

TUBERCULOSIS PULMONAR: ESTUDIO SEROLOGICO

M. Casal Román, F. Solís Cuesta, M.J. Linares Sicilia, M. C. Arias Blanco, J.M. Redondo Ecija, C. Puig López.
Centro de Referencia de Micobacterias. Facultad de Medicina. Universidad de Córdoba. España.

Realizamos un estudio serológico utilizando antígeno 60 en 83 enfermos diagnosticados bacteriológicamente de tuberculosis y en 147 sujetos sanos (donantes de sangre).

Un 70% de los enfermos diagnosticados de tuberculosis mostraron títulos superiores a 300 UI y sólo un 9 % de los individuos del grupo control, lo que confirma la alta especificidad y la aceptable sensibilidad de la prueba que hace de este nuevo test de gran ayuda en el diagnóstico de esta enfermedad.

El seguimiento a lo largo del tratamiento en los enfermos de tuberculosis mostró que los valores se mantenían o aumentaban.

PULMONARY TUBERCULOSIS: SEROLOGICAL STUDY

We have studied serum levels of 60-antigen in 83 patients diagnosed of tuberculosis and in 147 healthy subjects as a control group. Levels higher than 300 IU were detected in 70% of patients with tuberculosis, and only in 9% of the control group, which confirms the high specificity for this test with acceptable sensitivity. Followup shows either stable or rising levels in tuberculous patients.

Las enfermedades causadas por micobacterias y particularmente M. tuberculosis siguen siendo de una gran incidencia en nuestro país ^(1,2).

Los métodos actuales de diagnóstico tienen problemas ^(3,4), el diagnóstico de certeza sigue consiguiéndose mediante baciloscopia y/o cultivo, pero el cultivo es lento y a veces no es realizable en adultos que no espectoran y en niños⁽⁵⁾, todo ello nos lleva a la búsqueda de nuevos métodos diagnósticos para ayudar a la detección y seguimiento de la tuberculosis.

El diagnóstico serológico es ampliamente usado en medicina para diagnosticar muchas enfermedades ⁽⁶⁾.

Pretendemos, mediante un método serológico ELISA ^(7,8) utilizando el antígeno 60 de micobacterias ^(9,10) detectar anticuerpos para llegar al diagnóstico de tuberculosis ⁽¹¹⁻¹⁵⁾.

MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos realizado un seguimiento desde Febrero de 1988 a Febrero de 1990 de 83 enfermos todos ellos diagnosticados bacteriológicamente de tuberculosis: 4 eran enfermos con tuberculosis diseminada asociada a SIDA, 3 diagnosticados de tuberculosis extrapulmonar y 73 diagnosticados de tuberculosis pulmonar activa. En 20 sueros de enfermos del grupo más amplio se repitió la prueba con un mes de intervalo durante 6 meses, para observar su reproducibilidad y en otros 12 se realizaron determinaciones en el momento del diagnóstico, durante el tratamiento entre el 1º y 8º mes y al concluir el tratamiento de 9 meses.

El resto de los enfermos sólo se estudiaron en una ocasión.

La misma prueba se realizó en 147 individuos sanos donantes de sangre que se utilizó como grupo control ⁽¹⁶⁾.

Los sueros pertenecientes a estos enfermos se mantuvieron congelados a -30% hasta su utilización.

La técnica ELISA se realizó con los equipos comercializados Anda-TB (ANDAELISA Anda Biologicals, Strasbourg, France).

Los sueros se descongelaron a temperatura ambiente una hora antes de su realización y se diluyeron a 1/100, posteriormente las muestras de suero diluido se distribuyeron en los pocillos recubiertos con A60 de las placas de microtitulación formando complejos antígeno-anticuerpos tras un período de incubación. Los componentes no unidos se eliminaron por lavado. A continuación, se incubaron los pocillos con anti-inmunoglobulina humana marcada con peroxidasa.

Los componentes no unidos se eliminaron nuevamente por lavado. El sustrato de la peroxidasa, ortofenildiamina (OPD), que contiene peróxido de hidrógeno se inoculó a continuación en los pocillos. La reacción de la peroxidasa con el OPD produce un cambio de color, proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos presentes en la muestra. La lectura se realizó en un lector Titertek Multiskan a 492 nm.

A partir de la densidad óptica de los sueros de referencia positivos, se determinó el valor umbral y la zona de incertidumbre. Se trazó una curva de referencia situando las densidades ópticas (DO) de los sueros de referencia en el eje aritmético de ordenadas y sus concentraciones correspondientes en el eje logarítmico de abscisas X. La concentración de las muestras problema analizadas a la vez que los sueros de referencia se determinaron a partir de sus DO correspondientes y a la curva de referencia trazada.

Las pruebas se realizaron por duplicado calculándose el valor medio de ambos resultados obtenidos.

Se utilizan 3 controles positivos, uno negativo y uno blanco.

RESULTADOS

Calculamos el valor umbral en nuestra zona para considerar a partir de qué valor es positivo el resultado. Para ello utilizamos 147 sueros control y 70 sueros de enfermos diagnosticados bacteriológicamente de tuberculosis y colocamos el valor umbral en 300 UI (Tabla I).

TABLA I
CALCULO DEL UMBRAL EN NUESTRA ZONA

Valor umbral %	S %	E %	VP positivo %	VP negativo %	TVFP %	TVFN %
150	86	67	53	87	33	14
200	78	80	65	86	20	22
250	72	87	72	85	13	28
300	68	91	77	85	9	32
350	67	92	79	84	8	33
400	63	94	83	82	6	37
450	57	96	88	81	4	43
500	52	97	89	79	3	48

S= Sensibilidad

E= Especificidad

VP= Valor Predictivo

TVFP= Tasa valor falso positivo

TVFN= Tasa valor falso negativo

De los 83 enfermos de tuberculosis en los que se realizó la prueba, el 70% fueron positivos y sólo encontramos un 9% de los 147 sueros del grupo control (Tablas II y III).

Los resultados obtenidos realizando este estudio sobre distintos estadios clínicos de tuberculosis nos muestran que el porcentaje más alto (71.26%) se obtiene en enfermos diagnosticados de tuberculosis pulmonar activa (Tabla IV).

El total de los 20 sueros con resultado positivo (300 UI) que se repitieron tras 6 meses mantuvieron todos la positividad.

De los 12 sueros de enfermos de tuberculosis a los que se hizo seguimiento, 10 mantuvieron la positividad en las diferentes determinaciones y 2 aumentaron significativamente el número de unidades (1: de 950 a 1350 y 2: de 900 a 1350).

DISCUSIÓN

Los resultados confirman la alta especificidad y la sensibilidad aceptable que hace de este nuevo test de gran ayuda en el diagnóstico de esta enfermedad ⁽⁴⁾.

Coincidimos con Daza en colocar el valor umbral en 300 IU como más apropiado, debido a que en una sensibilidad que se acerca al 70% tenemos una especificidad de más del 90% ⁽¹¹⁾.

Encontramos mejores resultados cuando estudiemos la tuberculosis pulmonar activa, al igual que otros autores ⁽⁸⁾.

La aparición de falsos negativos en enfermos diagnosticados bacteriológicamente de tuberculosis, aunque está actualmente en estudio, podría deberse a varios mecanismos, por un lado a la débil avidéz de los anticuerpos sintetizados, por otro a la formación de inmunocomplejos o bien a factores supresores. Varios autores han demostrado que los pacientes con tuberculosis, además de anticuerpos, también tienen antígenos micobacterianos circulantes, los cuales pueden unirse al anticuerpo y formar complejos

TABLA II
Serología de enfermos tuberculosos

	Nº	%
< 300 UI (positivo)	58	70
100-300 UI (Intermedio)	11	13
< 100 UI (negativo)	14	17
TOTAL	83	

TABLA III
Serología del grupo control

	Nº	%
< 300 UI (positivo)	14	9
100-300 UI (Intermedio)	69	47
< 100 UI (negativo)	64	44
TOTAL	147	

TABLA IV
Resultados según el estadio clínico de tuberculosis

Estadío clínico	< 300	100-300	< 100	TOTAL TBC
TBC primaria	2	1	0	3
TBC diseminada asociada a SIDA	3	0	1	4
TBC extrapulmonar	1	1	1	3
TBC pulmonar activa	52	7	14	73
TOTAL	58	9	16	83

inmunes, dejando un poco anticuerpo libre para poderse ligar al antígeno utilizado en la prueba serológica, disminuyéndose su eficacia ⁽¹⁷⁾.

La positividad de los sueros se mantiene a pesar del tiempo de congelación de los mismos.

Parece ser que la respuesta serológica de tuberculosis con relación al Antígeno 60 discurre de forma independiente al efecto de la quimioterapia antituberculosa.

BIBLIOGRAFIA

1. Martínez J, de Letona L. Actualidad de la tuberculosis. *Enf Inf y Microbiol Clin* 1990; 8,5: 261-262.
2. Cayla J A. Epidemiología de la tuberculosis. *Medicine* 1989; 31: 1242-1250.
3. Casal M. Métodos microbiológicos de diagnóstico de la tuberculosis. *Enf Inf y Microbiol Clin* 1984; 2: 180-183.
4. Ausina V, Luquin M. Diagnóstico de tuberculosis por serología: Situación actual y perspectivas futuras. *Arch de Bronconeumol* 1990; 26: 166-171.
5. Daniel T M, Debanne S M. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 1135-1151.
6. Farmer S G. Inmunología de las infecciones bacterianas. En: Lannette E H, Balow A, Hausler W J, Shadorny J H. *Manual de Microbiología Clínica*. Buenos Aires. Panamericana 1987; 1116-1123.
7. Voller A. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Diagnostic Horizons* 1978; 2,1: 1-7.
8. Kalish S B, Radin R C, Levitz D, Zeiss C R, Metzgen E. Use of enzyme-linked immunosorbent assay technique in the differential diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis*. 1983, 147: 523-530.
9. Coccito C, Vanlinden F. Preparation and properties of antigen 60 from *M. bovis* BCG. *Clin Experim Immunol* 1986; 66: 262-272.
10. Coccito C, Baelden M C, Benoit C. Immunological properties of antigen 60 of BCG: Induction of humoral and cellular immune reaction. *Scand J Immunol* 1987; 25: 597-585.
11. Daza R M, Portero F, Dámaso D. Determinación en nuestro medio del valor umbral de anticuerpos frente al antígeno 60 de micobacterias por un método ELISA. *Rev Esp Microbiol Clin* 1988; 3: 651-654.
12. Me. Fadden J J, Hondayr C. No evidence for antibodies to mycobacterial A 60 antigen in Crohn's disease sera by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Med Microbiol* 1988; 25: 295-298.
13. Pérez J A, Moreno J J, Aguyo A, Alvarez M et al. Evaluación en nuestro medio de un método ELISA (Anda-Tb) para diagnóstico serológico de tuberculosis. *Enf Inf Microbiol Clin* 1990; 8,5: 298-292.
14. Casal M, Linares M J. Diagnóstico serológico de las tuberculosis. Estudio de la primera prueba comercializada existente (Anda ELISA tuberculosis). *Rev Esp Microbiol Clin* 1988; 3: 491-492.
15. Mattar S, Broquetas J, Sandeda, Carceller A, Gea J, Torres J M. Detección de anticuerpos IgG con el método ELISA en pacientes tuberculosos utilizando el antígeno 60. *Rev Esp Microbiol Clin* 1989; 4: 97-102.
16. Borovio M V. Cómo evaluar una prueba de laboratorio. *Enf Inf Microbiol Clin* 1987; 5: 510-511.
17. Zeiss C R. Serologic Diagnosis of Tuberculosis. *Clin Microbiol Newsletter* 1988; 8: 112-113.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento por el envío de sueros al Hospital LosMorales y Servicios de Hematología y Medicina Interna del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba. A los Servicios de Microbiología del Hospital Provincial de Almería, de Medicina Interna del Hospital General Manuel Lois García de Huelva y al C.P.C.TB Ambulatorio San Dionisio de Jerez de la Frontera.