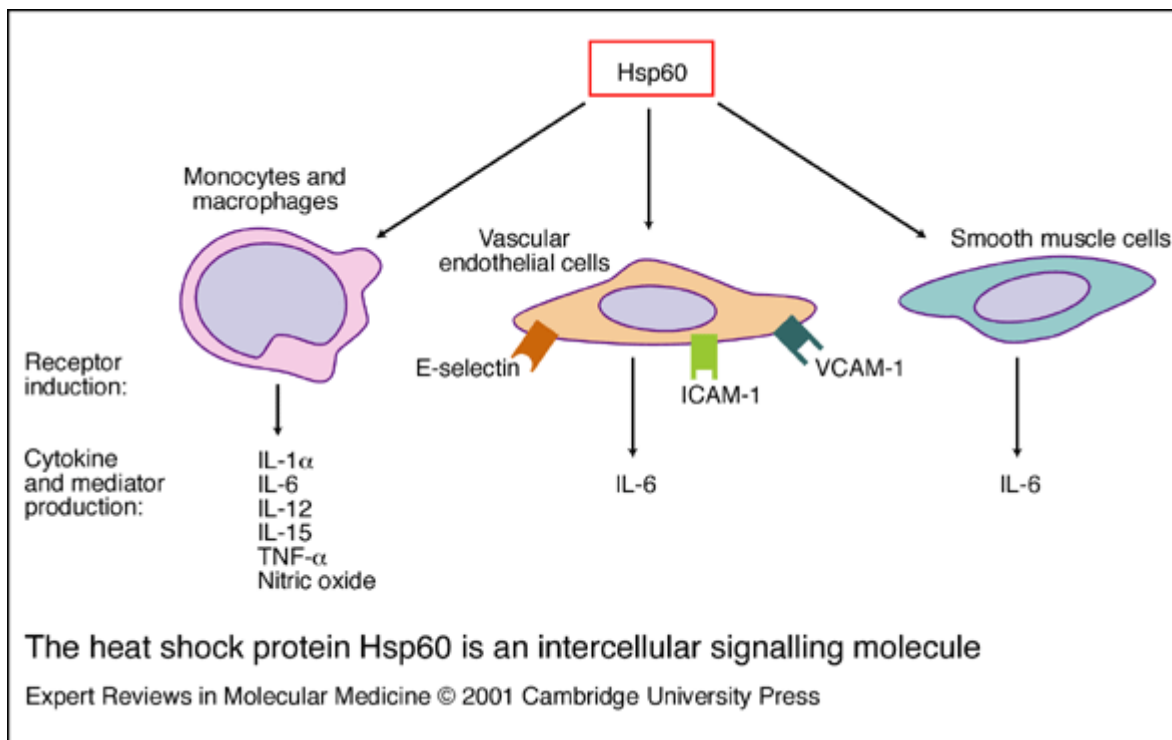


<b>Delección en la región...</b>	<b>Especies</b>	<b>Función</b>
<b>RD1</b>	Todos M. bovis y BCG	PG, PPG, ESAT-6
<b>RD2</b>	Algunos M. bovis y BCG	Metiltransferasas, MPT64, ribonucleótido reductasa, proteínas de membrana y secretadas
<b>RD3</b>	Todos M. bovis y BCG, M. africanum, M. microti	phiRv1 profago
<b>RD4</b>	Algunos M. bovis y BCG	Proteínas de membrana y enzima involucradas en la síntesis de sexo polisacáridos
<b>RD5</b>	Todos M. bovis y BCG, M. microti	ESAT-6, PG, PPG
<b>RD6</b>	Variable en todos	PPG, IS1532
<b>RD7</b>	Todos excepto M. tuberculosis y M. canettii	Proteínas integrales de membrana, invasinas
<b>RD8</b>	Todos M. bovis y BCG, M. microti	ESAT-6, PG, PPG, lipoproteínas, epóxidohidrolasas
<b>RD9</b>	Todos excepto M. tuberculosis y M. canettii	Metilasas, oxidoreductasas
<b>RD10</b>	Todos M. bovis y BCG, M. microti	Hidratasas , deshidrogenadas
<b>RD11</b>	Todos M. bovis y BCG	phiRv2 profago
<b>RD12</b>	Todos M. bovis y BCG	Citocromo P450
<b>RD13</b>	Todos M. bovis y BCG	Regulador transcripcional, citocromo P450 deshidrogenasa
<b>RD14</b>	Algunos BCG	PG-PGRS
<b>RD15</b>	Algunos BCG	
<b>RD16</b>	Algunos BCG	Regulador transcripcional
<b>TbD1</b>	M. tuberculosis	Proteínas de membrana

**Tabla 1.** Delección de genes en micobacterias.

Mediante la búsqueda de genes homólogos, ha sido identificada una nueva familia de antígenos altamente inmunoreactivos, con una secuencia homóloga a ESAT-6. Otros de los candidatos más prometedores para el diseño de vacunas son, junto con el antígeno ESAT-6, Ag 85A y Ag 85B, y la Hsp60 (figura 5), todas ellas fuertemente reconocidas durante el curso de la infección natural, y capaces de despertar una potente respuesta inmune al ser administradas previamente a una infección, como vacunas. La estrategia de la suplementación sería útil en individuos que ya han sido vacunados con la BCG y/o que han entrado en contacto con otras micobacterias ambientales, y se basaría en antígenos específicos de MTB, ausentes en las otras especies.

Las vacunas consistentes en la inoculación de una versión atenuada de *M. tuberculosis* tendrían la ventaja (teórica) de que toda una batería de determinantes antigénicos estarían actuando sinérgicamente para inducir así una respuesta lo más potente posible. Se habla de vacunas en éste punto debido a que si se investiga respecto a ellas es por su capacidad de inducir una respuesta inmune mayor a la que proporciona BCG por las características de atenuación antes mencionadas, lo que podría servir en el diagnóstico y viceversa, la razón de la ausencia de investigación de vacunas con microorganismos enteros, como por ejemplo *M. tuberculosis* es que existiría un peligro para individuos inmunocomprometidos pero se ha considerado por todo lo expuesto anteriormente **(19)**.



**Figura No. 5.** Proteína de shock térmico Hsp60 ha demostrado tener muchos efectos inmunológicos incluida la inducción de citoquinas proinflamatorias y expresión de moléculas de adhesión y algunos tipos de células vasculares y mieloides incluyendo células musculares: ICAM-1, molécula de adhesión intercelular 1; VCAM-1 molécula de adhesión celular vascular 1

### **II.C. RESPUESTA INMUNE FRENTE A MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.**

La respuesta inmune controla, pero no elimina al patógeno. La falta de respuesta inmune apropiada da como resultado una tuberculosis aguda activa, en la mayoría de los casos de infección por *M. tuberculosis*, el individuo permanece asintomático y no infeccioso.

*M. tuberculosis* persiste en los macrófagos dentro de un granuloma en los huéspedes infectados, que consiste en macrófagos y células gigantes, células T, células B y fibroblastos.

La habilidad de *M. tuberculosis* para mantener una infección crónica y causar enfermedad en un subgrupo de aquellos sujetos infectados, depende de sus productos, factores de virulencia, que capacitan al microorganismo para entrar y sobrevivir indefinidamente dentro de las células fagocíticas mononucleares por

subvertir los mecanismos celulares antimicrobianos **(20)**. Las micobacterias dentro de las células son capaces de evadir la respuesta humoral y mantener viabilidad por largos periodos de tiempo, por ejemplo, el lisosoma que es un organelo vacuolar complejo de la vía endocítica tardía donde se encuentran enzimas hidrolíticas que actúan óptimamente a un pH óptimo entre 4,5-5,0 Flynn y col. Encontraron que por su capacidad de producir cantidades significativas de amoníaco, el bacilo tuberculoso puede evadir el ambiente tóxico dentro de la vacuola lisosomal, inhibiendo el fagolisosoma y disminuyendo la potencia de las enzimas intralisosomales vía alcalinización. Dos enzimas que pertenecen al metabolismo del amoníaco, la ureasa micobacteriana y la glutamino sintetasa han sido asociadas a la interrupción de la fusión fagolisosomal y a la supervivencia micobacteriana.

Por otro lado la elevada producción de óxido nítrico NO por los macrófagos activados es un mecanismo antimicrobiano potente, estos fagocitos bajo la activación por agentes como el interferón gamma (INF-  $\gamma$ ) y TNF- $\alpha$  generan NO e intermediarios reactivos vía sintetasa de óxido nítrico (iNOS). El papel del oxígeno tóxico en el control de la infección micobacteriana permanece en controversia ya que se ha visto que los componentes micobacterianos lipoarabinomano (LAM) y fenolidoglicolípido-I (PGL-I) y sulfátidos son potentes destructores de los radicales oxígeno **(21)**. Por otro lado, durante los últimos años un creciente cuerpo de evidencias indica que la infección con diferentes especies de Mycobacterium puede llevar a los macrófagos a sufrir apoptosis muchos estudios demostraron que la apoptosis está bajo una fuerte influencia del gen Nramp1, este gen que es expresado en macrófagos, ejerce varios efectos pleiotrópicos tales como la producción de algunas citoquinas, la explosión respiratoria, la captación de L-arginina, y la producción del óxido nítrico en respuesta a activadores del macrófago como el IFN **(43)**.

El descubrimiento de la familia de receptores Toll-Like (TLR), en la respuesta inmune, ha ofrecido nueva luz sobre el vínculo entre inmunidad innata y adaptativa, hay evidencia que sugiere que los TLR juegan un papel importante en la activación de las células inmunes por los patógenos, incluyendo M. tuberculosis.

Brightbill y col. demostraron que la inducción de IL-12 y la actividad promotora in Vitro de iNOS por la lipoproteína 19KDa es dependiente de TLR 2 humano.

La producción de IL-12 es inducida, después de la fagocitosis de *M. tuberculosis*, por los macrófagos y células dendríticas, las cuales desarrollan una respuesta Th1 con producción de INF-  $\gamma$  que es la clave del control de la infección por *M. tuberculosis*, esta citocina es producida por las células CD4 y CD8 durante la infección tuberculosa y por las células citocinas naturales (NK), los individuos con deficiencia en ésta citocina forman granulomas que rápidamente se vuelven necróticos. Por otra parte la presencia de respuesta Th2 y de IL-4 en tuberculosis está sujeta a alguna controversia. *M. tuberculosis* es un potente inductor de IL-12 y por lo tanto la respuesta de INF-  $\gamma$  es detectada en huéspedes infectados, sin embargo la detección de IL-4 es variable y aunque algunos reportes indican que existen varias repuestas Th2 en la enfermedad tuberculosa, esto no ha sido demostrado. Existe una respuesta inmune Th1 deprimida, pero sin incremento de una respuesta Th2 en células mononucleares sanguíneas periféricas de pacientes tuberculosos. La elevada expresión de INF-  $\gamma$  se detecta en granulomas dentro de nódulos linfáticos de pacientes con linfadenitis tuberculosa, pero solo se ha detectado una pequeña cantidad de IL-4mRNA. De cualquier forma la presencia de IL-4 no se relaciona con un resultado de mejoría clínica o en diferencias en las etapas del granuloma o en su patología.

TNF- $\alpha$  es una citocina que se requiere para generar la respuesta granulomatosa y para una inmunidad mediada por células efectiva, sin embargo en grandes cantidades puede producir fiebre, pérdida de peso, debilidad muscular y necrosis en los pulmones. En modelos animales la ausencia de TNF-  $\alpha$  impide cualquier control de crecimiento de *M. tuberculosis*, la eliminación intracelular de la bacteria está mediada por la producción de ácido nítrico inducida por TNF-  $\alpha$  sin ésta inducción *M. tuberculosis* crece sin control, sin embargo el exceso puede ser en extremo dañino **(22)**.

Los granulomas que se forman desorganizados, con pocos macrófagos epitelioides activados, dificultándose asimismo la localización de los linfocitos con los macrófagos. El TNF-  $\alpha$  afecta la migración celular al interior de los tejidos

infectados por *M. tuberculosis*. Otras citocinas producidas durante esta infección son IL-10, IL-6 que regulan inflamación, hematopoyesis y respuesta inicial al patógeno y TGF- $\beta$  también citocina antiinflamatoria.

En el modelo murino, a la semana de la infección por un *M. tuberculosis* virulento, se eleva el número de células activadas T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en los nódulos linfáticos que drenan al pulmón, entre dos a cuatro semanas posinfección ambos tipos de células migran a los pulmones y muestran un fenotipo memoria/efector (CD44 y CD45 CD62L) aproximadamente 50% de éstas células son CD69, esto indica que las células T activadas migran al sitio de la infección y que interactúan con las CPAs. El granuloma tuberculoso contiene ambos tipos de células.

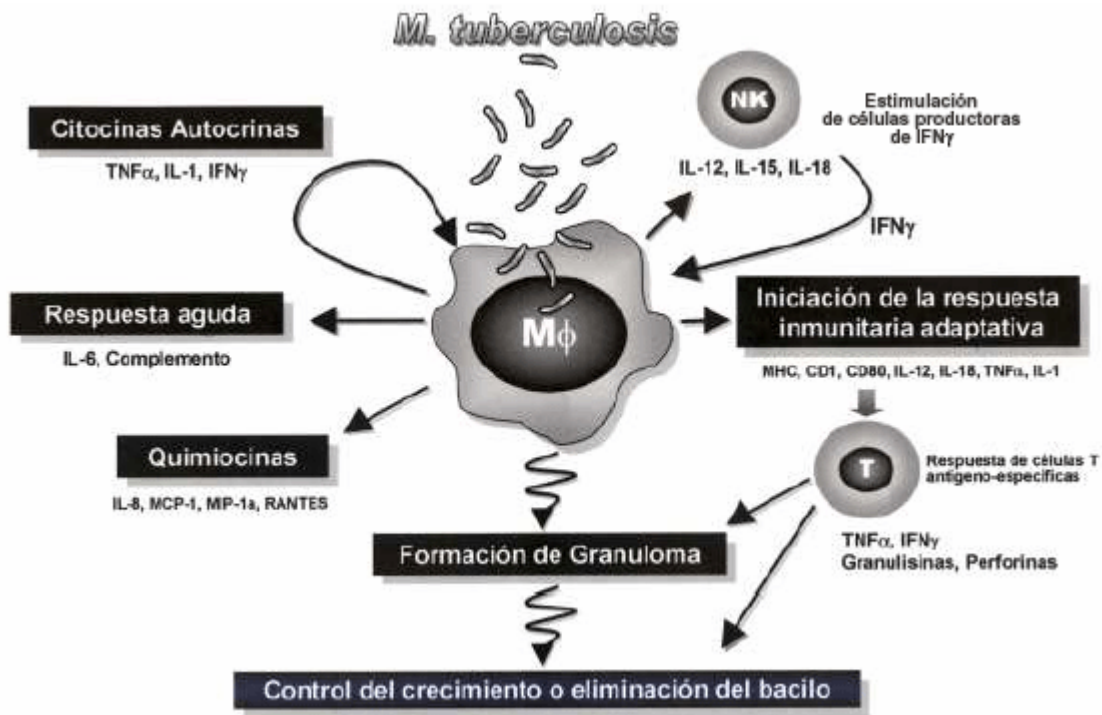
*M. tuberculosis* reside primariamente en una vacuola dentro del macrófago, la presentación de antígenos micobacterianos de tipo antígenos de histocompatibilidad mayor MHC clase II a las células CD4<sup>+</sup> es un resultado de la infección. Es conocido el papel de las células TCD4<sup>+</sup> en el desarrollo de una adecuada respuesta de las células B. Las células TCD4<sup>+</sup> pueden inducir una multitud de citocinas además de INF- $\gamma$ , incluyendo IL-2.

Un mecanismo por el cual la infección por *M. tuberculosis* podría inhibir el reconocimiento de los macrófagos por las células TCD4<sup>+</sup>, es rompiendo la regulación de la expresión de MHC II de la superficie celular. Otro APC, las células dendríticas, tiene constitutivamente altos niveles de MHC II. La infección de éstas células con *M. tuberculosis* no resulta en una expresión disminuida de MHC II, es por lo tanto menos probable que la infección con *M. tuberculosis* afecte la activación de las células TCD4<sup>+</sup>, que es una función primaria de las células dendríticas.

Las células TCD8<sup>+</sup> reconocen varios antígenos incluyendo 38 KDa, 65 KDa y 19 KDa además reconocen macrófagos infectados y en respuesta producen INF- $\gamma$  y lisan las células.

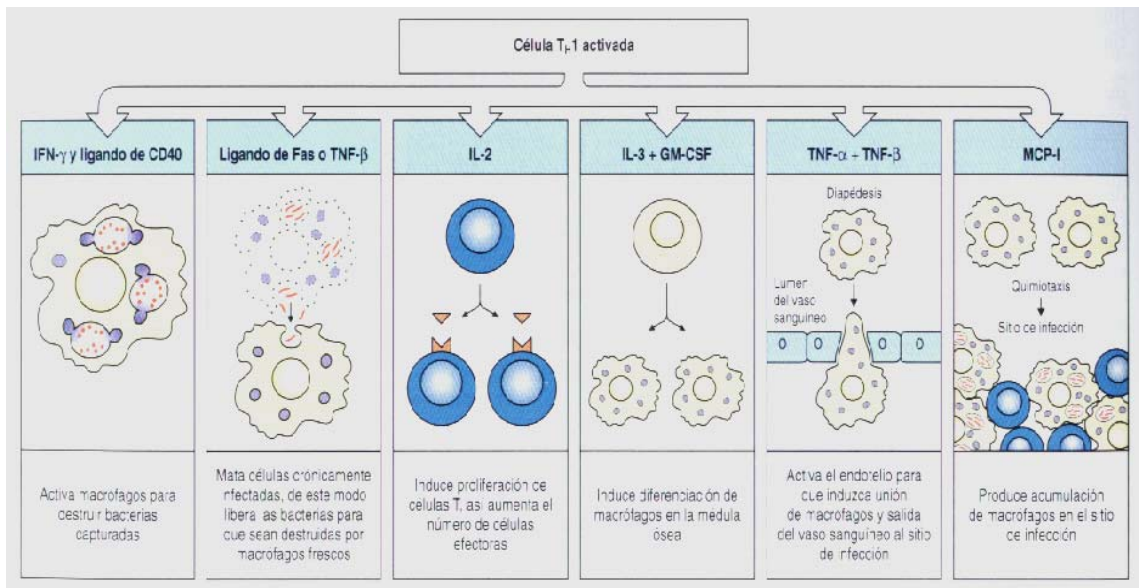
Existen al parecer dos funciones efectoras primarias de las células TCD8<sup>+</sup> en la tuberculosis y son lisis de las células infectadas y producción de citocinas, principalmente INF- $\gamma$ , no obstante la presencia de células lisadas conteniendo bacterias vivas capaces de sobrevivir extracelularmente parece ser una contra

respuesta protectora. Una hipótesis sugiere que los macrófagos infectados por *M. tuberculosis* que son incapaces de eliminar los organismos intracelulares debido ya sea a su activación defectuosa o a una infección masiva, podrían beneficiarse al ser lisados y permitir así la liberación de las bacterias que podrían entonces ser captadas por macrófagos activados dentro del granuloma y presumiblemente destruidos. Hay evidencia de un papel mas directo de las células CD8+ que trata de la existencia además de la perforina otra molécula responsable de la muerte de organismos intracelulares que sería la granulicina, también proteína citotóxica (23). (Figura 6 y 7).



**Figura No. 6.** Respuesta inmune frente a *Mycobacterium tuberculosis*.

**Mecanismos Inmunológicos Efectores en Tuberculosis.** Se muestra la respuesta inflamatoria de los macrófagos durante la primo-infección por *Mycobacterium tuberculosis*. El Macrófago reconoce y fagocita a la micobacteria, después los macrófagos inician una respuesta proinflamatoria donde las citocinas que actúan de manera autocrina o paracrina juegan el papel más importante. La producción de las citocinas dará lugar a la activación del macrófago con la consecuente muerte del bacilo o bien con el control del crecimiento de este. Esta producción de citocinas es acompañada por otro tipo de moléculas de la respuesta inmune innata tales como quimiocinas.



**Figura No. 7.** Papel de citocinas liberadas en infección frente a *M. tuberculosis*.

## II.D. PATOGENIA.

El flujo de aire en los bronquios favorece a que los bacilos inhalados se depositen en los segmentos basales de los lóbulos inferiores, lóbulo medio, lóbulo y segmento anterior de los lóbulos anteriores del pulmón. Cuando los bacilos tuberculosos alcanzan los alveolos son ingeridos por los macrófagos alveolares. Se establece un equilibrio entre la actividad bactericida del macrófago y la virulencia del bacilo (tabla 2). En la virulencia debe influir el número de bacilos, factores genéticos como la actividad catalasa-peroxidasa, el factor colonizador del macrófago (cme), el factor sigma (sigA), y la composición de la pared bacteriana rica en lípidos, glucolípidos y polisacáridos, que le confieren resistencia frente al complemento y los radicales libres del fagocito. El *M. tuberculosis* posee además varios antígenos proteicos y son los secretados los que tiene importancia en la estimulación de la inmunidad. Entre los antígenos proteicos se encuentran las moléculas de 30 y 32 kDa del complejo común BCG85, que pueden mediar la adhesión e invasión de los bacilos, así como el antígeno de 10 kDa (BCG-a) que



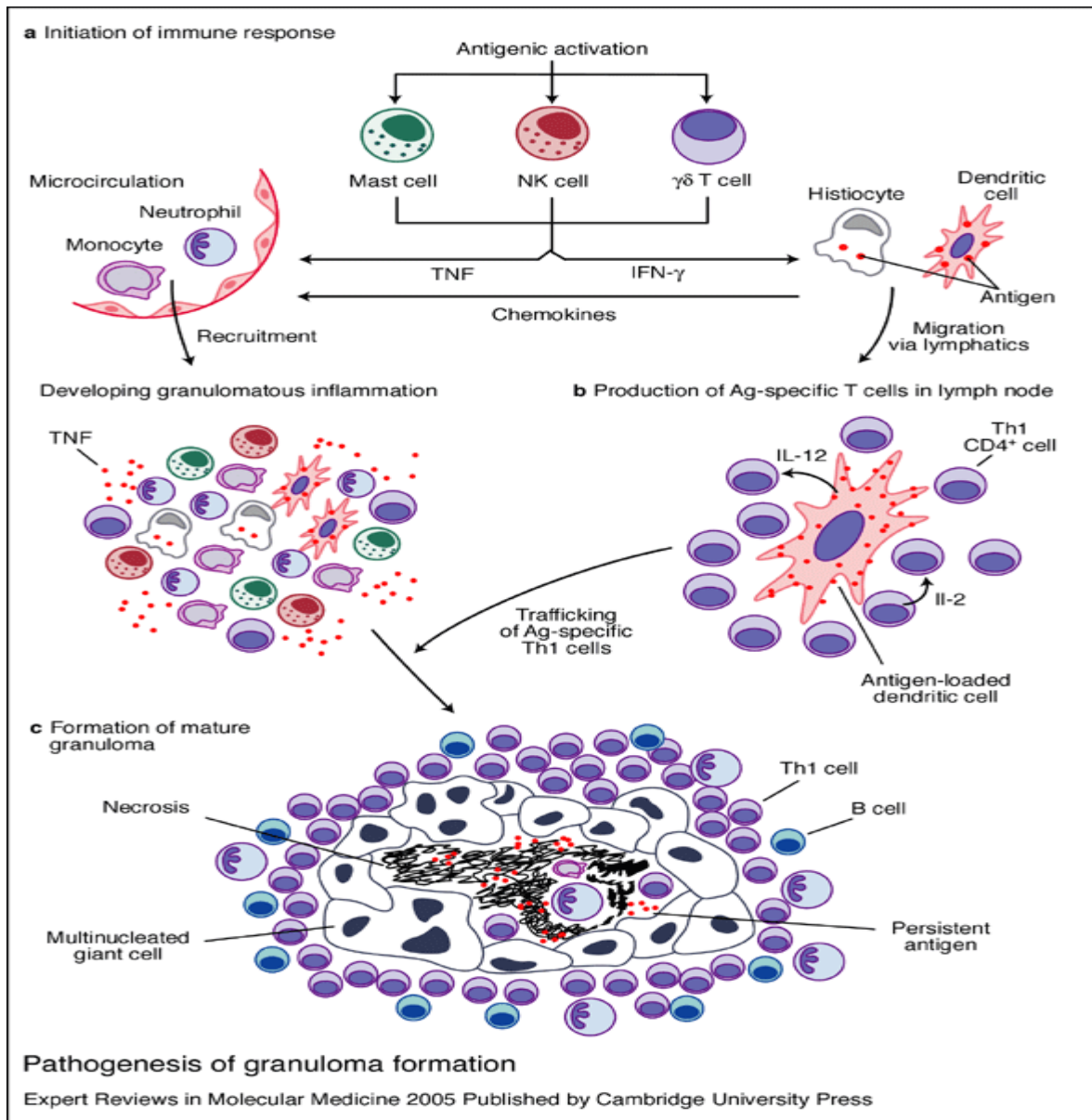
estimula la proliferación de linfocitos. La proteína del shock térmico de 65 kDa se considera un antígeno débil.

En ésta fase inicial el macrófago por su habilidad microbicida innata puede impedir la multiplicación de los bacilos mediante la producción de enzimas proteolíticas y citocinas.

Si el macrófago no destruye los bacilos, estos empiezan a multiplicarse, el macrófago se lisa y los bacilos liberados son ingeridos por otros macrófagos y monocitos que son atraídos desde el torrente sanguíneo hacia la zona de infección por la acción de diversos factores quimiotácticos y los bacilos son transportados hacia los ganglios linfáticos regionales, desde donde se diseminan hacia otras zonas del cuerpo **(24)**.

Estas fases iniciales de la infección suelen ser sintomáticas, los macrófagos procesan los antígenos proteicos secretados por la micobacteria, estimulan los linfocitos y después de 2 a 4 semanas de la infección se pone en marcha la respuesta inmune del huésped frente a *M. tuberculosis*. La respuesta inmune de protección vendría dada por la inmunidad mediada por células y de hipersensibilidad retardada, la inmunidad humoral no desempeña ningún papel definido en la defensa aunque si como una ayuda en el diagnóstico. Para que se desarrolle una respuesta eficaz se requiere la presencia de linfocitos CD8+ citotóxicos y de linfocitos CD4+ con respuesta de tipo Th 1 que conlleva la producción de interferón gamma y factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) que son potentes activadores de los macrófagos, del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y de interleucina 2 (IL-2).

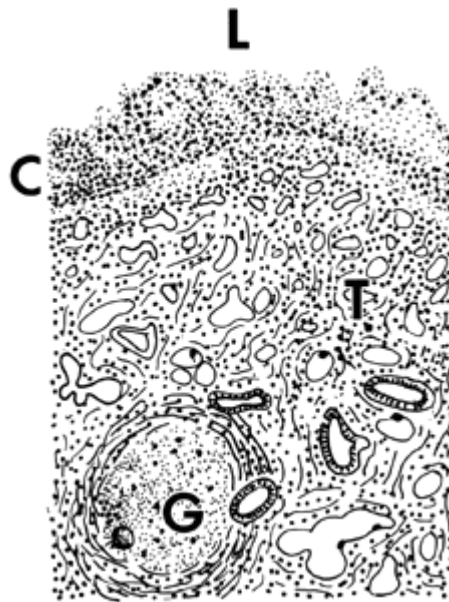
Tras el desarrollo de la inmunidad específica se forman las lesiones granulomatosas constituidas por la acumulación de macrófagos activados, células epitelioides, células gigantes y linfocitos (figura 8).



*Figura No. 8. Patogénesis de la formación de granuloma.*

Esta respuesta da lugar a la aparición de necrosis en la parte central del tubérculo, que adopta el aspecto de queso blando (necrosis caseosa). Aunque el *M. tuberculosis* puede sobrevivir, su crecimiento queda inhibido en éste ambiente necrótico debido a la baja presión de oxígeno, el pH ácido y otros factores. Llegado a éste punto algunas lesiones en el parénquima pulmonar y en los ganglios linfáticos hiliares pueden curar mediante fibrosis y calcificación (complejo de Ghon), ésta serie de eventos constituye la tuberculosis primaria. Pero incluso

cuando tiene lugar la curación pueden permanecer bacilos quiescentes en el interior de los macrófagos por la habilidad de la micobacteria para inhibir la fusión de fagosomas y lisosomas, o en el material necrótico durante años e incluso durante toda la vida del paciente (figura 9).



**Figura No. 9.** Patogénesis de la formación de granuloma Pared de caverna tuberculosa. L: cavidad, C: caseificación, G: granulomas tuberculosos, T: tejido granulatorio inespecífico

En algunos casos la respuesta de activación de los macrófagos es débil y la necrosis y la destrucción tisular siguen evolucionando. En el centro de la lesión el material caseoso presenta licuefacción, va destruyendo las paredes de los bronquios y de los vasos sanguíneos, y se drena en ellos el contenido formándose las cavernas. En las paredes de las cavidades los bacilos se pueden multiplicar exponencialmente y diseminarse por las vías respiratorias a otras partes del pulmón provocando nuevas lesiones (diseminación broncógena) hacia el exterior a través de esputo expectorado o a través de la sangre (diseminación hematógena), estos eventos son propios de la tuberculosis secundaria.

Después de la infección primaria se puede producir una reactivación en cualquier momento a lo largo de la vida y de forma excepcional se puede adquirir una reinfección exógena (mas probable en pacientes VIH positivas) (25).

	Mecanismo	Mecanismos	Resultados
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Evita la unión fagolisosomal	Impide degradación y procesamiento de antígenos Ureasa micobacteriana Alcalinización del fagolisosoma Producción micobacteriana de amonio Glutamino-sintetasa	Acción antimicrobiana  Síntesis de amonio Evita el ambiente tóxico dentro de la vacuola lisosomal inhibiendo potencia de enzimas vía alcalinización.
	Evita acción de los intermediarios de oxígeno (oxígeno tóxico) Limita activación de macrófagos por interferón- $\gamma$	Lipoarabinomanan (LAM) y Fenolicoglicolípido-1  Previene a los macrófagos para responder al interferón- $\gamma$	  Destrucción de radicales de oxígeno
	Macrófagos infectados por MTB	Producción de citoquinas disminuida Alteran expresión de moléculas MCH-II Reducen reconocimiento y activación de macrófagos infectados	Respuesta inadecuada para eliminación de bacterias No presentan antígenos a células T CD4 Impiden la modulación de la presentación de antígenos
Macrófagos infectados con <i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i> , activamente genera un poro o fractura en la membrana vesicular que rodea al bacilo en el fagosoma	Facilita el transporte de moléculas desde el citoplasma al interior de los fagosomas que contienen micobacterias Penetra el antígeno micobacteriano a la célula infectada. Poro bidireccional <i>M. tuberculosis</i> , podría utilizar este poro para obtener nutrientes o introducir moléculas tóxicas dentro del citoplasma	Al introducir moléculas en el citoplasma de la célula, facilita procesamiento y presentación de antígenos

Tabla 2. Mecanismos patológicos de *M. tuberculosis*

## II.E. DIAGNÓSTICO.

### II.E.1. Técnicas serológicas en general (26).

Una técnica serológica es un exámen de sangre que se utiliza para detectar la presencia de anticuerpos contra un microorganismo.

Es evidente que una buena prueba diagnóstica es la que ofrece resultados positivos en enfermos y negativos en sanos. Por lo tanto, las condiciones que deben ser exigidas a un test son:

- Validez: Es el grado en que un test mide lo que se supone que debe medir, es decir con que frecuencia el resultado del test es confirmado por procedimientos diagnósticos más complejos y rigurosos. La sensibilidad y la especificidad de un test son medidas de su validez.
- Reproductividad: es la capacidad del test para ofrecer los mismos resultados cuando se repite su aplicación en circunstancias similares. La variabilidad biológica del hecho observado, la introducida por el propio observador y la derivada del propio test, determinan su reproductividad.
- Seguridad: La seguridad viene determinada por el valor predictivo de un resultado positivo o negativo, es decir con que seguridad un test predecirá la presencia o ausencia de enfermedad, o que ante un resultado positivo de un test qué probabilidad existe de que este resultado indique presencia de la enfermedad probabilidad muy influenciada por la prevalencia de la patología.

### ***II.E.1.a. Sensibilidad.***

Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad del test para detectar la enfermedad (tabla 3).

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

### ***II.E.1.b. Especificidad***

Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo. En otras palabras, se puede definir la especificidad como la capacidad para detectar a los sanos.

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

<b>PRESENCIA O AUSENCIA DE LA ENFERMEDAD</b>		
<b>RESULTADO DE LA PRUEBA</b>	<b>VERDADERO DIAGNOSTICO</b>	
	<b>ENFERMO</b>	<b>SANO</b>
<b>POSITIVO</b>	Verdaderos Positivos (VP)	Falsos Positivos (FP)
<b>NEGATIVO</b>	Falsos Negativos (FN)	Verdaderos Negativos (VN)

*Tabla 3. Tabla para realizar la determinación de sensibilidad y especificidad de un test*

Los conceptos de sensibilidad y especificidad permiten, por lo tanto, valorar la validez de una prueba diagnóstica. Sin embargo, carecen de utilidad en la práctica clínica. Tanto la sensibilidad como la especificidad proporcionan información acerca de la probabilidad de obtener un resultado concreto (positivo o negativo) en función de la verdadera condición del enfermo con respecto a la enfermedad. Sin embargo, cuando a un paciente se le realiza alguna prueba, el médico carece de información a priori acerca de su verdadero diagnóstico, y más bien la pregunta se plantea en sentido contrario: ante un resultado positivo (negativo) en la prueba, ¿cuál es la probabilidad de que el paciente esté realmente enfermo (sano)? Así pues, resulta obvio que hasta el momento sólo hemos abordado el problema en una dirección. Por medio de los valores predictivos completaremos esta información:

### ***II.E.1.c. Valor predictivo positivo:***

Es la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en el test. El valor predictivo positivo puede estimarse, por tanto, a partir de la proporción de pacientes con un resultado positivo en la prueba que finalmente resultaron estar enfermos:

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

### ***II.E.1.d. Valor predictivo negativo:***

Es la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano. Se estima dividiendo el número de verdaderos negativos entre el total de pacientes con un resultado negativo en la prueba:

$$VPN = \frac{VN}{FN + VN}$$

### ***II.E.2. Reacción antígeno anticuerpo.***

La complementariedad existente entre epítopo y parátopo condiciona la relación específica entre antígeno y anticuerpo. Dicha complementariedad afecta tanto a una relación espacial entre los grupos químicos reaccionantes, a la relación complementaria de cargas netas como a la relación estérica entre las estructuras reaccionantes.

En general los anticuerpos son altamente específicos, siendo capaces de discernir entre pequeñas variaciones del antígeno, tanto a nivel de estructura primaria como de conformación estérica o configuración óptica del mismo.

La relación entre un antisuero o anticuerpo determinado y el antígeno que ha dado lugar a su producción se conoce como interacción específica. Cuando el antisuero da reacción positiva con otros antígenos, relacionados o no con el utilizado en la inmunización, se habla de reacción cruzada.

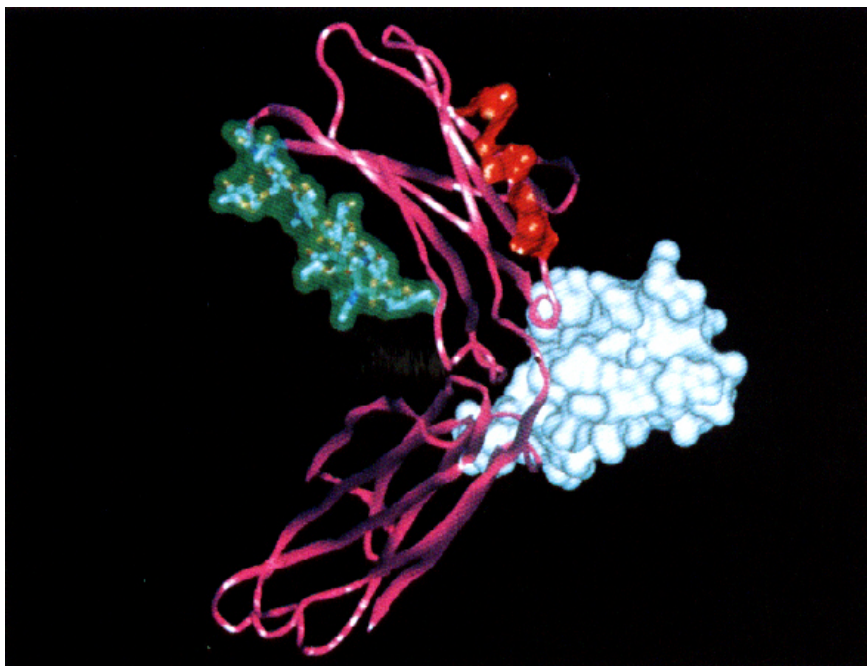
Pueden establecerse interacciones de baja afinidad entre un anticuerpo y antígenos que presenten epítomos no relacionados. Así mismo determinados grupos químicos pueden generar interacciones no específicas entre éstos y el anticuerpo. Dichas interacciones se definen como inespecíficas y pueden soslayarse modificando las condiciones del ensayo. Así, un incremento en la fuerza iónica o la presencia de detergentes a bajas concentraciones sólo permiten el establecimiento de interacciones de alta afinidad. La utilización de agentes saturantes, por ej. soluciones de proteínas o aminoácidos pueden actuar como bloqueantes de grupos reactivos presentes en la preparación (27).

### ***II.E.3. Inmunodott para tuberculosis.***

Esta técnica está siendo actualmente realizada en el Instituto SELADIS de la ciudad de La Paz, se basa principalmente en la reacción antígeno anticuerpo que se da al enfrentar la muestra en tres diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000 (con anticuerpos frente a la bacteria) y el antígeno (BCG) sobre una base de papel de nitrocelulosa que puede retener al antígeno y permitir la unión de ambos luego ser lavada con una solución de PBS y leche descremada cuya función es la de bloquear sitios activos del papel para que no se absorban otras proteínas después de haber fijado el antígeno, también se realizan lavados con PBS-tween que es un detergente que evita uniones inespecíficas de otras proteínas del suero que son mas débiles que la unión antígeno anticuerpo.

Posteriormente se emplea un revelador que es proteína A con oro coloidal encargada del reconocimiento de la región Fc del anticuerpo para dar la coloración cuya intensidad está directamente relacionada con la unión específica del antígeno y el anticuerpo presente en la muestra (figura 10).





**Figura No. 10.** Unión de proteína A de *Staphylococcus aureus* a fracción Fc del anticuerpo.

### ***II.E.2. Diagnóstico de Mycobacterium tuberculosis.***

La fase de infección tuberculosa latente ocurre cuando una persona ha estado expuesta al contagio con *M. tuberculosis* y ha desarrollado una respuesta inmune capaz de controlar y forzar la bacteria a entrar en un estado no replicativo, persistente sin causar enfermedad. Son personas sanas que no transmiten la enfermedad, pero que son portadoras de micobacterias viables y tienen un riesgo de desarrollar la tuberculosis en cualquier momento de su vida.

El diagnóstico de infección tuberculosa latente se establece por la ausencia de síntomas clínicos de enfermedad, y una prueba cutánea de tuberculina (PPD o derivado proteico purificado) positiva y/o la existencia de tractos fibrocicatrizales en el estudio de radiografía de tórax (figura 11), sugestivos de tuberculosis antigua.



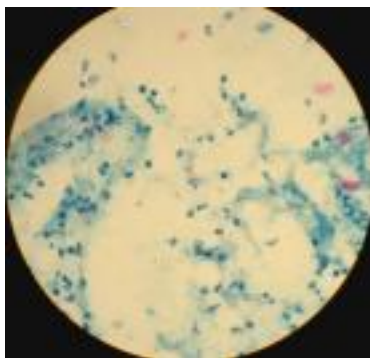
**Figura No. 11.** Radiografía de tórax

La principal limitación del PPD es su falta de especificidad con respecto a la especie de micobacteria, debido a que entre los constituyentes del PPD hay un elevado número de proteínas que son comunes a diferentes especies de micobacterias. La prueba de tuberculina puede dar falso positivo por la infección por otras micobacterias o por la vacunación previa con BCG, y falso negativo en caso de formas graves de enfermedad activa (miliares), por desnutrición proteica, insuficiencia renal crónica, alteración de la inmunidad celular, otras infecciones víricas bacterianas o fúngicas, tratamiento con corticoides o inmunosupresores.

Sin embargo, existen otras pruebas diagnósticas que ayudan a plantear el diagnóstico de esta enfermedad. **Pruebas microbiológicas.** Las características tintoriales de *M. tuberculosis* permiten su rápida visualización (baciloscopía) (figura 12) en muestras clínicas mediante el uso de diferentes técnicas de tinción. El escaso número de bacilos presente en la mayoría de estas muestras hace generalmente necesario el estudio de más de una antes de que pueda alcanzarse un diagnóstico definitivo. La presencia de abundantes ácidos grasos en la pared de *M. tuberculosis* la hace ser ácido-alcohol-resistente. Es decir, que tiene la propiedad de retener ciertos colorantes de anilina a pesar de ser tratados con un ácido y alcohol.

En este hecho se basa la técnica de Ziehl Neelsen, en la que se emplea como colorante fucsina fenicada calentada, decolorada con ácido-alcohol y contrateñida con azul de metileno. Las técnicas flurocromicas con auramina rodamina se basan en el mismo principio básico, pero permiten una más rápida y más cómoda

visualización de las micobacterias que muestran una llamativa fluorescencia amarilla anaranjada cuando se observan con microscopio de campo oscuro. Con cualquiera de estas técnicas, *M. tuberculosis* se observa como un bacilo de menos de 0,5  $\mu$ m de diámetro que puede formar parejas o grupos característicos de unos pocos microorganismos en forma de cuerdas. El hecho de que *M. tuberculosis* necesite 5-20 horas para duplicarse explica que el cultivo de esta micobacteria exija un tiempo muy prolongado, entre 4 y 8 semanas, en los medios de cultivo convencionales de Löwenstein Jensen o de Middelbrook.



*Figura No. 12. Baciloscopía*

Los modernos **métodos radiométricos** (sistema Bactec (r)) permiten acortar sustancialmente el tiempo necesario para el crecimiento de *M. tuberculosis*, aunque la identificación definitiva puede requerir más tiempo. La **hibridación con sondas de DNA** permite la rápida identificación de la especie de micobacteria aislada en cultivo. La rentabilidad diagnóstica de la baciloscopía y del cultivo está directamente relacionada con la extensión de la enfermedad. La baciloscopía será positiva en una tercera parte, aproximadamente, de los pacientes en los que el cultivo de esputo es positivo, pero este porcentaje puede aumentar hasta el 69 o 70 % si se hace un mayor número de baciloscopías, aunque raras veces es necesario recoger más de 3 esputos para conseguir una baciloscopía positiva. En general, la rentabilidad de la baciloscopía del esputo dependerá del tipo de lesión pulmonar. Son necesarios 10.000 bacilos/mL de esputo para que la baciloscopía sea positiva. Por lo tanto, en las lesiones pulmonares pequeñas, poco bacilíferas,

pueden necesitarse más número de esputos; por el contrario, si un paciente tiene una gran caverna y la baciloscopía es negativa, se debería ir pensando en un diagnóstico alternativo.

**Prueba tuberculínica.** La prueba tuberculínica es una reacción cutánea de hipersensibilidad que indica la existencia de infección tuberculosa previa. La prueba se lleva a cabo con un extracto proteico purificado (PPD) de *M. tuberculosis*. Se usa PPD, que debe administrarse por vía intradérmica (intradermorreacción de Mantoux) aplicando en la cara anterior del brazo 0,1 mL que contienen 2 unidades de PPD, que son equivalentes a 5 unidades del antígeno de referencia (denominado PPD-S).

Las reacciones deben leerse midiendo el diámetro transversal de la zona de induración a las 48-72 horas. Se ha recomendado que la prueba se considere positiva a partir de 5 mm. Conviene remarcar que la prueba tuberculínica puede ser positiva si el paciente ha tenido contacto con otras micobacterias no tuberculosas. Por ello, en los países con una alta incidencia de otras micobacteriosis, para considerar que un paciente ha tenido contacto con *M. Tuberculosis* se exigirá un mayor tamaño de la prueba tuberculínica.

Los pacientes que han sido vacunados contra la tuberculosis con BCG, la prueba tuberculínica puede ser positiva durante un período aproximado de 10 años. En los vacunados, la reacción se considerará positiva cuando sea mayor de 14 mm. La repetición de la prueba tuberculínica en un determinado individuo infectado no lo sensibiliza frente a pruebas posteriores. Sin embargo, sí puede reactivar la hipersensibilidad (efecto booster o rebrote) de algunos sujetos con prueba tuberculínica negativa que tuvieron en los años previos algún contacto con una especie de micobacteria o que fueron vacunados.

La cuantificación de la enzima adenosindeaminasa (ADA) en ciertos líquidos corporales puede tener cierta utilidad para diagnosticar la tuberculosis, aunque la prueba carece de suficiente especificidad. Recientemente se ha destacado la alta sensibilidad y especificidad diagnóstica de las **técnicas de amplificación de DNA** de micobacterias mediante la técnica de PCR. Aunque los primeros datos son

ciertamente prometedores, la aplicabilidad real de esta técnica en el diagnóstico convencional de la tuberculosis está todavía por definir. Otras técnicas que se sirven también de la PCR pueden ser útiles en el futuro para la detección precoz de cepas resistentes de *M. tuberculosis* y para el seguimiento epidemiológico de ciertos brotes de la enfermedad **(28)**.

## ***II.F. NUEVAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS (29).***

Tres enfoques muy novedosos permiten hacer el diagnóstico de la tuberculosis en etapas más tempranas. Los dos primeros se basan en técnicas inmunológicas y el tercero en la hibridación de los ácidos nucleicos. En primer lugar, se pueden identificar y cuantificar en el suero del enfermo, los anticuerpos (Acs) dirigidos contra los antígenos (Ags) más específicos de las micobacterias. En esto se basan la mayoría de los métodos serológicos de diagnóstico de la tuberculosis. También se puede intentar la detección directa de los Ags micobacterianos en el suero o en las secreciones de los pacientes, con el empleo de Acs cada vez más específicos. Por último, los modernos métodos de clonación, hibridación y recombinación de los ácidos nucleicos, permiten detectar secuencias especiales de ácido desoxiribonucleico en la expectoración o en otras muestras orgánicas. La diferenciación entre estos tres métodos no es tan rígida como pudiera parecer, ya que frecuentemente las distancias técnicas pueden combinarse.

### ***II.F.1. Detección de anticuerpos.***

Las micobacterias tienen numerosos antígenos que despiertan diferentes tipos de respuestas inmunitarias, humorales y celulares en el huésped. Aunque se estima actualmente que la aparición de anticuerpos no desempeña ningún rol defensivo en la tuberculosis, se ha intentado identificarlos con fines diagnósticos. Estos Acs son muy numerosos y tienen diversos grados de especificidad frente a los antígenos bacilares; los más característicos pertenecen a la clase de inmunoglobulinas G (IgG).

La determinación de estas IgG en el suero de los sujetos en estudio ha permitido el desarrollo de una serie de métodos serológicos de diagnóstico de tuberculosis. En tuberculosis se han empleado tres clases de Ags: 1) antígenos crudos, derivados de constituyentes del micobacterio, como glicolípidos, polisacáridos, extractos proteicos, sonicados de las paredes bacilares, Ags citoplasmáticos, cultivos de BCG; 2) derivados de la tuberculina (PPD), y 3) antígenos más purificados, como las proteínas A y D y más recientemente los Ags 5 y 6 de Daniel. Hasta hace poco no se había logrado desarrollar un test serológico suficientemente sensible y específico para su empleo en clínica, pero con los avances de la inmunología y la aparición de métodos cada vez más sensibles para la detección de Acs, muchas de estas limitantes se han ido superando. 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 o cuando existe un número limitado de bacilos, que es justamente cuando las técnicas bacteriológicas también muestran sus mayores limitaciones.

Los métodos serológicos tienen la ventaja de ser simples, baratos y rápidos. Utilizan equipos que ya están disponibles en muchos laboratorios de los países en desarrollo. Sólo requieren de la extracción de 2 mL de sangre, lo que los convierte en excelentes procedimientos de tamizado o *screening*.

### ***II.F.2. Determinación de antígenos micobacterianos.***

Otra forma de hacer el diagnóstico de una enfermedad infecciosa es a través de la determinación de los Ags bacterianos, en las muestras clínicas de los enfermos. En tuberculosis, cada día aparecen nuevas técnicas de detección de antígenos. Así, con la técnica de ELISA y empleando Acs anti BCG, se ha podido cuantificar los Ags solubles del bacilo de Koch en el líquido céfalo-raquídeo y hacer así el diagnóstico de meningitis tuberculosa con un alta sensibilidad y especificidad. Más recientemente se ha desarrollado un test de aglutinación de partículas de látex, sensibilizadas con Acs contra Ags de membrana de bacilos tuberculosos.

La detección de Ags se ha usado también en muestras de expectoración, pero con una sensibilidad aún inferior a la de los procedimientos bacteriológicos. Tampoco ha sido exitosa hasta ahora la determinación de Ags micobacterianos en el suero, lo que en parte puede deberse a que estarían secuestrados formando complejos inmunes circulantes, unidos a IgG, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y a otros factores del complemento. Últimamente se han desarrollado una serie de técnicas para precipitar y separar estos Ags desde los complejos inmunes, para su posterior identificación con los métodos de ELISA o de inmuno-electrotransferencia (Westernblot-Immunoblot).

Más prometedores parecen ser los procedimientos basados en el desarrollo de Acs monoclonales. Se han identificado ya más de 50 Acs monoclonales capaces de detectar otros tantos Ags de variable especificidad, y su número aumenta cada día. Los 6 más utilizados actualmente son el TB 23, TB68, TB 71, TB 78 y el ML 34. Con el empleo de estos Acs se ha podido detectar la presencia de Ags micobacterianos solubles en el suero de los pacientes. Los Acs monoclonales son tan específicos que han debido combinarse para aumentar su sensibilidad. Así, paulatinamente se han identificado los Ags más significativos de las diferentes micobacterias. Recientemente, Ivanyi, del British Medical Research Council, con un triplete de Acs monoclonales dirigidos contra los Ags TB 12, TB 23 y TB 68, ha sido capaz de demostrar el diagnóstico de tuberculosis en Indonesia, con una sensibilidad del 95%. Otro enfoque novedoso ha sido el empleo de clones de células T para la identificación de los Ags más representativos del bacilo de Koch. Estos Ags se pueden fragmentar e incubar con cultivos de linfocitos obtenidos de individuos infectados con este bacilo, pero que no han desarrollado la enfermedad. Se supone que estos clones de linfocitos T serían capaces de reconocer a los Ags especie específicos de las micobacterias, y entre ellos a los más inmunogénicos, con los cuales eventualmente podrían fabricarse nuevas vacunas contra la tuberculosis. Cada clon de linfocitos T es capaz de reconocer un cierto determinante antigénico, el que se puede separar con las técnicas de inmunoblotting para su mejor caracterización. Se han podido identificar los genes

que codifican para la síntesis de estos Ags, los que se pueden hibridizar y fabricar en grandes cantidades mediante la ingeniería genética. Aún más, conociendo su secuencia de aminoácidos, han podido ser sintetizados en el laboratorio.

### ***II. F.3. Recombinación de ácidos nucleicos.***

En esencia los métodos de hibridación consisten en la selección de un cromosoma o de un gen y su unión a un vector que le dé vida, es decir, que sea capaz de replicarlo independientemente de su genoma original. Este gen o cualquier particular secuencia de ácido desoxiribonucleico (ADN) seleccionada, puede ser hibridado, es decir, se puede introducir en el ADN de otra célula desde donde será capaz de expresar su función original.

También se puede seleccionar una parte del ADN del bacilo de Koch, suficientemente específica para propósitos diagnósticos. Con enzimas de restricción o con determinados métodos físicos o químicos se pueden obtener distintas fracciones del cromosoma del bacilo tuberculoso y fragmentar las dobles hebras de su ADN en monohebras, las que se pueden marcar con isótopos radioactivos. Cada extremo de esta monohebra tendrá una determinada secuencia de los nucleótidos adenosina, timina, citosina y guanina, que se unirán con otras monohebras cuyas secuencias de nucleótidos sean complementarias con ellas. Así, si se toma una muestra de expectoración que tenga bacilos tuberculosos y se somete a procedimientos que fragmenten su ADN en monohebras marcadas llamado sonda o "probe", se producirá la unión de aquellas que sean complementarias.

Existen procedimientos para eliminar las monohebras sobrantes, de modo que en los filtros de nitrocelulosa sólo quede la doble hebra de ADN recombinado emitiendo su señal radioactiva que indica que en la muestra existía ADN micobacteriano, es decir, bacilos tuberculosos. Con este método pueden detectarse ya más de 10 picogramos de ADN micobacteriano en una muestra, lo que equivale a unos 10.000 bacilos, que es más de lo que puede detectar la microscopía fluorescente.



#### **II.F.4.Nuevas tuberculinas.**

Cada especie de micobacterias contiene una serie de Ags que comparte con otras especies y algunos que son más o menos específicos de ella. Los intentos por identificar algunos de estos Ags, con el fin de disponer de "nuevas tuberculinas" más específicas que permitan diferenciar, a través de una simple reacción intradérmica *in vivo*, los infectados con *M. tuberculosis* variedad humana y bovina de los infectados con *M. atípicas*, no han tenido el éxito esperado. Esto probablemente se deba a que existe una comunidad antigénica muy grande entre los Ags de las micobacterias.

Los estudios epidemiológicos practicados con tuberculinas derivadas de diferentes especies micobacterianas, han permitido diferenciar en algunas poblaciones humanas, tres respuestas genéticas muy diferentes. 1) individuos que responden a todas las tuberculinas empleadas incluyendo las preparadas con especies no presentes en ese ambiente, o sea son capaces de reconocer antígenos comunes no específicos de las micobacterias; 2) los que no responden a ninguna tuberculina, ya sea porque no han sido expuestos a ningún micobacterio o porque su respuesta ha sido suprimida, probablemente por carecer de HLA-DR3 como ocurre en la lepra lepromatosa, y 3) aquellos que responden en forma específica a algunas tuberculinas y no a otras; estos serían los que proporcionan una mayor información sobre las micobacterias presentes en ese ambiente.

Se ha intentado fabricar tuberculinas más específicas que el PPD con la obtención de sonicados de micobacterias, a través de la desintegración ultrasónica de cultivos en fase de crecimiento exponencial, lo que permite fraccionar los componentes bacilares sin desnaturalizar sus proteínas. Con estas nuevas tuberculinas, se ha podido establecer que la reacción dérmica a los antígenos micobacterianos comprende por lo menos dos respuestas inmunológicas diferentes, una "tipo Listeria", que sería, de carácter protector, y otra "tipo fenómeno de Koch" que explicaría la necrosis y las manifestaciones de hipersensibilidad de la tuberculosis.

### **III. ANTECEDENTES.**

Hoy en día, el cultivo específico para *M. tuberculosis* permanece como el método estándar para el diagnóstico de la infección, sin embargo se trata de una técnica dispendiosa en términos de tiempo (para obtener resultados se requiere de cuatro a seis semanas). Así las decisiones terapéuticas siempre urgentes frente a una infección que amenaza la vida del paciente, pueden ser inaceptablemente postergadas, mientras se aguarda el reporte de un cultivo.

Hasta ahora la única prueba rápida para detectar la micobacteria es la identificación directa de bacilos ácido-alcohol resistentes, en extendidos de diversas secreciones corporales. Como método único de diagnóstico paraclínico, la baciloscopia no posee un perfil satisfactorio de sensibilidad y especificidad, sobre todo en los casos de infecciones no cavitantes esto principalmente se debe a que a todo sintomático respiratorio debe practicarse la baciloscopia seriada de esputo, la cual será positiva cuando existan al menos 10.000 microorganismos por cada mililitro de esputo. Para corregir esta situación, en los últimos años varios investigadores han orientado sus esfuerzos a diseñar nuevas pruebas diagnósticas y a mejorar el rendimiento de los métodos serológicos.

Más del 90% de las tuberculosis pulmonares se diagnostican con el examen de esputo; en la primera baciloscopia resultan positivos el 80% de los casos, 15% más en la segunda muestra, un poco menos de 5% en la tercera y en menos del 2% de los casos una cuarta o quinta muestra resulta positiva.

En un estudio realizado se determinó la especificidad y sensibilidad de distintos métodos de diagnóstico para tuberculosis y se encontró que la especificidad del 100% en todos los métodos ensayados, y la sensibilidad fue del 100% para el cultivo, 94,1% para el método de Gen-Probe, 88,2% para el de Amplicor y del 64,7% para la baciloscopia **(30)**.

En el campo del diagnóstico serológico de tuberculosis se están realizando actualmente muchos estudios para determinar la posibilidad de coadyuvar con el

mismo por medio de la determinación de anticuerpos contra la bacteria, uno de los principales problemas en éste tipo de diagnóstico es la sensibilización del individuo con otras especies de micobacterias no-tuberculosas o por la previa vacunación de los mismos con BCG produciéndose una respuesta inmune tanto a BCG como a derivados como la tuberculina, es por ésta razón que se trata de investigar e identificar regiones en el genoma de *Mycobacterium tuberculosis* que no estén presentes en BCG y en otras micobacterias que no producen tuberculosis.

La respuesta de anticuerpos es dirigida contra una gran gama de antígenos y la respuesta inmune varía entre diferentes individuos es por esto que la sensibilidad de ensayos serológicos ha sido desalentante muchas veces. Sin embargo como *M. tuberculosis* es un patógeno intracelular la cuantificación de células T en pacientes ya sea expuestos o sensibilizados por antígenos específicos de *M. tuberculosis* brinda una alternativa de diagnóstico que viene a ser el principio del test de tuberculina.

La tuberculina o PPD se utiliza hace 50 años para apoyar el diagnóstico clínico, la gran desventaja de la PPD es que muchos de sus componentes son compartidos entre diferentes especies de micobacterias lo que le disminuye la especificidad por que individuos sensibilizados o expuestos a otras micobacterias no relacionadas con tuberculosis responden inmunológicamente a PPD en algunos casos mejor que los infectados, es por esto que en medios como el nuestro, que son regiones endémicas de tuberculosis esta prueba no se utiliza mas que para determinar o establecer competencia inmunológica.

La respuesta in vivo (skin test) o in vitro (sangre) depende de la elaboración de citoquinas inflamatorias producidas por células T previamente sensibilizadas, ésta es una respuesta de tipo hipersensibilidad retardada. Es por ésta razón que también se han empleado métodos de diagnóstico basados en la determinación de INF- $\gamma$  que se produce por células mononucleares en respuesta a la presencia de éstos antígenos y se puede cuantificar por métodos como ELISA.

PPD se prepara de la precipitación de proteínas a partir de cultivos de *M. tuberculosis* atenuados por calor resultando una mezcla de complejos de

antígenos que están pobremente definidos y contienen muchas proteínas individuales en varios estadíos de desnaturalización.

Von Reyn y col. Diferencian ésta técnica utilizando M. tuberculosis PPD y PPD de otras bacterias atípicas y encontraron que de ésta forma ellos podrían discriminar pacientes con tuberculosis de aquellos infectados con M. avium.

De igual forma se empleó PPD tanto de M. tuberculosis como de M. bovis para producir una respuesta inmune y la sensibilización de linfocitos y la consecuente producción de INF- $\gamma$  logrando la misma diferenciación **(31)**.

Se puede considerar en éstos estudios que la falla de los test en sangre para el diagnóstico de tuberculosis es por la falta de antígenos definidos para cada especie.

Para identificar moléculas simples del complejo tuberculosis que discriminen entre M. tuberculosis y M. bovis (BCG) se han purificado antígenos o se realizó mediante el uso de anticuerpos monoclonales.

La primera evidencia de la existencia de antígenos específicos de complejo tuberculosis se planteó por Harboc y col. quienes detectaron el antígeno MPB64 (24 KDa) o también MPT 64 tanto en M. tuberculosis como en M. bovis pero no en BCG lo cual fue mas tarde confirmado con el uso de PCR.

Recientemente el antígeno de menor peso molecular ESAT-6 se identificó a partir de filtrados de cultivos en pacientes infectados por M. tuberculosis. Otro gen fue clonado a partir de la región promotora de ESAT-6 y es el CFP-10 con igual distribución que ESAT-6 **(32)**.

En 1996 Stover y col. Definieron regiones de diferencia (RD) estrechas en el genoma de M. bovis que se suprimían durante el pasaje in Vitro de BCG, tales regiones son llamadas, RD-1, RD-2 y RD-3 y los genes para ESAT-6, CFP-10 y MPT-64 (en adición a un número de nuevos antígenos de potencial interés) se encuentran en éstas regiones suprimidas.

Nuevos estudios que emplearon librerías genómicas identificaron por lo menos 8 regiones mas que serían suprimidas en BCG, estas regiones rodean mas de 90 marcos de lectura abierta. Es así que muchas proteínas podrían tener la habilidad de discriminar entre BCG y M. tuberculosis.

Entre otros estudios realizados en la búsqueda de mejoras en el diagnóstico por técnicas de ensayo inmunoabsorbente enzimático fueron cuantificados los títulos de IgA anti P-90, encontrándose cifras significativamente mayores entre los pacientes con tuberculosis pulmonar, comparados con los demás grupos de estudio. El análisis estadístico demostró que la prueba serológica ofrece una sensibilidad de 71% y una especificidad de 92%, por lo que constituye una herramienta útil y rápida para diagnosticar -al menos presuntivamente- tuberculosis pulmonar **(33)**. El diagnóstico serológico de tuberculosis está siendo motivo de muchas investigaciones por el hecho de que podría coadyuvar junto con otras pruebas en el diagnóstico de ésta enfermedad, en nuestro país es muy necesario, por la incidencia de la tuberculosis, contar con un apoyo en el diagnóstico rápido de tuberculosis, es en este sentido que se realizan investigaciones en éste campo, se estudió por ejemplo la posibilidad de un diagnóstico serológico mediante el método de inmunodott y la estandarización del mismo utilizando BCG como antígeno **(34)**.

Posteriores estudios en el tema plantearon la posibilidad de implementar un método de cuantificación de datos obtenidos en la prueba de inmunodott por densitometría, los que mostraron una eficacia del 100% pero que requiere continuar en estudio **(35)**.

Investigaciones efectuadas en Perú evaluaron la prueba serodiagnóstica de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA) empleando el Derivado Proteico Purificado (PPD) como antígeno en el diagnóstico de la tuberculosis bovina, con la finalidad de adecuarlo en la detección rápida de la infección. Se determinó la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo de la prueba, en la detección de la tuberculosis clínica y subclínica. La evaluación se efectuó utilizando 103 sueros de animales negativos y 53 positivos a la enfermedad. De los sueros controles positivos, la prueba de ELISA mostró una sensibilidad del  $69.81 \pm 12.36\%$  y una especificidad del  $71.84 \pm 8.69\%$ . De los 66 sueros diagnosticados como positivos por la prueba de ELISA, un valor predictivo positivo de  $56.06 \pm 11.97\%$  y un valor predictivo negativo del  $82.22 \pm 7.90\%$  **(36)**.

Otras observaciones indican que existe una importante respuesta humoral de tipo Ig G mediante ELISA contra los antígenos de la pared de *M. Tuberculosis* 2,3 diacil trealosa (DAT) y el glycolipido Tb1 (PGLTb1), existen varios estudios sobre antígenos purificados de la pared de *M. Tuberculosis* también en busca de un mejor diagnóstico serológico para ésta enfermedad **(37)**.

La detección de anticuerpos de tipo Ig A contra el antígeno A60 de *M. Tuberculosis* es uno de los métodos mas estudiados en la actualidad además de ser uno de los mas investigados en muchas partes del mundo como lo prueban estudios realizados por científicos en Italia **(38)**.

Otro punto muy importante es que en diferentes cepas de *M. tuberculosis* en la última década se ha revelado la existencia de una gran diversidad genética prevaleciendo también genotipos conservados en lugares con mayor incidencia de tuberculosis. Esto posiblemente se relacione con ventajas selectivas para evitar los mecanismos de defensa del huésped por esta razón se ha investigado la influencia de las diferentes cepas en el transcurso de la enfermedad.

D. López, Van Soolingen y col. Realizaron un estudio al respecto en el cual se emplearon ratones BALB/c previamente vacunados que fueron inoculados con cepas diferentes de *M. tuberculosis* entre las que se encuentran Beijing, Canetti y H37Rv lo observado después de la inoculación fue una importante diferencia en lo que a respuesta inmune y patología se refiere, en el caso de la respuesta inmune fueron observadas diferentes cantidades de TNF- $\alpha$  producidas así como la etapa y el tiempo que este se mantenía elevado en cuanto a patología se pudo observar neumonía en todos los casos pero diferente magnitud de acuerdo a la cepa observándose por tanto una diferencia marcada en la mortalidad.

Un importante punto al respecto es que la vacunación previa con BCG fue menos efectiva contra la infección con cepas Beijing y cepas H37Rv. En conclusión las diferencias genéticas entre cepas de *M. tuberculosis* muestran diferencias marcadas en eventos inmunopatológicos.

Hasta 1990 se creía que el complejo *M. tuberculosis* se constituía por un genotipo altamente conservado y con limitadas diferencias fenotípicas que influyeran en la patogénesis. En el estudio mencionado se describe el curso de la infección en términos de supervivencia, carga bacilar pulmonar, patología y respuesta inmune y diferencia entre cepas representadas por familias destacadas de genotipos de *M. tuberculosis* definidas sobre la base de secuencias de inserción IS6110 y RFLP.

En Julio del 2000 K.M. Samanich y col. publicaron un trabajo en el cual se menciona que en pacientes con tuberculosis pulmonar el perfil de antígenos y de repuesta humoral cambia según el curso de la enfermedad **(39)**.

Para la evaluación de nuevas vacunas para tuberculosis son necesarias herramientas de diagnóstico que permitan distinguir entre personas no infectadas, infectadas no sintomáticas o personas con tuberculosis activa, algunas de las limitaciones de los métodos de diagnóstico actual reflejan la diversidad de reconocimiento de los antígenos de *M. tuberculosis* causadas por las diferencias inmunogenéticas en pacientes diferentes y la desigualdad del reconocimiento del antígeno. Los ensayos que utilicen “cocteles” de antígenos, serán por lo tanto mas efectivos al cubrir la diversidad de la respuesta inmune en dichos pacientes.

En el caso del uso de tuberculina por ejemplo ya se había mencionado que existe la posibilidad de interpretar un test positivo por el solo hecho de que el individuo ya haya sido vacunado, por lo tanto es importante seguir diferentes procedimientos para el desarrollo de nuevas técnicas que ayuden al diagnóstico de la tuberculosis, por ejemplo los antígenos de *M. tuberculosis* que producen un tipo de respuesta de hipersensibilidad retardada deben ser identificados y también debe formularse “cocteles” de múltiples antígenos como reactivos. Esta necesidad surgió de la observación de que un solo antígeno específico de especie como el MPT64 fracasa en inducir una respuesta de hipersensibilidad retardada en la mayoría de los sujetos PPD (+).

A diferencia de proteínas solas, las fórmulas de múltiples antígenos presumiblemente reclutarán muchas células T específicas al sitio de inyección del antígeno.

Además numerosos antígenos podrían ser requeridos para cubrir los problemas relacionados con la restricción genética de reconocimiento del antígeno, fenómeno que se ve en muchos individuos que reaccionan a ciertos antígenos y no a otros.

Se compararon respuestas de tipo humoral en individuos frente a varios antígenos, por ejemplo MPT63, MPT64, MTC28, MPT70 de *M. tuberculosis* viendo una marcada diferencia de respuesta hacia dos antígenos juntos frente a los mismos por separado (40). En éste mismo estudio se observó también que frente a otro tipo de antígenos de *M. bovis* se producían muchas reacciones cruzadas.

En 1898 ya se reconoció que en el transcurso de la enfermedad la respuesta de anticuerpos es muy fuerte lo que apoya las investigaciones en éste campo además de que los métodos serológicos pueden ser simples, rápidos y de bajo costo.

A partir de estos estudios se fue conociendo mas la respuesta humoral frente a *M. tuberculosis* y se vio que tal respuesta es casi de tipo universal siendo que aproximadamente un 90% de los pacientes con tuberculosis producen anticuerpos de tipo Ig G. Además el reconocimiento de antígenos en pacientes con tuberculosis es altamente heterogéneo ya que no es un solo antígeno o un solo grupo de antígenos reconocidos por anticuerpos del suero en todos (o casi todos) los pacientes. Estos hallazgos indican que el pobre uso de ensayos con antígenos solos no reflejan una falla en la respuesta de anticuerpos sino una falta de reactivos para medir ésta respuesta en términos de especificidad.

La técnica de ELISA tiene limitaciones en el uso de cocteles de antígenos múltiples por lo que se evaluó la alternativa de utilizar ensayos en fase sólida y membranas de nitrocelulosa que tienen mayor capacidad de captar proteínas.

En el campo de la biología molecular se han desarrollado técnicas para el estudio epidemiológico de la tuberculosis que dan una idea a nivel genético, de las variaciones que pueden encontrarse entre distintas cepas dentro de un mismo complejo e incluso entre diferentes complejos de micobacterias como son, por ejemplo, *M. tuberculosis* y *M. bovis* en la actualidad el método mas utilizado para la diferenciación de cepas de *M. tuberculosis* fue estandarizado por Van Embden



y col. que consiste en la determinación del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) que se obtienen tras la hibridación utilizando la secuencia de inserción IS6110 como sonda, en 1995 Riley diseñó dos juegos de primers que actúan justo en los extremos terminales de dos elementos repetitivos (IS6110 y PGRS, regiones polimórficas ricas en C y G), los productos de PCR que se generen serán los comprendidos entre un elemento repetitivo y el siguiente, lo que permite obtener diferencias en el número y tamaño de fragmentos de DNA amplificado (DRE-PCR). Un rasgo fenotípico que muestra gran promesa como un indicador de clonalidad en *M. tuberculosis* es la diversidad en el número de copias y localización genómica de una secuencia de DNA que explota la diversidad que generan los patrones específicos de las cepas existiendo una gran variabilidad fenotípica entre las mismas que posee implicaciones profundas en la resistencia a drogas y en salud pública. Los elementos repetitivos y secuencias de inserción son frecuentemente utilizados como secuencias blanco para la diferenciación entre cepas bacterianas. Se han caracterizado varios de estos elementos en el complejo *M. tuberculosis* y en algunas especies adicionales de micobacterias como por ejemplo se halló la secuencia IS6110 en un número de 0-20 copias en el complejo *M. tuberculosis* solamente, en cambio las secuencias IS 986, IS 987 se hallaron en un número de 0-20 copias polimórficas para *M. bovis* y de 1-2 copias en *M. bovis*-BCG no polimórficas **(41)** lo que nos hace pensar en las diferencias a nivel genético entre *M. tuberculosis* y entre *M. bovis*-BCG y la propia cepa de *M. bovis* y por que no, a nivel de antígenos expresados en la membrana de tales cepas.

Entre *M. bovis*, BCG y *M. tuberculosis* se pueden observar ciertas diferencias fenotípicas en cuanto a la forma de las colonias que en el caso de *M. bovis* es lisa y para BCG ya son colonias rugosas igual que para *M. tuberculosis*, asimismo se notan diferencias en el aspecto funcional bioquímico como la reducción de nitrato que es negativa para *M. bovis* y BCG y positiva en *M. tuberculosis*, en relación a sus reacciones de sensibilidad y resistencia a pirazinamida *M. Boris* y BCG presentan resistencia a la misma y *M. tuberculosis* es sensible tales características secundarias a una mutación relacionada con la activación de la

enzima tiopen-2-carboxilohidrazida (TCH), esto nos muestra que existen diferencias en la codificación de ciertas proteínas y que ésta obviamente influye en las características fenotípicas de ambas micobacterias.

BCG deriva de una cepa virulenta de *M. bovis* aislada por 230 pasajes seriados en un caldo que contiene glicerol, extracto de papas y sales biliares (Calmette, 1927). Durante el curso de estos pasajes la cepa de *M. bovis* progresivamente pierde su virulencia mostrando ser inocuo y protectorio.

El proceso de atenuación de BCG probablemente involucra una pérdida en serie del material genético haciendo que la reversión de la virulencia sea imposible.

*Mycobacterium* es abundante en tierra y agua así que probablemente surja como resultado de un cambio en el nicho ecológico y que culmine en patogenicidad para animales y mamíferos. Se cree que *M. tuberculosis* se adquiere al ganado bovino luego de la domesticación del mismo cuando el estilo de vida de cazadores se reemplaza por agricultura y como consecuencia es muy aceptado que *M. bovis* es ancestro de *M. tuberculosis* (Haas y Hass, 1996).

Musser y col. Examinaron el complejo por secuenciación y tipificación de múltiples loci y hallaron secuencias genéticas altamente conservadas.

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

M. tuberculosis afecta aproximadamente a la tercera parte de la población mundial y mata unos 3 millones de personas cada año, lo que convierte a este bacilo en la causa infecciosa de muerte mas importante del mundo.

Al ser la tuberculosis una enfermedad de tipo social que afecta principalmente a personas de bajos recursos económicos, es imperioso buscar métodos de diagnostico mas adecuados, seguros, rápidos, eficaces y en lo posible económicos para poder coadyuvar con la tarea de asegurar una mejor atención del paciente enfermo con tuberculosis.

Se debe considerar también que en algunas ocasiones la baciloscopía e incluso la radiografía de tórax pueden confundir al médico ya que los síntomas podrían o no estar presentes, la baciloscopía podría resultar negativa siendo positiva y la radiografía con indicios de enfermedad pulmonar podría deberse no solo a tuberculosis sino a otras muchas enfermedades respiratorias, es por eso que no se debe descartar un exámen serológico que coadyuve en esta tarea.

Debido a esto surge la necesidad de un método de diagnostico con la suficiente sensibilidad y especificidad que sea de real apoyo al diagnóstico y que además se encuentre económicamente al alcance de los pacientes que lo necesitan.

Lo que se pretende investigar es si existen diferencias en la respuesta humoral frente a cepas de M. Tuberculosis y M. bovis y si éstas mismas podrían aumentar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico con relación a M. bovis por ser principalmente M. Tuberculosis la especie que infecta al ser humano.

Lo cual lleva a la pregunta ¿Existirán diferencias en la respuesta humoral frente a M. tuberculosis y BCG que puedan ser determinadas mediante la técnica de inmunodott?

## **V. JUSTIFICACION.**

El diagnóstico convencional de tuberculosis por baciloscopía es un método que a pesar de ser muy utilizado necesita un apoyo confirmatorio que es el cultivo pero éste toma demasiado tiempo en ser realizado siendo muy poco conveniente para el paciente. Existen por otro lado métodos muy sensibles como es el caso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pero con el agravante del costo que es un punto muy importante debido a que la tuberculosis es una enfermedad crónica transmisible que afecta especialmente a personas de bajos recursos económicos además de tratarse de una enfermedad endémica.

El estudio comparativo de la respuesta humoral frente a diferentes cepas de *M. Tuberculosis* y *M. bovis* en un futuro podría dar lugar, a posibles alternativas de diagnóstico serológico para tuberculosis, siendo estas muy importantes debido a la repercusión de dicha enfermedad en nuestra sociedad.

Un diagnóstico rápido es muy importante para el paciente que en nuestro medio acude a consulta debido a que se encuentra mal y para el momento en que los síntomas aparecen la enfermedad puede estarle causando mucho daño y si se la detecta gracias a los síntomas que presenta el paciente y un método serológico que no toma más de 1 hora en ser realizado en lugar de recurrir solamente a métodos convencionales que demoran mucho o que no son lo suficientemente confiables se puede iniciar casi de inmediato un esquema de tratamiento para ese paciente.

El presente estudio podría contribuir a la población afectada (Bolivia) así como al equipo de salud en el sentido de mejorar la calidad de diagnóstico en relación al tiempo, sensibilidad y especificidad.

De los resultados de este estudio se podrá obtener conocimiento acerca de las diferencias que existen entre distintas cepas de *M. Tuberculosis* en función a la respuesta que inducen lo cual tendría relación con la patogenicidad de las mismas lo que constituye un punto muy importante por los antecedentes epidemiológicos en nuestro país.

## **VI. OBJETIVOS.**

### **VI.A. OBJETIVO GENERAL.**

Realizar una comparación de la respuesta humoral frente a una cepa caracterizada de *M. tuberculosis* y *M. bovis* (BCG) mediante el método de inmunodott aplicado a pacientes del Hospital de Chulumani y del Hospital Luis Uría el año 2003.

### **VI.B. OBJETIVOS ESPECIFICOS.**

VI.B.1. Detectar la presencia de anticuerpos en el suero de pacientes internados en el Hospital Luis Uría y en el Hospital de Chulumani frente a *Mycobacterium bovis* (BCG) por el método de inmunodott.

VI.B.2. Detectar la presencia de anticuerpos en el suero de pacientes internados en el Hospital Luis Uría y en el Hospital de Chulumani frente a *Mycobacterium tuberculosis* por el método de inmunodott.

VI.B.3. Comparar la presencia de anticuerpos frente a ambas especies.

VI.B.4. Correlacionar los resultados, en ambos casos, con la situación clínica del paciente.

## **VII. HIPOTESIS.**

***H1.*** Existe diferencia de la respuesta humoral frente a *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* (BCG).

***Ho.*** No existe diferencia de la respuesta humoral frente a *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* (BCG).

## **VIII. DISEÑO DE LA INVESTIGACION.**

### ***VIII.A. Tipo de estudio.***

El estudio fue del tipo test diagnóstico realizado con pacientes tuberculosos, sintomáticos respiratorios y pacientes sin tuberculosis.

El diagnóstico clínico de TB se estableció usando criterios determinados por expertos en diagnóstico y tratamiento de TB en base a la clínica del paciente así como baciloscopía, cultivo y radiografía de tórax, siendo todo este conjunto el mejor patrón (**gold estándar**) frente al cual se comparó el método serológico inmunodott BCG e inmunodott M. tb.

### ***VIII.B. Población.***

En la presente investigación se trabajó con muestras de pacientes con tuberculosis, sintomáticos respiratorios y con pacientes sin tuberculosis.

Los criterios de inclusión para los pacientes con tuberculosis fueron: la clínica compatible con la enfermedad junto a una prueba de diagnóstico como la baciloscopía o radiografía de tórax y el hecho de que el paciente se encuentre ya bajo tratamiento de la enfermedad, cumplieron con estos criterios 18 pacientes internados en ambos hospitales.

El criterio básico para los pacientes sintomáticos respiratorios fue la clínica del paciente que incluye los síntomas típicos de la enfermedad. Con este criterio cumplieron 12 pacientes.

Los pacientes negativos para tuberculosis fueron incluidos por la ausencia total de síntomas, o de clínica compatible con la enfermedad, fueron 5 pacientes.

### ***VIII.C. Lugar de la investigación.***

El instituto SELADIS (Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud) fue el lugar donde se realizó la investigación, este instituto tiene como objeto principal prestar servicios de diagnóstico así como también generar investigación en sus diferentes áreas.

### ***VIII.D. Material y métodos.***

#### ***VIII.D.1. Recolección de muestra.***

Se extrajeron 5 mL de sangre periférica de pacientes de la Unidad de Neumología del Hospital Luis Uria de la Oliva y del Hospital de Chulumani del departamento de La Paz, y se realizó posteriormente una encuesta. (ANEXO 1).

Se obtuvieron 31 muestras de pacientes con tuberculosis diagnosticada en cualquiera de sus fases, algunos con tratamiento y otros sintomáticos respiratorios, estratificando la población durante el análisis de los resultados, también se incluyen en este estudio 5 muestras negativas, es decir, pacientes supuestamente sanos.

Se obtuvieron en el Hospital de Chulumani 3 muestras de esputo y 1 cepa caracterizada y proporcionada por el instituto SELADIS, que fueron sembradas en medios Middlebrook y Lowenstein Jensen para hacer una selección y emplearlas como antígeno.

#### ***VIII.D.2. Cultivo y Determinación de las cepas a ser utilizadas como antígeno.***

##### ***VIII.D.2.A. Descontaminación de las muestras de esputo.***

Antes de sembrar las muestras de esputo obtenidas en el hospital de Chulumani fueron descontaminadas utilizando 1 mL. de la muestra + 1 mL de NaOH al 4 % a



37 C con agitación mecánica de 20 minutos y centrifugadas por 15 minutos a 2000-3000 rpm. Luego de decantar el sobrenadante se añadió HCl 2 N y azul de bromotimol y se observó el cambio de pH por el viraje de color del indicador estando así la muestra ya lista para sembrar.

#### ***VIII.D.2.B. Medios de cultivo.***

El cultivo se realizó en los medios Lowenstein Jensen y Middlebrook del cual se disponía solamente del agar pero se suplementó con glicerol, albúmina fracción V (0,5 g/10 mL), dextrosa (0,2 g/10 mL) y NaCl p.a. 0,085 g/10 mL) según el protocolo del Manual DIFCO para preparación de medios y reactivos 10 ed.

#### ***VIII.D.2.C. Desarrollo de las cepas.***

Posteriormente se procedió a la revisión de los cultivos que solo en el medio Lowenstein Jensen dieron un crecimiento notable de colonias y no así en el medio Middlebrook debido a la falta de disponibilidad de nutrientes. Por ésta razón se utilizaron estos cultivos para la determinación de las cepas y para la obtención del antígeno.

#### ***VIII.D.2.D. Antígenos empleados.***

Los antígenos a emplear son:

- BCG en forma de vacuna liofilizada.
- M. tuberculosis cepa circulante atenuada en laboratorio por radiación ultravioleta.

En el caso de la cepa circulante de *M. tuberculosis* se realizó la atenuación partiendo del cultivo realizado para lo cual en primera instancia homogenizando a las bacterias en PBS celular o en solución fisiológica empleando perlas de vidrio debido a que ésta bacteria muestra cierta resistencia a separarse en medio acuosos por la presencia del conocido factor cordón y su carácter hidrofóbico.

Se tituló el antígeno diluyendo 1/5, 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000 con el fin de tener una concentración de bacterias similar a la del antígeno que es empleado actualmente en la técnica ya estandarizada de inmunodott que es BCG liofilizado esto fue determinado mediante la escala de Mcfarland la cual fue de 0.5 para ambos antígenos que corresponde a  $1 \times 10^6$  bacterias por mL.

En última instancia se procedió a inactivarlas por medio de radiación ultravioleta empleando 17 watts de la misma durante un periodo de 20 minutos (42).

#### ***VIII.D.2.E. Titulación del conjugado.***

El conjugado empleado en la técnica fue proteína A-oro coloidal, esta proteína tiene la capacidad de interactuar con Fc de la IgG y al estar unida a oro coloidal permite visualizar la reacción sobre el papel de nitrocelulosa, la intensidad dependerá de la cantidad del complejo antígeno anticuerpo presente así que es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en la muestra. Previa la realización de la técnica se realizó una titulación del conjugado frente empleando BCG como antígeno y controles positivo y negativo realizando diluciones del conjugado de  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$  y el conjugado sin diluir y se obtuvo el mejor resultado con el conjugado sin diluir, de manera que es éste el que se empleó en la técnica.

#### ***VIII.D.2.F. Procesamiento de la muestra.***

- Se utilizó el método de inmunodott siendo los antígenos BCG, y la cepa circulante preparadas como se mencionó anteriormente y resuspendidas en solución fisiológica.
- La técnica de inmunodott requiere simplemente una base de papel de nitrocelulosa donde se fijó el antígeno y posteriormente se inocularon 10 uL de la muestra de manera que exista una reacción antígeno – anticuerpo que se hace posteriormente visible por medio del conjugado previamente titulado que le proporciona color de manera muy similar a lo que ocurre en un test de ELISA, según la cantidad de anticuerpo presente en la muestra (**ANEXO 2**).
- Este método se aplicó en todas las muestras recolectadas en los hospitales.

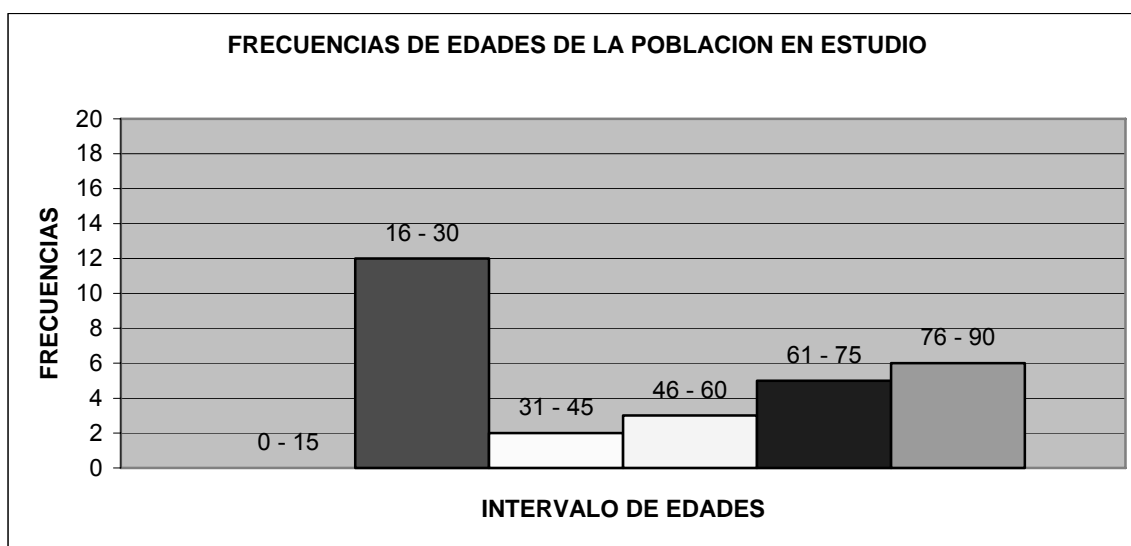
#### ***VIII.D.2.G. Correlación de resultados.***

Se realizó la correlación entre las pruebas y la historia clínica y se determinó la relación de la respuesta inmune de estos pacientes frente a los dos antígenos y frente a un diagnóstico convencional de tuberculosis determinado por un gold estándar que es un conjunto de pruebas o criterios que hasta el momento son considerados como lo mejor para el diagnóstico de la enfermedad, para tuberculosis, éstos síntomas son: tos productiva mayor a dos semanas de duración, expectoración, fiebre, pérdida de peso, hemoptisis y pruebas como baciloscopía, radiografía de tórax y cultivo, estando ya todo esto incluido en cada una de las encuestas que provienen de las historias clínicas de cada uno de los pacientes.

## **IX. RESULTADOS.**

Los resultados obtenidos durante la realización del presente trabajo se encuentran en el **ANEXO 3** donde se hallan fotografiadas las pruebas realizadas con ambos antígenos BCG y M. tuberculosis.

Se tomó un grupo de pacientes comprendidos entre los 16 y 90 años de edad y se pudo observar que la frecuencia de la enfermedad es mayor en el rango de edades comprendido entre los 16 y 30 años que desciende entre los 31 y 60 y que se incrementa nuevamente entre 76 y 90 años como puede apreciarse en el **GRAFICO 1** y cuyos datos se encuentran especificados en el **ANEXO 4**.



*Gráfico 1. Frecuencia de edades de la población en estudio*

### ***IX.1.a. Relación diagnóstico GOLD ESTÁNDAR y resultado de las pruebas con antígeno BCG y antígeno M. tuberculosis.***

Cuando se utiliza diseño de comparación entre dos antígenos se debe considerar la sensibilidad y especificidad y otros parámetros como valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de cada una de estas variables.

Las muestras fueron evaluadas por el test serológico inmunodott utilizando tanto BCG como M. tuberculosis como antígenos. Los resultados se muestran en las **TABLAS 4 y 5**.

#### DIAGNOSTICO (gold estándar)

Inmunodott BCG	Negativo %	Sintomático %	Tuberculosis %	Total %
<b>Negativo</b>	16,7	16,7	66,7	100
<b>1/10</b>	20	0	80	100
<b>1/100</b>	8,3	16,7	75	100
<b>1/1000</b>	0	20	80	100

*Tabla 4: Resultados de la prueba inmunodott con antígeno BCG en porcentajes en relación al gold estándar*

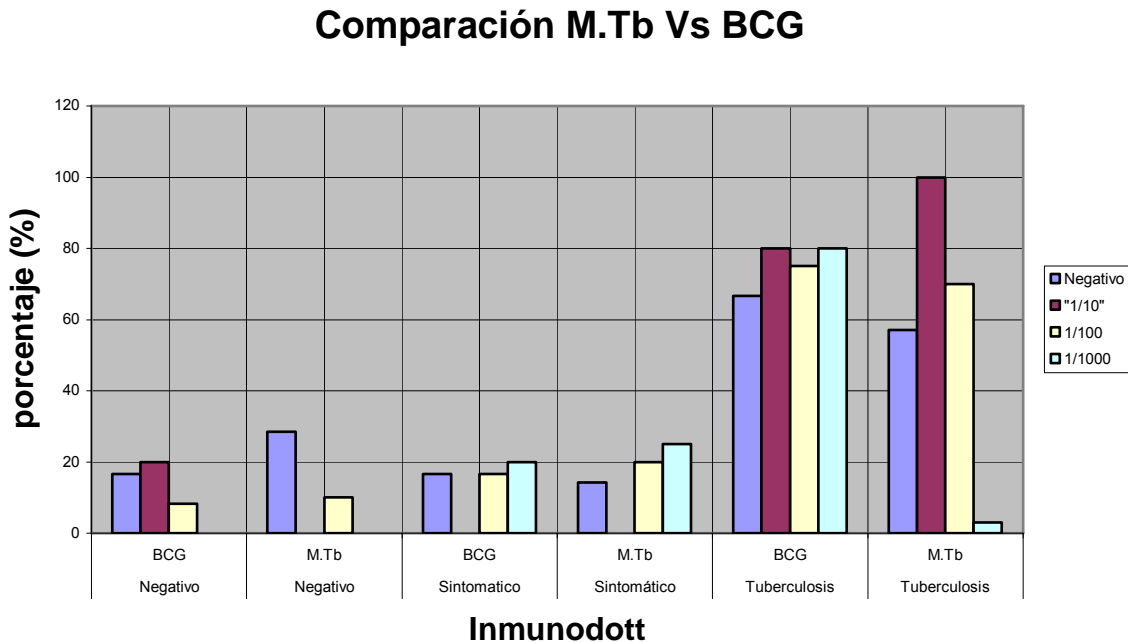
#### DIAGNOSTICO (gold estándar)

Inmunodott M.Tb	Negativo %	Sintomático %	Tuberculosis %	Total %
<b>Negativo</b>	28,5	14,3	57,1	100
<b>1/10</b>	0	0	100	100
<b>1/100</b>	10	20	70	100
<b>1/1000</b>	0	25	75	100

*Tabla 5. Resultados de la prueba inmunodott con antígeno M. tuberculosis en porcentajes en relación al gold estándar*

*En éstas tablas se pueden observar los resultados del test inmunodott con el uso de antígeno M. tuberculosis y BCG en comparación al gold estándar en pacientes aparentemente sanos, sintomáticos y pacientes con tuberculosis.*

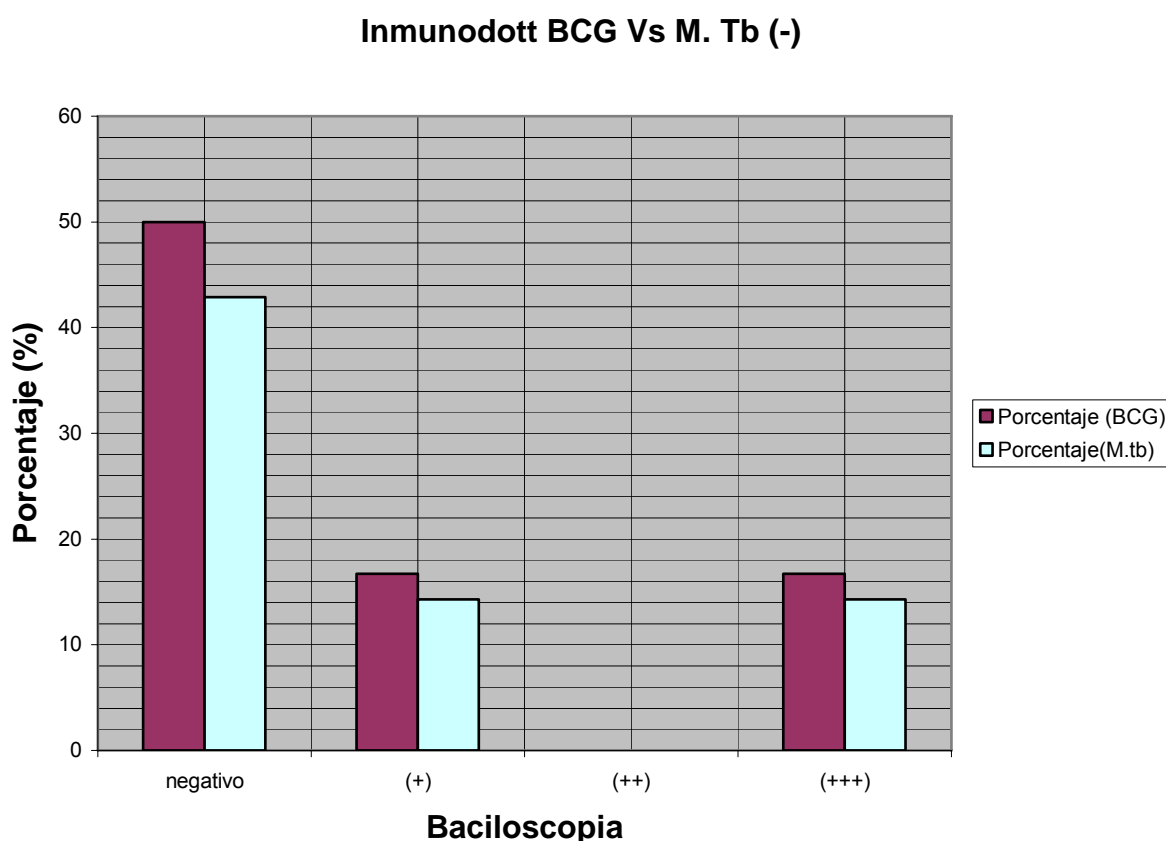
Las mismas tablas se pueden observar en el **GRAFICO 2.**



**Gráfico 2.** Comparación de resultados de la prueba inmunodott con antígenos BCG y *M. tuberculosis* en pacientes con tuberculosis, sintomáticos respiratorios y pacientes aparentemente sanos

**IX. 2.a. Relación pacientes con baciloscopia (+), (++) , (+++) y resultado de las pruebas con antígeno BCG y antígeno M. tuberculosis.**

Se estableció también una relación entre los pacientes con baciloscopia positiva y el test realizado con ambos antígenos para determinar la sensibilidad y especificidad respecto al resultado de la baciloscopia y se tienen los resultados que se muestran en el **GRAFICO 3**.



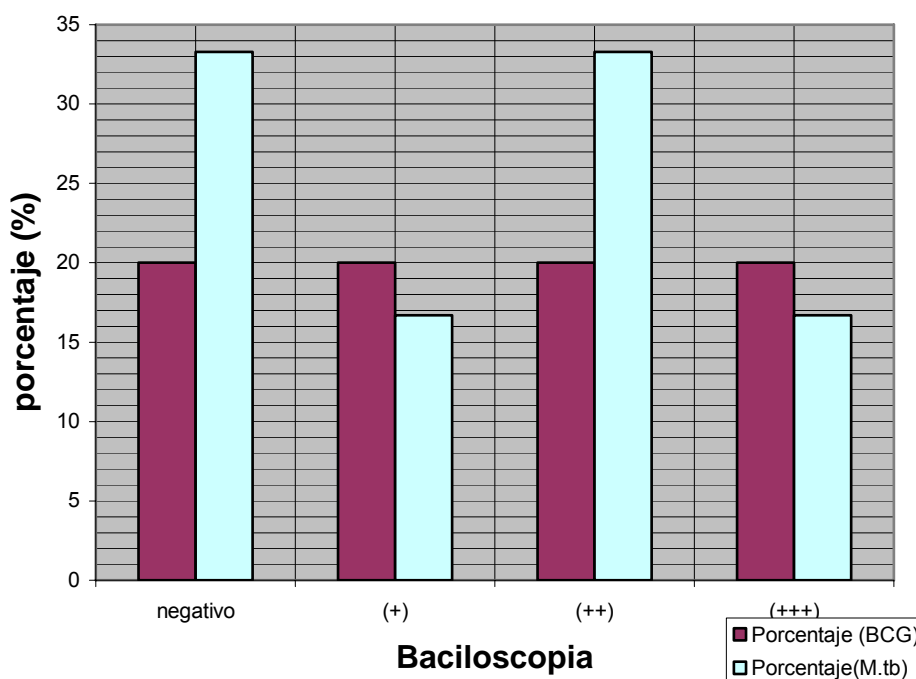
**Gráfico 3.** Comparación de resultados de la prueba inmunodott BCG (-) y M. tuberculosis (-) con baciloscopia

En el **GRAFICO 3** se ve una comparación entre las pruebas de inmunodott tanto con BCG como con M. tuberculosis que dieron negativas vs. la prueba de baciloscopia. Se puede observar un porcentaje de coincidencia de 50% entre

BCG (-) y baciloscopía negativa y un 42,9% de coincidencia de inmunodott M. tuberculosis (-) con baciloscopía negativa que se analizará mas adelante con un análisis de sensibilidad y especificidad. También se observó un cierto porcentaje de resultados negativos cuando la baciloscopía fue de + y de +++ en ambos casos lo que se puede observar en el **ANEXO 5**.

Respecto al inmunodott BCG y M. tuberculosis (-) se ve en el **GRAFICO 4** un porcentaje de coincidencia de 20% entre BCG 1/10 y baciloscopía + y un 16.7% de coincidencia de inmunodott M. tuberculosis 1/10 con baciloscopía +, esto se analizará mas adelante a través del calculo de sensibilidad y especificidad. También se observaron otros porcentajes de baciloscopía ++ y de +++ para los resultados de inmunodott 1/10 lo que se puede observar en el **ANEXO 6**.

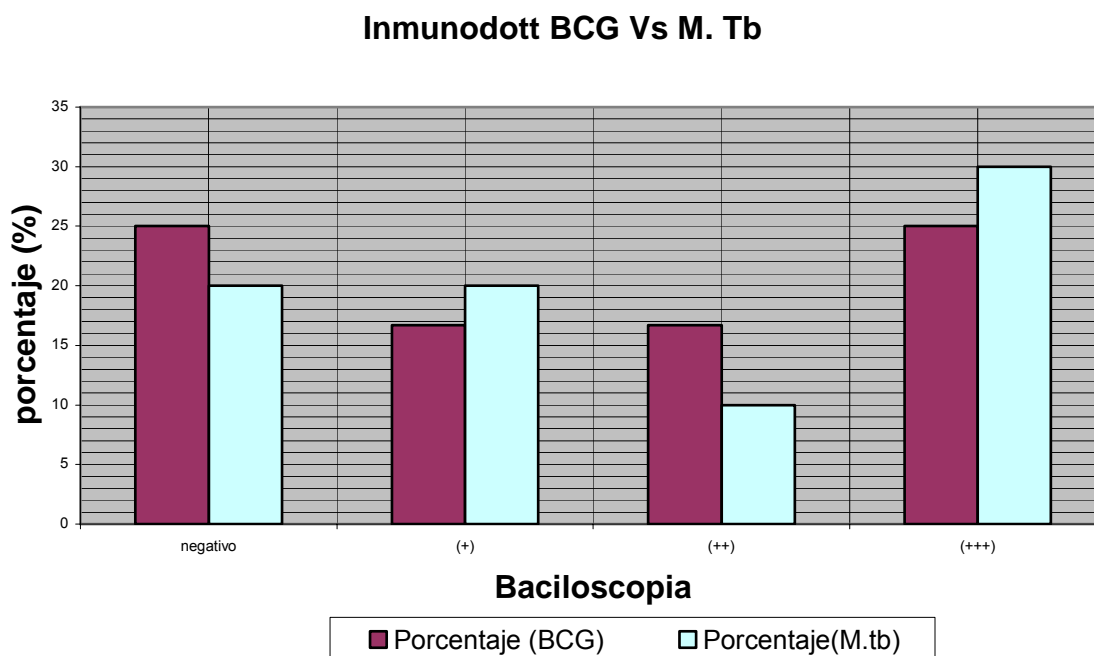
#### Inmunodott BCG Vs M. Tb ( 1/10)



**Gráfico 4.** Comparación de resultados de la prueba inmunodott BCG y M. tuberculosis 1/10 con baciloscopía

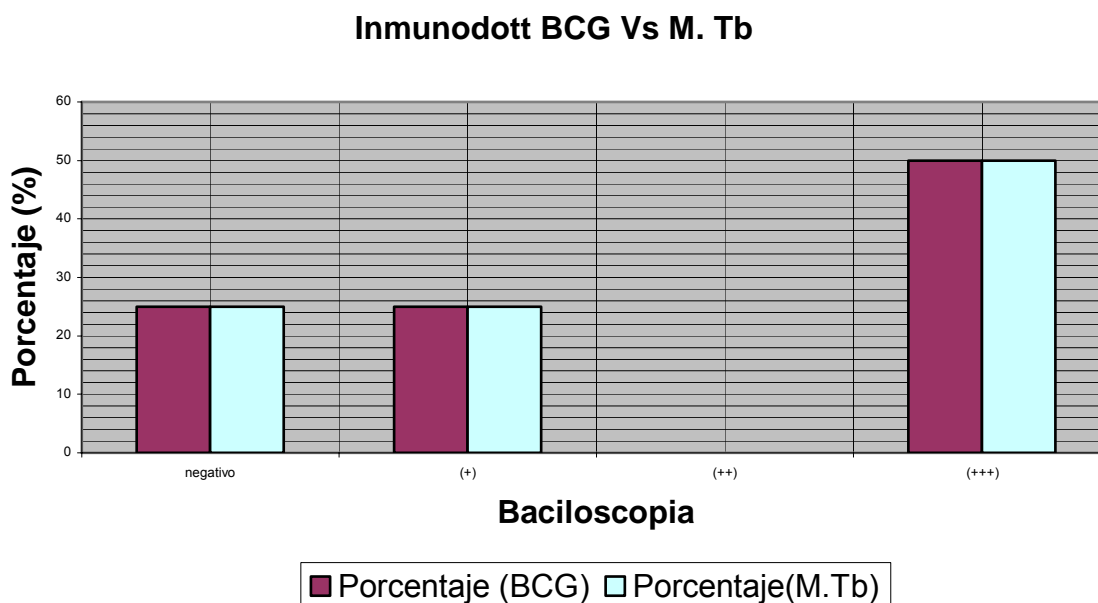


Respecto al inmunodott BCG y M. tuberculosis 1/100 se ve en el **GRAFICO 5** un porcentaje de coincidencia de resultados del 16.7% entre BCG 1/100 y baciloscopía ++ y un 10% de coincidencia de inmunodott M. tuberculosis 1/100 con baciloscopía ++ esto se analizará mas adelante a través del calculo de sensibilidad y especificidad. Se observaron otros porcentajes de baciloscopía + y de +++ para los resultados de inmunodott 1/100 que se encuentran en el **ANEXO 7**.



**Gráfico 5.** Comparación de resultados de la prueba inmunodott M. tuberculosis 1/100 con baciloscopía

Respecto al inmunodott BCG y M. tuberculosis 1/1000 se ve en el **GRAFICO 6** un porcentaje de coincidencia de 50% entre BCG 1/1000 y baciloscopía +++ y un 50% de coincidencia de inmunodott M. tuberculosis 1/1000 con baciloscopía +++ esto se analizará mas adelante a través del calculo de sensibilidad y especificidad. Se observaron otros porcentajes de baciloscopía + y de ++ para los resultados de inmunodott 1/100 los mismos que se hallan en el **ANEXO 8**.



*Gráfico 6. Comparación de resultados de la prueba inmunodott M. tuberculosis 1/1000 con baciloscopia*

***IX.3.a. Determinación de valores de Especificidad, Sensibilidad, Valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de inmunodott BCG y M. tuberculosis frente al gold estándar.***

Como fue mencionado anteriormente en este tipo de estudio se debe proceder a un análisis de sensibilidad y especificidad así como la determinación del valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo Negativo (VPN) para determinar la confiabilidad y validez del mismo.

Para esto se observa a continuación la **TABLA 6** que es un resumen de los valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN para inmunodott BCG e inmunodott M. tuberculosis frente a gold estándar. Los valores a partir de los cuales se obtuvo este resumen se hallan en el **ANEXO 14 y 15**.

Para determinar la sensibilidad y especificidad del test se tomó en cuenta la suma de los resultados positivos del inmunodott fueran estos 1/10, 1/100 o 1/1000.

<b>TEST</b>	<b>INMUNODOTT BCG</b>	<b>INMUNODOTT M. tb</b>
<b>SENSIBILIDAD</b>	83.9%	80.6%
<b>ESPECIFICIDAD</b>	50%	75%
<b>VALOR PREDICTIVO POSITIVO</b>	92.8%	96.2%
<b>VALOR PREDICTIVO NEGATIVO</b>	28.6%	33.3%

*Tabla 6. Especificidad y sensibilidad del test inmunodott con antígeno BCG y M. tuberculosis frente al gold estándar*

El cálculo de sensibilidad y especificidad (**ANEXO 9**) muestra que la sensibilidad es mayor cuando se trabaja con BCG como antígeno y la especificidad menor para BCG que cuando se emplea M. tuberculosis como antígeno.

El cálculo de valores predictivos positivo y negativo (**ANEXO 10**) muestran que el VPP y VPN son mayores cuando se trabaja con M. tuberculosis como antígeno.

**IX.3.b. Determinación de valores de Especificidad, Sensibilidad, Valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de inmunodott BCG y M. tuberculosis frente a baciloscopía.**

También se realizó un cálculo de estos valores en relación a la baciloscopía la importancia de éste cálculo radica en que muchas veces la baciloscopía es el único elemento confirmatorio de tuberculosis y lo que se hizo fue evaluar la prueba de inmunodott frente a tan importante parámetro (**TABLA 7**).

Los valores a partir de los cuales se obtuvo este resumen se hallan en el **ANEXO 16 y 17**.

<b>TEST</b>	<b>INMUNODOTT BCG</b>	<b>INMUNODOTT M. tb</b>
<b>SENSIBILIDAD</b>	84.2%	89.5%
<b>ESPECIFICIDAD</b>	36.4%	36.4%
<b>VALOR PREDICTIVO POSITIVO</b>	69.6%	70.8%
<b>VALOR PREDICTIVO NEGATIVO</b>	57.1%	66.7%

*Tabla 7. Especificidad y sensibilidad del test inmunodott con antígeno BCG y M. tuberculosis frente a baciloscopía*

El cálculo de sensibilidad y especificidad (**ANEXO 11**) muestra que la sensibilidad es mayor cuando se trabaja con M. tuberculosis y la especificidad es la misma para ambos antígenos se tiene así una sensibilidad del 84.2% y una especificidad del 36.4% para BCG y una sensibilidad de 89,5% y especificidad del 36.4% para M. tuberculosis

El cálculo de sensibilidad y especificidad (**ANEXO 12**) muestra que el VPP y VPN son mayores en ambos casos cuando se trabaja con M. tuberculosis como antígeno se tiene así una VPP para M. tuberculosis de 70,8% y para BCG 69,6% y en el caso del VPN se tiene 66,7% para M. tuberculosis como antígeno y 57,1% para BCG.

**IX. 4. Porcentajes de la prueba inmunodott BCG e inmunodott M. tuberculosis y resultado comparativo final de ambas pruebas.**

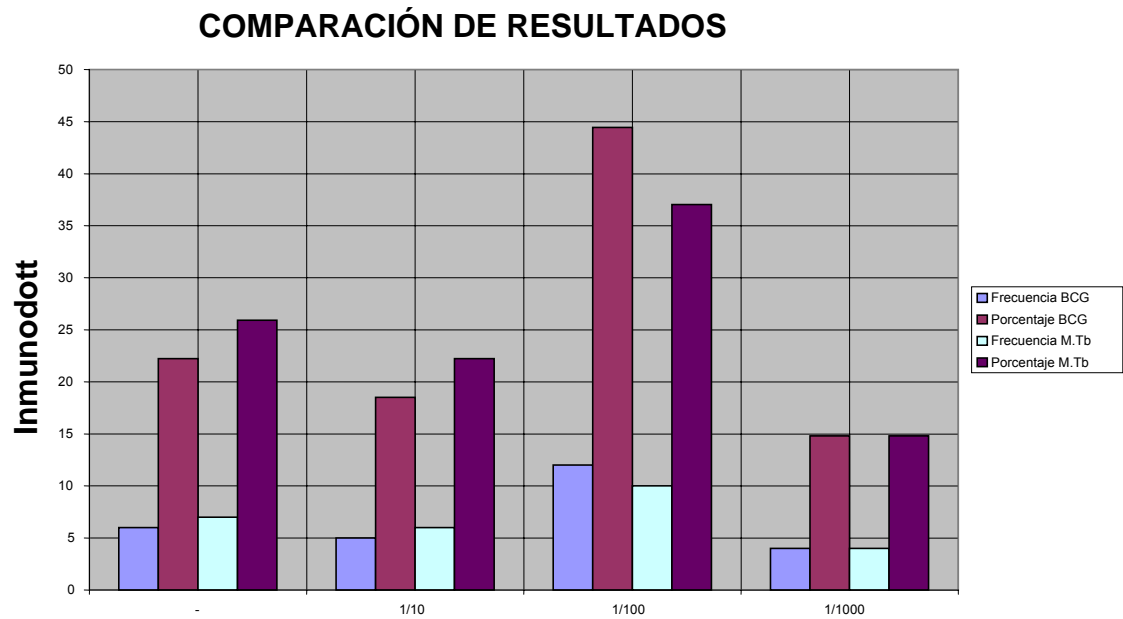
A continuación se pueden observar los resultados finales de frecuencias de la prueba realizada con ambos antígenos **TABLA 8.**

<b>INMUNODOTT</b>	<b>BCG (%)</b>	<b>M tuberculosis (%)</b>
-	22,2	25,9
1/10	18,5	22,2
1/100	44,4	37,0
1/1000	14,8	14,8
<b>Total</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>

**Tabla 8.** Comparación de porcentajes para ambas pruebas inmunodott BCG e inmunodott M. tuberculosis

Esta tabla se realizó con el fin de presentar en números un resumen final de los resultados obtenidos en la prueba realizada en los pacientes los datos fueron tomados del **ANEXO 13.**

En el **GRAFICO 8** se muestra un resumen de resultados en porcentajes y frecuencias para inmunodott BCG y para inmunodott M. tuberculosis.



**Gráfico 8.** Comparación de resultados de la prueba inmunodott con antígeno BCG y antígeno M. tuberculosis. Resumen final

## **X. DISCUSIÓN.**

Teniendo en cuenta que actualmente la baciloscopía es el único método de diagnóstico rápido de tuberculosis y que esta es positiva cuando existen al menos 10 000 microorganismos por cada mililitro de esputo y que además no es lo suficientemente útil al tratarse de infección no cavitaria es que se da lugar a realizar estudios sobre la posibilidad de desarrollar una prueba para coadyuvar de manera rápida y eficaz en el diagnóstico de tuberculosis.

Se ha visto que en cuanto a sensibilidad para las pruebas diagnosticas de tuberculosis se tiene para el cultivo 100%, gen probe 94,1% para el amplicor 88,2% y para baciloscopía un 64,7% y en cuanto a especificidad todos presentan un 100% estos datos serán útiles mas adelante para discutir algunos aspectos relevantes en cuanto a comparación de estos métodos con el método serológico inmunodott.

Como es evidente el cultivo representa el método de mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de tuberculosis pero el tiempo que implica realizarlo (aproximadamente 3 semanas) es demasiado en algunos casos donde se debe iniciar un tratamiento inmediato y en este caso el método serológico inmunodott es muy rápido y puede coadyuvar al diagnóstico de la enfermedad.

Se ha encontrado mediante estudios realizados que al ser atenuado *M. bovis* a BCG se pierden muchas regiones en el genoma de la bacteria dejando marcos de lectura abierta lo cual produce la pérdida de expresión de un gran número de proteínas lo que hace que la diferencia sea aún mucho mayor con *M. tuberculosis* en cuanto a sus determinantes antigénicos y por lo tanto a la producción de anticuerpos de diversa especificidad en suero de pacientes que cursan con una infección por *M. tuberculosis* reconocerán de manera mas específica al antígeno si éste es el mismo o por lo menos similar al que esta originando la respuesta.

Tomando en cuenta lo mencionado anteriormente así como el hecho probado también de que ciertos individuos reaccionan a algunos antígenos y no frente a otros es que surge en muchos estudios la idea de realizar “cocteles” antigénicos para poder cubrir esta amplia respuesta de anticuerpos que reconocen diferentes

estructuras del microorganismo es por esto que se realiza este trabajo comparativo entre BCG y *M. tuberculosis*, ambos antígenos complejos (mosaicos antigénicos) ya que hasta 1990 se creía que *M. tuberculosis* tenía un genotipo altamente conservado y muy pocas diferencias fenotípicas que influyeran en la patogénesis así como en la respuesta inmune pero luego de años de estudio se llegó a la conclusión de que las diferencias entre cepas surgen a nivel de supervivencia, carga bacilar, patología, respuesta inmune y destacadas diferencias genotípicas y es muy probable, teniendo en cuenta la procedencia de los sueros obtenidos para realizar este trabajo, que estas diferencias hayan podido influir en los resultados falsos negativos claro que para eso sería conveniente realizar un estudio de cepas circulantes tanto en los Yungas de La Paz como en la ciudad de La Paz para verificar si esa diferencia está presente y que tan grande sería la influencia en los resultados del inmunodot.

La baciloscopía no se ve influenciada por la diferencia de cepas ya que solo se trata de encontrar al bacilo en el esputo, en cambio en inmunodot la presencia de ciertas cepas puede desencadenar una respuesta inmune de diferente intensidad e incluso verse afectada por la respuesta de cada paciente que como se mencionó anteriormente no es similar en todos los casos, esta es la base también para el estudio y desarrollo de otras vacunas lógicamente diferentes a BCG.

Por esto son recomendables posteriores estudios en cuanto a la diversidad de reconocimiento, diferencias inmunogenéticas y desigualdad de reconocimiento antigénico en sueros de pacientes infectados con tuberculosis.

Es necesario disponer de una prueba de diagnóstico serológico con la suficiente sensibilidad y especificidad y esto depende mucho del antígeno que se emplee.

Todo esto coincide con investigaciones realizadas anteriormente donde se menciona que la falla de los tests en sangre para diagnóstico de tuberculosis es debida a falta de antígenos definidos para cada especie, la primera evidencia de esto se presentó por Harboc y col. Con el antígeno MPB6 presente en *M. tb* y no en BCG o también proteínas como ESAT-6 y CFP-10 ya que estas son regiones suprimidas durante el pasaje in Vitro de BCG **(32)**.



También pudo observarse una alta especificidad empleando PPD como antígeno **(36)** o contra la pared de *M. tuberculosis* **(37)**, todo esto en búsqueda de la mejor alternativa para el diagnóstico serológico de tuberculosis.

Se sabe de la existencia de genotipos conservados para *M. tuberculosis* así como la gran diversidad genética del microorganismo incluso como una ventaja selectiva siendo así necesario contar con pruebas que puedan detectar los anticuerpos producidos frente a tal diversidad genética **(39)**.

Según estudios realizados se tiene una larga lista de determinantes antigénicos tales como ESAT-6, CPF-10, MPT-64, DAT, PGLTb 1 y otros que no se encuentran en BCG debido al proceso de atenuación que debe sufrir precisamente para perder su virulencia que luego es imposible de recuperar este motivo es muy importante para pensar en la posibilidad de emplear a *M. tuberculosis* para realizar esta prueba de inmunodott, *M. tuberculosis* lógicamente presenta una gran diversidad genética pero que se ha demostrado también que en lugares con elevada incidencia de tuberculosis prevalecen genotipos conservados, en relación a este punto Van Soolingen y col. citados anteriormente en este trabajo observaron 3 cepas incluyendo una altamente virulenta que es H37Rv las cuales presentaban grandes diferencias en cuanto a respuesta inmune y patología producidas observando también algo interesante que es la diferencia en cantidad y tiempo en el que el INF- $\alpha$  se hallaba presente en suero de ratones infectados con tres cepas diferentes lo cual sería interesante estudiar respecto a *M. tuberculosis* y BCG en posteriores trabajos.

Respecto al Gold estándar la sensibilidad de inmunodott con BCG es mayor a la sensibilidad de inmunodott con *M. tuberculosis*, este resultado puede deberse a que e cuando se diagnostica un paciente mediante la clínica y en algunos casos mediante cultivo o tomando en cuenta factores de riesgo, pueden existir variaciones en cuanto al tiempo que el paciente este cursando la enfermedad o a la edad del paciente y la producción de anticuerpos relacionada a la misma lo que puede producir variaciones al momento de determinar la sensibilidad y especificidad para cada prueba. También es recomendable tomar en cuenta que si bien es mayor la sensibilidad para BCG esta no es una diferencia muy amplia y

además hay que ver que los valores de sensibilidad VPP y VPN para M. tuberculosis son mayores que para BCG.

Al realizar la comparación con Gold estándar la especificidad para inmunodott M.tb (75%) es mayor que para BCG (50%) **ANEXO 14** y se puede decir que es un resultado muy alentador si esta prueba se realiza en conjunto con una gama de exámenes y tomando en cuenta la clínica del paciente. Es así que se podría considerar M. tuberculosis como una buena opción a ser empleada como antígeno para la prueba de inmunodott.

En comparación con baciloscopía como única prueba validada por su eficacia y de mayor rapidez para diagnóstico tuberculosis se obtuvo una mayor sensibilidad en el momento de emplear M. tuberculosis como antígeno que cuando se empleo BCG lo cual es muy importante cuando se habla de un método rápido para coadyuvar con el diagnóstico de tuberculosis. Existen otros factores también importantes para determinar en casos dudosos la existencia de la enfermedad pero, al hablar de un método que permitirá tratar al paciente de manera temprana mientras se completan otros exámenes es interesante notar que la sensibilidad frente a baciloscopía cuando se emplea M. tuberculosis como antígeno llega a un porcentaje de 89,5% que no es despreciable al momento de tomar una decisión para diagnosticar y tratar al paciente siempre en base a la clínica que presente el mismo (**ANEXO 15**), tomando en cuenta que se tiene un 64,7% de sensibilidad para la baciloscopía y que los pacientes con baciloscopía positiva cursan con una infección probada por M. tuberculosis al tener este resultado frente a una prueba de estas características se puede pensar en mejorar la técnica serológica y emplear M. tuberculosis como antígeno.

Al tiempo de comparar inmunodott BCG con inmunodott M. tuberculosis la determinación de verdaderos positivos (Sensibilidad) indica la presencia de anticuerpos en suero del paciente ya sea frente al antígeno BCG o al antígeno M. tuberculosis, ahora bien, frente a baciloscopía la sensibilidad es mayor al emplear M. tuberculosis como antígeno lo cual es mas relevante que en el caso de comparar frente a gold estándar ya que se sabe con baciloscopía positiva que el

paciente tiene la bacteria en el organismo y que los anticuerpos contra la misma están con seguridad en el suero del paciente.

Respecto a especificidad frente a baciloscopía, esta es la misma con el empleo de ambos antígenos y es bastante baja (36,4%) lo cual se explica por la posible existencia de reacciones frente a algunos determinantes antigénicos que anteriormente estuvieron sensibilizando al paciente tales como vacuna BCG o componentes antigénicos compartidos entre especies de *Mycobacterium* y puede ser por esto que la especificidad es baja, y esto se refleja mas en países con regiones endémicas de tuberculosis como el nuestro donde no en todos los casos solamente una baciloscopía puede determinar si el paciente es negativo para tuberculosis así que en comparación con el diagnóstico serológico, existe la desventaja de que no todos los resultados negativos para baciloscopía son necesariamente negativos para tuberculosis.

Se puede resumir que en cuanto a la especificidad del método el antígeno M. tuberculosis dá mejores resultados así como en términos de sensibilidad por lo tanto este estudio es una buena referencia para posteriores investigaciones en las que se pueda relacionar la presencia de anticuerpos en pacientes con infección por M. tuberculosis y dar un paso mas en la mejora del diagnóstico serológico.

Haciendo una observación en cuanto a la relación existente entre la clínica del paciente y el resultado de inmunodott con ambos antígenos (ANEXO 18) se puede también afirmar que existe una buena relación de 25 de los 30 pacientes positivos para tuberculosis (83,3%) de los casos en los cuales se expresa el resultado de inmunodott de acuerdo con la situación clínica del paciente y por otro lado 5 de 30 pacientes (16,7%) que no tienen un resultado concordante entre el inmunodott y la situación clínica del paciente, de estos 5 pacientes dos presentan tuberculosis pleural y tomando en cuenta que esta puede presentarse entre 6 a 24 meses después de la primoinfección y que con mayor frecuencia se asocia a la reactivación de un proceso tuberculoso antiguo, se puede concluir que en esta etapa de la enfermedad, es mas difícil para algunos pacientes producir los anticuerpos necesarios para una determinación serológica, esto en algunos casos y dependiendo de la reacción y el estado de cada organismo. De estos 5 casos 1

de ellos es tuberculosis multirresistente. Y los otros 2 casos no tienen algo en particular así que puede deberse a un error de técnica.

Se debe tomar en cuenta también que el hecho de emplear BCG como antígeno es mucho mas seguro para el profesional en salud que el empleo de *M. tuberculosis* por lo tanto la prueba que esta siendo realizada actualmente con BCG es segura en términos de sensibilidad cuando se habla de coadyuvar a un gold estándar para el diagnóstico de tuberculosis ahora que si se recomendaría realizar mas investigaciones para poner en practica la prueba de inmunodott con *M. tuberculosis* y analizar sus ventajas frente a baciloscopía ya que los resultados obtenidos en este trabajo también nos hacen pensar que el hecho de que no se evidencien reacciones cruzadas da lugar al desarrollo de investigaciones a cerca del uso de antígenos mas específicos de *M. tuberculosis* o de cócteles antigénicos en su lugar como se menciona en muchísimos trabajos realizados hasta la fecha para una mejor determinación y mejores resultados en un futuro.

## **XI. CONCLUSIONES.**

- La detección de anticuerpos en el suero de pacientes con tuberculosis mediante la técnica inmunodott es posible empleando *M. tuberculosis* como antígeno o BCG como antígeno.
- El test inmunodott con *Mycobacterium tuberculosis* empleado como antígeno presenta menor sensibilidad y mayor especificidad que el test de inmunodott con BCG como antígeno en relación al gold estándar
- El estudio ha podido demostrar que el test inmunodott con *Mycobacterium tuberculosis* empleado como antígeno presenta mayor sensibilidad e igual especificidad que el test de inmunodott con BCG como antígeno en relación a los resultados de la baciloscopía.
- Los valores predictivos positivo y negativo son mayores cuando se emplea *M. tuberculosis* como antígeno.
- Los resultados han permitido demostrar que, en relación al diagnóstico del paciente y su situación clínica el test inmunodott con ambos antígenos tiene una sensibilidad y especificidad comparables con la baciloscopía.
- Se ha podido establecer que existe la posibilidad de mejorar la técnica actualmente utilizada en diagnóstico serológico de tuberculosis por el método de inmunodott empleando como antígeno *M. tuberculosis*.
- Existe relación considerable entre los resultados obtenidos por inmunodott y la situación clínica del paciente.

## **XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.**

- (1) *Panamerican Health Organization, Division of Disease Prevention and Control Communicable Diseases Program, based on country information 2000.*
- (2) *Del Granado M. Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. Anuario Epidemiológico. 2000.*
- (3) *Ministerio de salud y previsión social. Anuario Epidemiológico. 2000.*
- (4) *Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. Anuario Epidemiológico. 2003.*
- (5) *Elizaga J, Carrero P, Iñigo P, Chávez F. Transmisión de tuberculosis en un área con baja incidencia: Estudio Epidemiológico y Molecular. Med Clin 2002; 118: 645-9*
  
- (6) *Burrows W. Tratado de Microbiología. Editorial Interamericana. 18 ed. 1995. p. 964*
- (7) *Lennette E. Manual de Microbiología Clínica. Editorial Panamericana S.A. 4 ed. 2000. p. 1407*
- (8) *Brooks G y col. Microbiología Médica. Editorial Manual Moderno. 16 ed. 1999. p. 8998.*
- (9) *Sola C, Horgen J, Maissetti J, Devalleis A, Goh S. Spoligotyping followed to Double-Repetitive-Element PCR as rapid alternative to IS6110 fingerprinting for Epidemiological Studies of Tuberculosis. Jor Clin Micro 1998; 36: 1112-1124.*
- (10) *COLE, Stewart. Genómica comparativa y funcional del complejo Mycobacterium tuberculosis en: Microbiology. 2002; 2919-2928, vol. 148.*
- (11) *Ebrahimi Rd M, Bifani P, Martin C, Kremer K, Samper S, Rauzier J, Kreiswirth B, et al. Mutations in Putative Mutator Genes of Mycobacterium tuberculosis Strains of the W-Beijing Family. Emer Infect Diss. 2003; 9: 838-845.*
- (12) *COLE, Stewart. Genómica comparativa y funcional del complejo Mycobacterium tuberculosis en: Microbiology. 2002; 2919-2928, vol. 148.*

- (13) Raja A, Uma Devi KR, Ramalingam B, Brennan P. Immunoglobulin G, A, and Responses in serum and Circulating Immune Complexes Elicited by the 16-Kilodalton Antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin and Ciag Lab Imm* 2002; 9: 308-312.
- (14) Julian E, Cama M, Martinez P, Luquin M. An ELISA for five Glycolipids from the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*: Tween 20 interference in the assay. *Jour Imm Meth*. 2001; 251: 21-31.
- (15) Florio W, Batoni G, Esin S, Bottai D, Maisetta G, Pardini M, et al. Identification of novel proteins in culture filtrates of *Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin* in the isoelectric point range 6-11. *Proteomics* 2003; 3: 798-802.
- (16) Andersen P, Munk ME, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000; 356: 1099-104
- (17) Lopez B, Aguilar D, Orozco M, Van Soolingen D, Espitia C, Ritaccov, et al. A marked difference pathogenesis and Immune Response Induced by Different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Imm* 2003; 133: 30-37.
- (18) Gehring AJ, Rojas R, Canday D, Lakey DL, Harding CV, Boom H. The *Mycobacterium tuberculosis* 19-Kilodalton Lipoprotein Inhibits Gamma Interferon-Regulated HLA-DR and FcR1 on Human Macrophages through Toll-Like Receptor 2. *Inf and Imm* 2003; 71: 4487-4497.
- (19) Cole ST. Comparative and Functional genoma of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology* 2002; 148: 2919-2928.
- (20) Roitt I. *Inmunología Esencial*. Editorial JIMS. 6 ed. 2000.p. 286.
- (21) Raja A, Uma Devi KR, Ramalingam B, Brennan P. Immunoglobulin G, A, and Responses in FERUM and Circulating Immune Complexes Elicited by the 16-Kilodalton Antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin and Ciag Lab Imm* 2002; 9: 308-312.
- (22) García C, Sancho G. Respuesta Inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Una revisión de la literatura. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2001; 14: 114-128.
- (23) Harrison. *Medicina Interna Tomo II*. Editorial La Prensa Médica Mexicana. 2002. p. 2298.

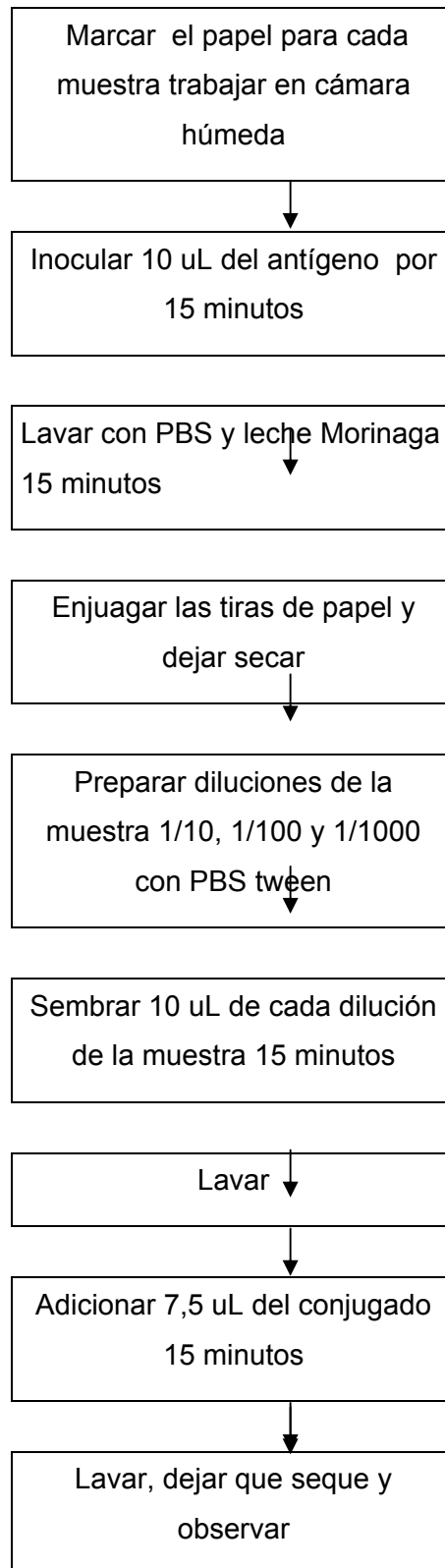
- (24) *Artiles F, Peña MJ, Campos Herrera MI, Lafargo B. Valoración Clínica de la prueba Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct 2 (AMTR-2, Gen Probe) en el diagnóstico de tuberculosis. Enf Infec Micro Clin 2001; 19: 53-56.*
- (25) *Palomo I. Fundamentos de Inmunología. Editorial Universidad de Talca. 2000.p. 727.*
- (26) *Rose F. El Laboratorio de Inmunología Clínica. Editorial Médica Panamericana. 2 ed.*
- (27) *Zinsser H. Tratado de Fisiología Médica. Editorial Interamericana McGraw-Hill. 9 ed. p. 1262.*
- (28) *Brooks G y col. Microbiología Médica. Editorial Manual Moderno. 16 ed. p.8998.*
- (29) *Andersen P, Munk ME, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. Lancet 2000; 356: 1099-104*
- (30) *Glynn JR, Whiteley J, Bifani P, Kremer K, Van Soolingen D. Worldwide Occurrence of Beijing/W Strains of Mycobacterium tuberculosis: A systematic Review. Emer Infect Diss 2002; 8:843-849.*
- (31) *Andersen P, Munk ME, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. Lancet 2000; 356: 1099-104*
- (32) *Andersen P, Munk ME, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. Lancet 2000; 356: 1099-104*
- (33) *Gevandam MH, Bollet C, Charpein D, Mallet MN, De Micco P. Serological response of tuberculosis patients to Antigen 60 of BCG. Lab Micro. Hospital Salvador France. (Resumen) 2002.*
- (34) *Calla J, Condori M. Diagnóstico serológico de tuberculosis por Inmunodott: Ensayos preliminares. BIOFARBO 1999; 9: 9-12.*
- (35) *Calla J, Toro K. Implementación de un método de cuantificación de datos para la prueba de diagnóstico serológico de tuberculosis basado en el método inmunodott. BIOFARBO 2000; 8:29-32.*
- (36) *Delgado A, Gonzales A. Hospital Veterinario. Clínica de Animales Mayores-FMV- UNMSM. Apdo. 41-0068. Lima Perú.*



- (37) Simonney N, Molina JM, Molimard M, Oksenhendler E, Perrone C, Lagrange PH. Analysis of the immunological humoral Response to *Mycobacterium tuberculosis* Glycolipid Antigens (DAT, PGL, Tb1) for diagnosis of tuberculosis in HIV-seropositive and seronegative patients. *Serv Micro. Hospital Saint Louis Paris* 1998; 53:377-380.
- (38) Alfaro M, Mormile M, Sofia M, Micco A, Mormile A, Del Pezzo M. Ig A immune response against the *Mycobacterial* antigen A60 in patients with active pulmonary tuberculosis. *Inst Resp Diss. (Resumen)* 2002.
- (39) Samanich KM, Keen MA, Vissa VD, Harder JD, Spencer JS, Belisle JT et al. Serodiagnostic Potential of Culture Filtrate Antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diag Lab Imm* 2000; 7: 662-668.
- (40) Genaro ML. Immunologic Diagnosis of Tuberculosis. *Clin Inf Diss* 2000; 30: 243-246.
- (41) Valle Rojas F. Aplicación de Métodos de Laboratorio Dirigidos a la Evaluación de la Respuesta Inmune Celular de una Población Mixta frente a estímulos alogénitos. (Tesis de Licenciatura). La Paz: Universidad Mayor de San Andrés; 1999.
- (42) Riley RL, Knight M, Middelbrook G. Ultraviolet Susceptibility of BCG and virulent tubercle bacilli. *Am Rev Resp Diss* 1976; 113: 413.
- (43) Rojas, M., L. F. Barrera, and L. F. García. 1999. TNF- and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. *J. Immunol.* 162: 6122-6131.

**XI. ANEXOS****Anexo no. 1: Encuesta****ENCUESTA No.****FECHA TOMA DE MUESTRA:****HOSPITAL:**

<b>DATOS GENERALES</b>
Nombre: Apellidos: No. Historia clínica: Edad: Sexo: M F Procedencia:
<b>CLINICA</b>
Tiempo de evolución: Tos: Expectoración: Fiebre: Pérdida de peso: Hemoptisis: Estado general:
<b>LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA</b>
Baciloscopía: Cultivo:
<b>OTROS EXAMENES COMPLEMENTARIOS</b>
Prueba tuberculina Radiografía de tórax PCR
<b>DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO</b>
Diagnóstico presuntivo: Diagnóstico definitivo: Tratamiento: Tiempo de tratamiento:

**Anexo 2: Técnica de Inmunodott.**

**Anexo 3: Resultados de la prueba inmunodott frente a antígenos BCG y *M. tuberculosis*.**

En la fila superior de cada cuadro se observa la prueba inmunodott realizada con antígeno *M. tuberculosis* y la fila de abajo es la prueba inmunodott realizada con antígeno BCG. Las dos primeras pruebas en cada cuadro corresponden a controles positivo y negativo respectivamente.





**Anexo 4: Tabla de edades de la población en estudio.**

<b>Intervalo</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Frecuencia Relativa</b>	<b>Frecuencia Relativa Acumulativa</b>
0 - 15	0	0,00	0,26
16 - 30	12	0,43	0,69
31 - 45	2	0,07	0,76
46 - 60	3	0,11	0,87
61 - 75	5	0,18	1,05
76 - 90	6	0,21	1,26
total	28	1,00	

Media:	49
moda:	27
Mediana:	14
Varianza:	654
Desviacion std:	26
Coef de variab:	0,5

**Anexo 5: Inmunodott BCg y M. tuberculosis (-) Vs. Baciloscopía.**

<b>Baciloscopía. Inmunodott BCG vs M.Tb (-)</b>				
<b>Baciloscopía</b>	<b>Frecuencia (BCG)</b>	<b>Porcentaje (BCG)</b>	<b>Frecuencia (M.tb)</b>	<b>% (M.tb)</b>
negativo	3	50	3	42,9
(+)	1	16,7	1	14,3
(++)	0	0	0	0
(+++)	1	16,7	1	14,3
No	1	16,7	2	28,6
<b>Total (BCG vs M.Tb)</b>				
	<b>6</b>	<b>100</b>	<b>7</b>	<b>100</b>

**Anexo 6: Inmunodott BCg y M. tuberculosis 1/10 Vs. Baciloscopía.**

<b>Baciloscopía. Inmunodott BCG vs M.Tb 1/10</b>				
<b>Baciloscopía</b>	<b>Frecuencia (BCG)</b>	<b>Porcentaje (BCG)</b>	<b>Frecuencia (M.tb)</b>	<b>% (M.tb)</b>
negativo	1	20	2	33,3
(+)	1	20	1	16,7
(++)	1	20	2	33,3
(+++)	1	20	1	16,7
No	1	20	0	0
<b>Total (BCG vs M.Tb)</b>				
<b>1/10</b>	<b>5</b>	<b>100</b>	<b>6</b>	<b>100</b>

**Anexo 7: Inmunodott BCg y M. tuberculosis 1/100 Vs. Baciloscopía.**

<b>Baciloscopía. Inmunodott BCG vs M.Tb 1/100</b>				
<b>Baciloscopía</b>	<b>Frecuencia ( BCG)</b>	<b>Porcentaje (BCG)</b>	<b>Frecuencia (M.tb)</b>	<b>% (M.tb)</b>
negativo	3	25	2	20
(+)	2	16,7	2	20
(++)	2	16,7	1	10
(+++)	3	25	3	30
No	2	16,7	2	20
<b>Total (BCG vs M.Tb)</b>				
<b>1/100</b>	12	100	10	100

**Anexo 8: Inmunodott BCg y M. tuberculosis 1/1000 Vs. Baciloscopía.**

<b>Baciloscopía. Inmunodott BCG vs M.Tb 1/1000</b>				
<b>Baciloscopía</b>	<b>Frecuencia ( BCG)</b>	<b>Porcentaje (BCG)</b>	<b>Frecuencia (M.Tb)</b>	<b>% (M.Tb)</b>
negativo	1	25	1	25
(+)	1	25	1	25
(++)	0	0	0	0
(+++)	2	50	2	50
No	0	0	0	0
<b>Total (BCG vs M.Tb)</b>				
<b>1/1000</b>	4	100	4	100



**Anexo 9: Cálculo para determinar especificidad y sensibilidad para ambos antígenos en relación al gold estándar.**

**Antígeno BCG.**

$$S = \frac{26}{31} \times 100$$

$$S = 83.9\%$$

$$E = \frac{2}{4} \times 100$$

$$E = 50\%$$

**Antígeno M. tuberculosis.**

$$S = \frac{25}{31} \times 100$$

$$S = 80.6\%$$

$$E = \frac{3}{4} \times 100$$

$$E = 75\%$$

**Anexo 10: Cálculo para determinar valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para ambos antígenos en relación al gold estándar.**

**Antígeno BCG.**

$$\text{VPP} = \frac{26}{28} \times 100$$

$$\text{VPP} = 92.8\%$$

$$\text{VPN} = \frac{2}{7} \times 100$$

$$\text{VPN} = 28.6\%$$

**Antígeno M. tuberculosis.**

$$\text{VPP} = \frac{25}{26} \times 100$$

$$\text{VPP} = 96.2\%$$

$$\text{VPN} = \frac{3}{9} \times 100$$

$$\text{VPN} = 33.3\%$$

**Anexo 11: Cálculo para determinar especificidad y sensibilidad para ambos antígenos en relación a baciloscopía.**

**Antígeno BCG.**

$$S = \frac{16}{19} \times 100$$

$$S = 84.2\%$$

$$E = \frac{4}{11} \times 100$$

$$E = 36.4\%$$

**Antígeno *M. tuberculosis*.**

$$S = \frac{17}{19} \times 100$$

$$S = 89.5\%$$

$$E = \frac{4}{11} \times 100$$

$$E = 36.4\%$$

**Anexo 12: Cálculo para determinar valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para ambos antígenos en relación a baciloscopia.**

**Antígeno BCG.**

$$\text{VPP} = \frac{16}{23} \times 100$$

$$\text{VPP} = 69,6\%$$

$$\text{VPN} = \frac{4}{7} \times 100$$

$$\text{VPN} = 57,1\%$$

**Antígeno M. tuberculosis.**

$$\text{VPP} = \frac{17}{24} \times 100$$

$$\text{VPP} = 70,8\%$$

$$\text{VPN} = \frac{4}{6} \times 100$$

$$\text{VPN} = 66,7\%$$

**Anexo 13: Resultado test inmunodott con antígeno BCG y M. tuberculosis.**

Pcte.	DIAGNOSTICO	INMUNODOTT BCG:	INMUNODOTT M.tb
1	TUBERCULOSIS	1/100	1/100
2	TUBERCULOSIS	-	-
3	TUBERCULOSIS	1/10	1/10
4	TUBERCULOSIS	-	-
5	TUBERCULOSIS	1/100	1/10
6	SINTOMATICO	1/100	1/100
7	SINTOMATICO	1/100	1/100
8	SINTOMATICO	1/1000	1/1000
9	TUBERCULOSIS	1/10	1/10
10	TUBERCULOSIS	1/100	1/100
11	TUBERCULOSIS	1/100	1/100
12	TUBERCULOSIS	1/10	1/10
13	NEGATIVO	-	-
14	NEGATIVO	1/100	1/100
15	NEGATIVO	1/10	-
16	NEGATIVO	-	-
17	TUBERCULOSIS	1/10	1/10
18	TUBERCULOSIS	-	-
19	TUBERCULOSIS	-	-
20	TUBERCULOSIS	1/100	1/100
21	TUBERCULOSIS	1/100	1/100
22	TUBERCULOSIS	1/1000	1/1000
23	TUBERCULOSIS	1/1000	1/1000
24	TUBERCULOSIS	1/1000	1/1000
25	TUBERCULOSIS	1/100	1/100
26	TUBERCULOSIS	1/100	1/100
27	TUBERCULOSIS	1/100	1/100
28	TUBERCULOSIS	1/100	1/100
29	TUBERCULOSIS	1/100	1/10
30	TUBERCULOSIS	1/10	1/10
31	TUBERCULOSIS	1/100	1/100
32	TUBERCULOSIS	1/100	1/100
33	SINTOMATICO	1/100	-
34	TUBERCULOSIS	1/1000	1/1000
35	SINTOMATICO	-	-

**Anexo 14: Tabla para determinar sensibilidad y especificidad del test inmunodott con antígeno BCG frente al Gold estándar.**

<b>PRESENCIA O AUSENCIA DE LA ENFERMEDAD</b>		
<b>RESULTADO DE LA PRUEBA</b>	<b>VERDADERO DIAGNOSTICO</b>	
	<b>ENFERMO</b>	<b>SANO</b>
<b>POSITIVO</b>	Verdaderos Positivos 26	Falsos Positivos 2
<b>NEGATIVO</b>	Falsos Negativos 5	Verdaderos Negativos 2

**Anexo 15: Tabla para determinar sensibilidad y especificidad del test inmunodott con antígeno *M. tuberculosis* frente al gold estándar.**

<b>PRESENCIA O AUSENCIA DE LA ENFERMEDAD</b>		
<b>RESULTADO DE LA PRUEBA</b>	<b>VERDADERO DIAGNOSTICO</b>	
	<b>ENFERMO</b>	<b>SANO</b>
<b>POSITIVO</b>	Verdaderos Positivos 25	Falsos Positivos 1
<b>NEGATIVO</b>	Falsos Negativos 6	Verdaderos Negativos 3

**Anexo 16: Tabla para determinar sensibilidad y especificidad del test inmunodott con antígeno BCG frente a baciloscopia.**

<b>PRESENCIA O AUSENCIA DE LA ENFERMEDAD</b>		
<b>RESULTADO DE LA PRUEBA</b>	<b>VERDADERO DIAGNOSTICO</b>	
	<b>ENFERMO</b>	<b>SANO</b>
<b>POSITIVO</b>	Verdaderos Positivos 16	Falsos Positivos 7
<b>NEGATIVO</b>	Falsos Negativos 3	Verdaderos Negativos 4

**Anexo 17: Tabla para determinar sensibilidad y especificidad del test inmunodott con antígeno M. tuberculosis frente a baciloscopia.**

<b>PRESENCIA O AUSENCIA DE LA ENFERMEDAD</b>		
<b>RESULTADO DE LA PRUEBA</b>	<b>VERDADERO DIAGNOSTICO</b>	
	<b>ENFERMO</b>	<b>SANO</b>
<b>POSITIVO</b>	Verdaderos Positivos 17	Falsos Positivos 7
<b>NEGATIVO</b>	Falsos Negativos 2	Verdaderos Negativos 4

### Anexo 18: Relación de resultados inmunodott con la situación clínica del paciente

Px	Clínica	Inmunodott BCG	Inmunodott M. tb	Baciloscopia	Otros
1	Expectoración MP con fiebre y perdida de peso, astenia, adinamia y dificultad respiratoria	1/100	1/100	+++	TB pulmonar Tx Esq. 1 por 1 semana
2	Expectoración mucosa fiebre hemoptisis estado regular	-	-	+++	TBP complicada Esq. Tratamiento I por 1 semana
3	Expectoración MP estado regular	1/10	1/10	Neg -	TB generalizada Tx Esq. 1 por 1 mes
4	Tos seca, perdida de peso dificultad respiratoria dolor costado derecho	-	-	Neg. -	TB pleural Tx 1 mes
5	Expectoración MP con fiebre y perdida de peso y RX con sospecha de TB	1/100	1/10	Neg. -	TBP reactivada Tx 1 semana
6	Tos y expectoración con perdida de peso, astenia y adinamia	1/100	1/100	+++	TBP Tx. Esq. 1 por 1 semana
7	Expectoración con fiebre, perdida de peso y hemoptisis, con decaimiento y cansancio	1/100	1/100	+	TBP realizo ya 1 esquema de Tx hace 20 años y el ultimo ya hace 4 meses
8	Expectoración mucosa con fiebre y perdida de peso, astenia, adinamia, hiporexia, anemia	1/1000	1/1000	+++	TB genital y pulmonar Tx 2 meses
9	Expectoración MP con fiebre, perdida de peso, hemoptisis,	1/10	1/10		TBP Tx realizado hace



Px	Clínica	Inmunodott BCG	Inmunodott M. tb	Baciloscopia	Otros
	dolor dorsal, diaforesis, adinamia.			++	años y empieza otra vez desde hace 2 semanas
10	Expectoración sanguinolenta estado regular	1/100	1/100	++	TBP de reinfección
11	Sin síntomas que refieran tuberculosis	1/100	1/100	Neg. -	TBP de reinfección
12	Expectoración MP con perdida de peso, hemoptisis, cansancio, astenia, malestar	1/10	1/10	+++	TBP
13	Tos, expectoración mas de dos semanas con fiebre y perdida de peso no hemoptisis y estado general normal	-	-	Neg. -	Rx no muestran tuberculosis sin Dx ni Tx
14	Expectoración MP sin fiebre ni perdida de peso con estertores diseminados disnea y edema	1/100	1/100	Neg. -	Tuberculosis hace 7 años Cáncer broncogénico a descartar
15	No tiene sintomatología tuberculosa	1/10	-	No tiene	Aparentemente sana acude a hacer una prueba de embarazo
16	No tiene sintomatología tuberculosa	-	-	No tiene	Aparentemente sana acude a hacer una prueba de embarazo
17	Tos seca con perdida de peso y disnea	1/10	1/10	Neg. -	Dx. Final neoplasia pulmonar

Px	Clínica	Inmunodott BCG	Inmunodott M. tb	Baciloscopia	Otros
18	Tos seca, adinamia, desorientación, dolor	-	-	Neg. -	TB pleural, anemia Tx. Por 2 semanas Esq. 1
19	Expectoración MP con fiebre, perdida de peso, diaforesis nocturna, disnea y edemas	-	-	No tiene	TBP con Tx de 1 mes
20	Tos seca, con fiebre, astenia y adinamia	1/100	1/100	Neg. -	TB miliar, pulmonar, meningeo con Tx de 2 meses
21	Expectoración MP con perdida de peso, astenia, adinamia, hiporexia, malestar general	1/100	1/100	+	TBP con Tx de 1 semana
22	Expectoración MP con fiebre, perdida de peso, astenia y adinamia	1/1000	1/1000	+++	TBP con Tx de 1 mes de
23	Expectoración MP con mas de 1 año de evolución, astenia, adinamia, disnea, dolor	1/1000	1/1000	+	RX con lesión cavitaria e infiltrado. TBP con Tx hace 14 años y empezó nuevamente
24	Expectoración MP con hemoptisis, estado regular, temblor, disnea y edemas	1/1000	1/1000	Neg. -	RX no compatible con TB, Dx fibrosis pulmonar, Enf, de Graves
25	Expectoración amarillenta con fiebre, perdida de peso, astenia, adinamia	1/100	1/100	+	TBP con Esq. 1 por 1 semana
26	Expectoración MP con fiebre, perdida de peso, astenia y adinamia	1/100	1/100	++	TBP Esq. De Tx 1 por 1 semana

Px	Clínica	Inmunodott BCG	Inmunodott M. tb	Baciloscopia	Otros
27	Expectoración MP con fiebre, perdida de peso, astenia y adinamia	1/100	1/100	+++	TBP Esq. 1 por 1 mes
28	Expectoración MP con hemoptisis, dificultad respiratoria estado regular	1/100	1/100	+++	TBP de reinfección Tx 1 semana
29	Expectoración MP con fiebre, perdida de peso y liquido a nivel pleural	1/100	1/10	++	TB pleural
30	Tos seca con fiebre y perdida de peso, disnea, dolor hemitorax izq.	1/10	1/10	++	TBP, neumonía caseosa, Tx. 3 semanas
31	Tos seca, fiebre y estado regular, disnea, dolor precordial y opresivo en región dorsal izq.	1/100	1/100	No tiene	RX con compromiso pulmonar. TBP en tratamiento de 3 meses
32	Expectoración mucosa con hemoptisis, astenia, adinamia y malestar general	1/100	1/100	No tiene	RX con lesión cavitaria izq. TBP activa y Tx de 1 semana
33	Expectoración y perdida de peso, astenia, adinamia, hiporexia y disnea	1/100	-	Neg. -	TB hematogena y TBP en Tx de 3 meses
34	Expectoración MP con fiebre y perdida de peso, adinamia	1/1000	1/1000	+++	TBP
35	Expectoración MP con perdida de peso, disnea, malestar general y debilidad muscular	-	-	++	TBP crónica mutirresistente con Tx realizado 6 veces y ahora realiza Esq. 1 hace 1 mes

