

EVALUACION DEL ENZIMOINMUNOENSAYO PARA EL DIAGNOSTICO RAPIDO DE LA TUBERCULOSIS PAUCIBACILAR DEL ADULTO

LUCIA BARRERA, VIVIANA RITACCO, C. EISELE, J. PALESCHI, A. MONTEVERDE, GABRIELA TORREA, R. NEGRONI, E. PADULA, A. BATTAGLIA, L. J. GONZALEZ MONTANER, ISABEL N. de KANTOR

Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO, OPS/OMS); Instituto Nacional de Microbiología C. G. Malbrán, Buenos Aires; Hospital Vicente López y Planes, General Rodríguez; Hospital A. Posadas, Haedo; Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; Instituto Nacional de Epidemiología J. Jara, Mar del Plata; Hospital A. Cetrángolo, Vicente López

Resumen Se evaluó un enzimoimmunoensayo (EIE) para la detección de anticuerpos IgG circulantes anti-PPD en el diagnóstico de la tuberculosis paucibacilar del adulto. El 73,9% de 142 pacientes bacilíferos y el 52,7% de 93 casos con baciloscopia negativa resultaron seropositivos por EIE. Particularmente en este último grupo la prueba fue positiva en el 55,2% de 58 pacientes diagnosticados por cultivo y en el 48,6% de 35 pacientes con diagnóstico clínico-radiológico de tuberculosis. El 92,7% de 137 sueros de la población control carecía de anticuerpos detectables. En los sujetos sanos que fueron tuberculinizados los resultados del EIE no se relacionaron con la respuesta tuberculínica: el 93,7% (30/32) de los tuberculino negativos y el 95,2% (40/42) de los reactivos a la tuberculina fueron negativos por EIE. Trece de 33 casos de micosis y 5 de 11 pacientes con micobacteriosis no tuberculosa tenían altos niveles de anticuerpos anti-PPD. Ciertamente el EIE tuvo máxima sensibilidad en la detección de casos bacilíferos, no obstante permitió identificar también a más de la mitad de los pacientes con baciloscopia negativa. Por lo tanto, puede ser considerado un método útil para el diagnóstico presuntivo rápido de la tuberculosis paucibacilar, excepto en los casos en los que se plantea el diagnóstico diferencial con micosis o con otras micobacteriosis.

La tuberculosis continúa siendo un importante problema de salud pública mundial, cuya situación epidemiológica se relaciona directamente con el estado económico y social de cada región. En Argentina, como en otros países en desarrollo, gran parte de la población está expuesta a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Las tasas de morbilidad por tuberculosis variaban en 1985 entre 22 y 214 por 100000 habitantes con una media de 52,3¹³, y se ha establecido que es una de las cuatro principales enfermedades infecciosas causantes de muerte junto con la septicemia, la neumonía y la influenza¹⁰.

La medida de mayor impacto para el control de la tuberculosis es la detección de casos, seguida de tratamiento. Ello pone de relieve la necesidad de desarrollar métodos y estrategias que mejoren y hagan más rápida esa detección.

En Argentina, el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis se efectúa, en general, mediante el examen microscópico directo (ED) de la muestra clínica. El cultivo se realiza sólo en laboratorios con cierta complejidad técnica y se reserva especialmente para el estudio de formas extrapulmonares y de tuberculosis infantil, en las que el ED es en general negativo.

Los métodos habitualmente utilizados para el aislamiento de *M. tuberculosis* aportan resultados en forma tardía (3 semanas como mínimo), no alcanzan la sensibilidad suficiente para detectar los casos paucibacilares y obviamente no pueden ser aplicados cuando existen lesiones cerradas de las que no es posible obtener una muestra clínica útil para el estudio bacteriológico.

Si bien el ED y el cultivo son los únicos métodos de certeza en el diagnóstico de la tuberculosis, tienen, como queda expresado, ciertas limitaciones cuya resolución se intenta mediante pruebas complementarias. Cualquier método que se proponga para tal fin debe ser además de rápido y confiable, técnicamente sencillo y de bajo costo. Por ello, la

Recibido: 25-I-1989.

Aceptado: 5-IV-1989.

Dirección postal: Laboratorio de Tuberculosis, CEPANZO (OPS/OMS), C.C. 3092, 1000 Buenos Aires, Argentina.

detección de anticuerpos específicos circulantes fue una de las primeras alternativas exploradas. La presencia de anticuerpos antimicobacterias fue demostrada en el suero de pacientes tuberculosos en forma reiterada desde inicios de este siglo, pero ninguna de las técnicas convencionales evaluadas resultó aceptable para el diagnóstico de la enfermedad¹¹.

En la década del 70, el desarrollo de métodos inmunodiagnósticos de alta sensibilidad estimuló el trabajo de numerosos investigadores en este tema. Desde que en 1976 Nassau et al²⁰ publicaron el primer trabajo de aplicación del enzimoimmunoensayo (EIE) al diagnóstico de la tuberculosis, fueron realizadas numerosas experiencias sobre detección de anticuerpos antimicobacterianos, empleando antígenos obtenidos a partir de *M. tuberculosis* o de BCG⁷. La sensibilidad hallada varió entre 0,55 y 0,95, según la localización y la extensión de la lesión en los casos investigados. Si se reanaliza la sensibilidad para detectar tuberculosis activa, hallada en estudios efectuados en un número adecuado de pacientes, empleando antígenos con diferente grado de purificación^{6, 7}, y se exige para cada prueba una especificidad de 0,95 o mayor, se encuentra que ninguno de esos antígenos demostró ser significativamente superior al resto.

La mayor parte de estas investigaciones ha sido llevada a cabo en países desarrollados. Sólo el grupo de Daniel y col^{1, 3, 8, 19} aplicó el EIE en las condiciones de trabajo existentes en los países con recursos limitados y alta incidencia de tuberculosis. Por otra parte, los casos pulmonares estudiados, han sido en su mayoría bacilíferos. Además, son escasos los estudios que incluyeron formas extrapulmonares y entre ellas no se ha investigado, en particular, la localización pleural que es la más frecuente.

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue determinar el valor diagnóstico del EIE, en las formas de tuberculosis del adulto no detectables por el ED, en las condiciones epidemiológicas y de infraestructura existentes actualmente en Argentina. El estudio se efectuó con la coordinación de CEPANZO y la participación de ocho instituciones nacionales.

Material y métodos

Sueros: fueron analizadas muestras de suero de 416 individuos mayores de 15 años de edad clasificados de la siguiente forma:

a) Sanos (n = 105)

Fueron colectados noventa y dos sueros en un control médico laboral. Se realizó prueba tuberculínica con PPD 2UT sólo en 74 individuos de este grupo. Cuarenta y dos

tuvieron una reacción positiva de más de 10 mm y 32 fueron tuberculino negativos.

Trece sueros correspondieron a contactos de casos bacilíferos citados para control médico.

b) Con patología no tuberculosa (n = 76)

Sesenta y ocho sueros pertenecían a pacientes con enfermedades que podrían requerir diagnóstico diferencial con tuberculosis: 33 casos de micosis, 11 de micobacteriosis (10 debidos al complejo *M. avium* - *intracellulare* y uno a *M. fortuitum*), 22 de neoplasia y 2 de silicosis. Ocho sueros provenían de pacientes con patología de etiología diversa.

c) Con tuberculosis (n = 235)

De 176 casos de tuberculosis pulmonar, 137 fueron diagnosticados por ED, 25 por cultivo y 14 por examen clínico - radiológico.

De 59 casos de tuberculosis extrapulmonar, 5 fueron diagnosticados por ED, 33 por cultivo y 21 por radiología, clínica y/o anatomía patológica. Cuarenta y cinco pacientes tenían localización pleural, 4 meníngea, 4 osteoarticular y 2 renal. Los restantes fueron casos únicos con localización ganglionar, cecal, pericárdica y peritoneal.

Los sueros fueron alicuotados y conservados a -20°C. En el momento de realizar las determinaciones fueron diluidos 1:200 en solución reguladora de fosfatos pH 7.0 (SR) con albúmina sérica bovina fracción V (ASB) 1% y Tween 20, 0.05%.

Antígeno: se empleó PPD 3,7 mg/ml, elaborado en CEPANZO a partir de *M. tuberculosis* cepa H₃₇Rv⁵. La preparación difirió de la del método estandarizado en que la suspensión del cultivo bacteriano, no autoclavado, fue tratada con fenol 1% durante 3 días a 37°C. El antígeno fue alicuotado, liofilizado y conservado a 4°C.

Conjugado: proteína A-peroxidasa (SIGMA Co, St. Louis M.O.), reconstituida en SR-ASB 1% a una concentración de 0,25 mg/ml. Se alicuotó y conservó a -20°C. Se diluyó en la misma SR 1:750 antes de ser utilizada, según lo determinado en titulaciones previas.

Sustrato-cromógeno: se preparó inmediatamente antes de su uso con 200 µl de una solución "stock" 32.9 mg/ml de 2,2'-azinobis (3 etilbenzotiazolin sulfato) (ABTS), 50 µl de H₂O₂ 30 V y 12 ml de solución reguladora de citratos 0,05 M, pH 4.

Enzimoimmunoensayo: las placas de poliestireno (Immunolon II, Dynatech Lab., Alexandria Va) fueron sensibilizadas con 75 µl por hoyo de la solución de antígeno, durante 18 horas a 4°C en cámara húmeda. Después de descartar el exceso de antígeno fueron lavadas durante un minuto, tres veces, con 200 µl por hoyo de SR-ASB 0,1%-Tween 20 0,05%. Cincuenta µl de cada suero diluido según lo indicado fueron incubados por duplicado durante una hora a 37°C. En cada placa se incluyó 3 sueros de referencia con valores de densidad óptica (DO) altamente positivo, límite y negativo y 4 diluciones de un suero positivo. Después de lavar según el procedimiento ya descrito, se colocó en cada hoyo 50 µl del conjugado y se incubó una hora a 37°C. Se lavó nuevamente y se agregó 100 µl del sustrato cromógeno. La reacción enzimática y su revelado se prolongó durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, y se detuvo con 100 µl de ácido fluorhídrico 0,1 M, pH 3,3. Los niveles de anticuerpos fueron expresados en valores de DO, cuantificados con un lector microELISA Dyna-

tech MR 600 a 410 nm. Si existían mínimas variaciones interplaca, los resultados fueron uniformados calibrando el lector según los valores obtenidos con los sueros de referencia. Cada suero fue ensayado al menos en dos oportunidades para asegurar la reproducibilidad de los resultados y se registró el valor promedio de los mismos.

Análisis de datos: se determinó el valor límite entre resultados positivos y negativos en 0,170, equivalente al doble de la DO media de la población control. Se estableció la significación de la diferencia entre los niveles medios de anticuerpos mediante la prueba de t.

Resultados

En la Figura 1 se presenta la distribución de valores de DO y en la Tabla 1 la clasificación de los resultados de los sueros estudiados. La sensibilidad del EIE, aplicado al diagnóstico de 200 casos de tuberculosis confirmados por bacteriología, fue 0,69. El 73,9% (105/142) de los pacientes identificados por ED y el 55,2% (32/58) de los detectados por cultivo resultaron correctamente clasificados.

Con relación a la localización de la tuberculosis de estos casos, el EIE resultó positivo en el 72,2% (117/162) de las formas pulmonares y en el 52,6% (20/38) de las extrapulmonares.

En la Tabla 2 se relacionan los resultados obtenidos por el EIE con los del ED en estos 200 casos. Ambos métodos demostraron tener una sensibilidad muy semejante (0,69 y 0,71 respectivamente). Detectaron simultáneamente el 52,5% (105/200) de los pacientes; el EIE identificó 32 casos adicionales y el ED otros 37. Entre los 32 casos positivos sólo por EIE fue mayor la proporción de localizaciones extrapulmonares (16/32) que entre aquéllos positivos sólo por ED (1/37). El 87% (174/200) de los pacientes resultó positivo por uno o ambos métodos de diagnóstico rápido. Diecisiete de los 35 pacientes (48,6%) con diagnóstico de tuberculosis no confirmada bacteriológicamente tuvieron resultados positivos por EIE.

La especificidad de la prueba, determinada en 137 sueros de la población control fue 0,93. La DO

TABLA 1.— Resultados obtenidos por enzimoimmunoensayo (EIE) aplicado a la detección de anticuerpos IgG anti-PPD en el suero de adultos.

		Número de sujetos estudiados	Positivo n (%)	EIE Negativo n (%)
<i>Pacientes con tuberculosis</i>				
Con	ED (+)			
	Pulmonar	137	101	36
	Extrapulmonar	5	4	1
	Total	142	105 (73,9)	37 (26,1)
Con	ED (—) Cultivo (+)			
	Pulmonar	25	16	9
	Extrapulmonar	33	16	17
	Total	58	32 (55,2)	26 (44,8)
<i>Sin confirmación bacteriológica</i>				
	Pulmonar	14	10	4
	Extrapulmonar	21	7	14
	Total	35	17 (48,6)	18 (51,4)
<i>Grupo control</i>				
	Sujetos sanos	92	6	86
	Otras enfermedades	32	1	31
	Contactos	13	3	10
	Total	137	110 (7,3)	127 (92,7)
	Micosis	33	13 (39,4)	20 (60,6)
	Micobacteriosis no tuberculosa	11	5 (45,5)	6 (54,5)

ED: Examen microscópico directo.

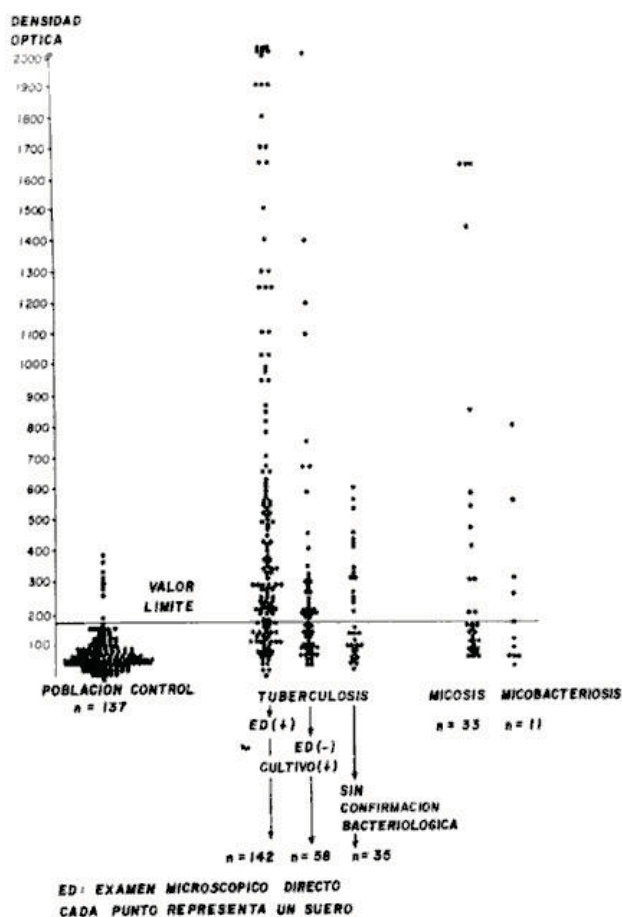


Fig. 1.— Niveles de anticuerpos circulantes IgG anti PPD determinados por enzimo-inmunoensayo en adultos. Buenos Aires, 1987-1988.

TABLA 2.— Relación entre los resultados obtenidos por enzimo-inmunoensayo (EIE) y por examen microscópico directo (ED) en 200 pacientes adultos con tuberculosis diagnosticada bacteriológicamente.

EIE	Resultados ED		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	105	32	137
Negativo	37	26	63
Total	142	58	200

media de los individuos sanos tuberculino negativos ($0,090 \pm 0,067$) no fue significativamente diferente de la de los tuberculino positivos ($0,082 \pm 0,064$, $p > 0,1$), ni de la correspondiente a los contactos de pacientes tuberculosos ($0,145 \pm 0,114$, $p >$

$0,1$). Trece de los 33 sueros de pacientes con micosis (39,4%) y 5 de 11 muestras de pacientes con micobacteriosis (45,5%) fueron clasificados como positivos por EIE.

Discusión

La prueba aquí descripta resultó de ejecución sencilla, con empleo de antígeno y reactivos de fácil obtención. Se comprobó su reproducibilidad y una correlación casi total entre la lectura visual y la instrumental, lo que permitiría su aplicación en laboratorios de infraestructura de baja complejidad. Por otra parte el EIE es ya utilizado en muchos centros asistenciales de Argentina para el diagnóstico de otras enfermedades infecciosas, por lo que se cuenta con la capacidad técnica básica para su aplicación a la detección de anticuerpos antimicobacterias.

El EIE aquí evaluado demostró tener máxima sensibilidad cuando se aplicó al estudio de casos bacilíferos de tuberculosis, diagnosticados por el ED. No obstante, permitió además identificar más de la mitad de los pacientes cuya confirmación diagnóstica se obtuvo tardíamente mediante el cultivo. El hecho de que un alto porcentaje de estos casos positivos por EIE y negativos por ED hayan tenido localización extrapulmonar, destaca la posible utilidad del método para reforzar el criterio diagnóstico e iniciar con celeridad el tratamiento específico, en formas que generalmente son más severas y tienen secuelas más graves que las pulmonares.

Se detectaron anticuerpos anti-PPD en casi la mitad de los pacientes con diagnóstico de tuberculosis no confirmado bacteriológicamente. Si se considera hipotéticamente, que sólo uno de cada dos de estos pacientes fueran verdaderos casos de tuberculosis, la prevalencia de la enfermedad en este grupo sería del 50%. Como se trata de casos no bacilíferos, es posible que la sensibilidad real del EIE en esta población se aproxime a la determinada para los casos con ED negativo, es decir 0,55. Con estas presunciones, e incorporando al cálculo una especificidad de 0,93, el valor predictivo positivo del EIE —porcentaje de casos de tuberculosis entre todos los pacientes positivos por EIE— sería cercano al 89%. Ello significa que si bien un resultado negativo no excluye la existencia de enfermedad, un resultado positivo tiene valor diagnóstico alto.

Los adultos sanos, reactivos a la prueba tuberculínica, fueron negativos por EIE. Este hecho había sido descripto con anterioridad por otros autores, en países con bajo^{16, 18, 23}, intermedio^{1, 9}, o con alto riesgo de infección³.

Se ha sugerido que similitudes entre antígenos micobacterianos y tumorales serían responsables de reactividad cruzada¹¹. En los casos de neoplasia investigados en el presente estudio no se obtuvo evidencia de tal tipo de reacción. En cambio el EIE no resultó apto para diferenciar tuberculosis de otras micobacteriosis ni de micosis. Cinco de 11 pacientes con micobacteriosis no tuberculosa presentaron altos niveles de anticuerpos anti-PPD, lo cual confirma observaciones previas de otros autores que aplicaron el EIE utilizando PPD^{16, 22} y antígenos purificados²¹. La prevalencia de otras micobacteriosis con relación a la tuberculosis es menor del 0,5% en Argentina², lo cual resta significación a esta limitación en la especificidad del EIE.

En contraste con las observaciones de Kalish et al¹⁶, también hemos hallado positividad en el EIE en gran parte de los casos de micosis investigados. En el presente estudio sólo se incluyeron pacientes de micosis sin antecedentes de tuberculosis, y en los cuáles esta enfermedad fue investigada y descartada, por lo que quedó eliminada la posibilidad de asociación morbosa (tuberculosis-micosis) como causa de la respuesta serológica cruzada. Si bien la relación numérica de los casos de micosis broncopulmonares con respecto a los de tuberculosis es baja en Argentina (menor del 5% estimativamente) estos hallazgos exigen un mayor estudio futuro.

Los avances introducidos en el área de la inmunología y la biología molecular han creado nuevas expectativas en el logro de una mayor especificidad en las pruebas serodiagnósticas¹⁷. Se ha intentado detectar inmunoglobulinas capaces de reaccionar con epitopes específicos del bacilo tuberculoso mediante el uso de antígenos altamente purificados, y con pruebas de competición con anticuerpos monoclonales^{4, 12, 14, 15}. Sin embargo, es relativamente bajo el porcentaje de pacientes con tuberculosis poco avanzada que presentan niveles detectables de anticuerpos altamente específicos. Por el contrario, pareciera que la respuesta humoral está dirigida, en mayor medida, contra antígenos comunes a diferentes especies del género *Mycobacterium* y a otros géneros relacionados. Además se ha puesto en evidencia con estas experiencias, que la respuesta humoral tendría características propias en cada individuo. En definitiva, todavía no se cuenta con antígenos de alta especificidad y amplia aplicación para el serodiagnóstico de la tuberculosis.

En tales condiciones, consideramos que el EIE aquí evaluado, puede ser de utilidad como método rápido de diagnóstico, complementario de la baciloscopia, en las formas pulmonares incipientes, y extrapulmonares de la tuberculosis. Debe tenerse

en cuenta, sin embargo, que el mismo no permite el diagnóstico diferencial con micosis ni con otras micobacteriosis.

Summary

Evaluation of an enzymeimmunoassay for the rapid diagnosis of adult tuberculosis

The ELISA has been extensively evaluated as a sero-diagnostic method for tuberculosis. However, there is scarce information about its application to cases that cannot be diagnosed by microscopic examination: those with closed lesions or undergoing early stages of the disease. Since a reliable serological test might substantially contribute to their prompt detection, the objective of the present study was to determine the diagnostic value of an ELISA applied to adult smear-negative cases of tuberculosis. Sera from 235 patients with active tuberculosis —176 pulmonary and 59 extrapulmonary cases— and 181 control subjects were tested for IgG antibodies to PPD by ELISA. Eleven cases of non tuberculous mycobacterial (MOTT) disease and 33 cases of mycosis were also included in this group. With the adopted cut-off value, 73,9% (105/142) of smear positive and 52,7% (49/93) of smear negative tuberculosis cases, were correctly classified. Particularly in the latter, the test was positive in 55,2% (32/58) of patients with positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis* and in 48,6% (17/35) of patients diagnosed by clinical, radiological and/or histopathological findings. No antibody activity was demonstrated in 92,7% of sera from the control population which included 92 healthy volunteers, 32 non tuberculous diseased subjects and 13 household contacts of smear-positive cases. Among those control subjects who were skin tested, ELISA results were not related to the tuberculin reactivity: 93,7% (30/32) of tuberculin negative and 95,2% (40/42) of tuberculin positive healthy individuals had no detectable antibodies. However, the assay did not provide helpful discrimination between tuberculosis and MOTT or fungal diseases: thirteen out of 33 sera from patients with mycosis and 5 out of 11 samples from MOTT disease cases strongly reacted to PPD antigen by ELISA. Certainly, the test yielded higher sensitivity when applied to the study of patients with advanced smear-positive tuberculosis. Nevertheless, it did identify more than half of the cases which could not be detected by microscopic examination. Therefore, the ELISA might have a potential use as a rapid presumptive diagnostic test in patients with suspected tuberculosis long before culture results are available. It is necessary to consider, anyhow, that differential diagnosis with non tuberculous mycobacterial and fungal diseases is not possible using PPD as antigen in this kind of assay.

Agradecimientos: Nuestro reconocimiento a los Doctores E. Abatte y E. Palma Beltrán, de la Unidad Docente de Tisiopneumología, Universidad de Buenos Aires, al Dr. R. J. Gastaminza, Jefe de Neumología del Hospital de Gral. Rodríguez y a todos los profesionales que colaboraron con el análisis de las historias clínicas de los pacientes. También deseamos agradecer a los Dres. Gladis Amadio,

(Hospital Tránsito Cáceres de Allende, Córdoba) y Omar Latini (Instituto Nacional de Epidemiología E. Coni) quienes nos proveyeron las muestras de sueros de pacientes de micobacteriosis, como asimismo a la Sra. Delia Alcázar por su excelente colaboración técnica.

Bibliografía

1. Balestrino EA, Daniel TM, de Latini MDS et al: Serodiagnosis of pulmonary tuberculosis in Argentina by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for IgG antibody to *M. tuberculosis* antigen 5 and tuberculin purified protein derivative. *Bull WHO*, 62: 755, 1984.
2. Barrera L, Kantor IN: Nontuberculous mycobacteria and *Mycobacterium bovis* as a cause of human disease in Argentina. *Trop Geogr Med* 39: 222, 1987.
3. Benjamin RG, Daniel T: Serodiagnosis of tuberculosis using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5. *Am Rev Respir Dis* 126: 1013, 1982.
4. Bothamley G, Udani P, Rudd R et al: Humoral response to defined epitopes of tubercle bacilli in adult pulmonary and child tuberculosis. *Eur J Clin Microb Inf Dis* 5: 639, 1988.
5. Centro Panamericano de Zoonosis (OPS/OMS): Preparación y estandarización de tuberculinas PPD. Nota Técnica Nº 17 (Rev 1) Ramos Mejía, Buenos Aires, 1980.
6. Daniel TM: Antibody and antigen detection for immunodiagnosis of tuberculosis: Why not? What more is needed? Where do we stand today? *J Infect Dis* 158: 678, 1988.
7. Daniel TM, Debanne SM: The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked-immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis* 135: 1137, 1987.
8. Daniel TM, de Murillo GL, Sawyer JA et al: Field evaluation of enzyme-linked-immunosorbent assay for the serodiagnosis of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 134: 662, 1986.
9. González Montaner JL, Alde SLM, Mosca CA: Perfil inmunológico humoral en pacientes con tuberculosis. *Respiración* 1: 19, 1986.
10. Giacomini HF: Perfiles de salud. Argentina, 1980-82. *Bol Epid OPS* 9: 2, 1988.
11. Grange JM: The humoral immune response in tuberculosis: its nature, biological role and diagnostic usefulness. *Adv Tuberc Res* 21: 1-78, 1984.
12. Huygen K, Van Vooren JP, Turneer M et al: Specific lymphoproliferative gamma interferon production and serum immunoglobulin G directed against a purified 32 kDa mycobacterial protein antigen (P32) in patients with active tuberculosis. *Scand J Immunol* 27: 187, 1988.
13. Instituto nacional de Epidemiología "E. Coni": Tuberculosis en la República Argentina. Mortalidad y Morbilidad. 1973-1986. Documento EP 7/88. Santa Fe, 1988.
14. Ivanyi J, Krambovitis E, Keen M: Evaluation of a monoclonal antibody (TB 72) based serological test for tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 54: 337, 1983.
15. Jackett PS, Bothamley GH, Batra HV et al: Specificity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 26: 2313, 1988.
16. Kalish SB, Radin RC, Phair JP et al: Use of an enzyme-linked immunosorbent assay technique in the differential diagnosis of active tuberculosis in humans. *J Infect Dis* 147: 523, 1983.
17. Kantor IN de: Algunas novedades sobre un viejo conocido: el bacilo tuberculoso (Editorial), *Medicina (Bs. Aires)* 48: 321, 1988.
18. Kardjito T, Handoyo I, Grange JM: Diagnosis of active tuberculosis by immunological methods. The effect of tuberculin reactivity and previous BCG vaccination on the antibody levels determined by ELISA. *Tubercle* 63: 269, 1982.
19. Ma Y, Wang YM, Daniel TM: Enzyme-linked immunosorbent assay using *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in China. *Am Rev Respir Dis* 134: 1273, 1986.
20. Nasaau E, Parsons ER, Johnson GD: The detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microparticle enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Tubercle* 57: 67, 1976.
21. Reggiardo Z, Vázquez E: Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and hemagglutination test using mycobacterial glycolipids. *J Clin Microbiol* 13: 1007, 1981.
22. Zeiss CR, Kalish SB, Erlich KS et al: IgG antibody to purified protein derivative by enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 130: 845, 1984.
23. Zeiss CR, Radin RC, Williams JE et al: Detection of immunoglobulin G antibody to purified protein derivative in patients with tuberculosis by radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 15: 93, 1982.