

Tesis de Maestría en Biología Molecular

Diagnóstico serológico de tuberculosis. Evaluación de la determinación de anticuerpos libres y a complejos anti-proteínas recombinantes de *Mycobacterium tuberculosis*

Universidad Nacional de San Martín –ANLIS “Carlos Malbrán

2008

Directora: María Susana Imaz

**Autor: Schmeling María Fernanda
INER “E. Coni” -ANLIS**

**Mail: ferdinandasch@yahoo.com.ar
labconi@yahoo.com.art**

Agradecimientos:

A la Dra Susana Imaz, por su paciencia, enseñanzas y sobre todo a su generosidad en el tiempo dedicado a esta tesis.

A mí Familia, por apoyarme siempre.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	3
INTRODUCCION	5
Historia natural de la enfermedad.....	6
Formas de tuberculosis más frecuentes.....	8
Respuesta inmune del huésped.....	9
Inmunidad celular.....	10
Inmunidad humoral.....	12
Diagnóstico microbiológico.....	12
Métodos diagnósticos no convencionales.....	12
Pruebas serológicas: alcances y limitaciones actuales.....	15
Características del antígeno 5 (38 kDa phoS).....	16
Características del antígeno 16 (Ag 16).....	17
Características del antígeno del Complejo 85.....	17
OBJETIVOS	18
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Pacientes.....	18
Antígenos micobacterianos.....	20
Disociación de inmunocomplejos y preparación de anticuerpos.....	20
Estandarización del enzimoimmunoensayo (EIE)	20
EIE para anticuerpos libres anti-ACF.....	22
EIE para la determinación de anticuerpos disociados.....	22
Cuantificación de anticuerpos.....	22
Análisis de datos.....	23
RESULTADOS	23
Estandarización del EIE con antígenos recombinantes y anticuerpos libres.....	24
Niveles de anticuerpos.....	27
Determinación de valores de corte del EIE.....	31
Resultados EIE con antígenos recombinantes y antígenos de cultivo filtrados.....	31
Heterogeneidad del reconocimiento antigénico.....	34
Combinación de los resultados individuales de los distintos ensayos.....	35
Análisis de EIE utilizando una mezcla de antígenos.....	36

DISCUSIÓN.....	41
REFERENCIAS.....	47

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1.....	25
Tabla 2.....	33
Tabla 3.....	35
Tabla 4.....	39
Figura 1.....	24
Figura 2.....	25
Figura 3.....	27
Figura 4.....	28
Figura 5.....	29
Figura 6.....	30
Figura 7.....	37
Figura 8.....	40

RESUMEN

El diagnóstico de tuberculosis (TB) no es sencillo de realizar. Los signos clínico-radiológicos no son específicos y la distinción de otras enfermedades como micosis o micobacteriosis puede ser dificultosa. Si bien la baciloscopia de esputo es útil y tiene alto valor predictivo, una proporción de pacientes con TB pulmonar (pTB) y la mayoría de aquellos con TB extrapulmonar (epTB) son baciloscopia negativa. El cultivo provee el diagnóstico de certeza de la enfermedad, es específico y más sensible que la baciloscopia, pero requiere al menos 3 semanas para la obtención de un resultado y tiene requerimientos de bioseguridad más exigentes. Entre las pruebas complementarias que se han investigado, las técnicas serológicas aparecieron como herramientas muy prometedoras para la detección temprana de TB, debido a su sencillez, rapidez y costo-efectividad. En un principio, estas pruebas se realizaban usando antígenos semipurificados, que contenían epitopes con reactividad cruzada, lo que conducía al desarrollo de pruebas con una especificidad relativamente pobre. El uso de antígenos purificados permitió solucionar parcialmente este problema, incrementado en forma importante la especificidad pero a costas de un descenso en la sensibilidad de las pruebas. La falta de respuesta serológica en una gran proporción de pacientes, que conduce a estos pobres niveles de sensibilidad, ha sido atribuida principalmente a dos factores: (i) la formación y circulación de complejos inmunes específicos no detectables por los enzimoimmunoensayos (EIE) regulares, realizados con sueros y (ii) la variación de reconocimiento antigénico de persona a persona. Por otro lado, parece claro que la utilización de antígenos específicos del complejo tuberculosis es un requisito primordial para la obtención de una prueba confiable.

En este trabajo se evaluó la utilidad para el diagnóstico de TB de la determinación de anticuerpos libres y disociados de complejos inmunes por EIE empleando tres proteínas recombinantes previamente caracterizadas como inmunogénicas en humanos: el antígeno de 38kDa (Ag 38kDa), el antígeno de 16kDa (Ag 16) y el antígeno B del complejo proteico de Antígeno 85 (Ag 85B), las que fueron evaluadas tanto en forma individual como combinadas en un solo pocillo de la microplaca de ELISA. Se emplearon muestras de suero de: i) 161 pacientes con TB: 50 pTB baciloscopia/cultivo positivo (pTBb+), 60 pTB con dos baciloscopia consecutivas negativas (pTBb-), 51 epTB; ii) 114 muestras de pacientes con otras patologías: 14 micobacteriosis, 14 micosis pulmonares, 82 otras enfermedades, 4 lepra; iii) 100 personas clínicamente sanas (100).

Empleando los antígenos recombinantes individuales la sensibilidad de la prueba varió en un rango de 25% a 42% para anticuerpos IgG libres y la especificidad lo hizo desde 93% a 96%. Al considerarse la contribución de la determinación de los anticuerpos disociados a los libres contra cada antígeno individual, la sensibilidad se incrementó hasta un 55%. El mejor aporte en la sensibilidad fue observado para los casos de pTB paucibacilar. El número de antígenos serológicamente reactivos, varió ampliamente de individuo a individuo. En un determinado suero, el nivel de anticuerpos específicos varió según el antígeno, independientemente del número total de antígenos reconocidos

por este suero y esta heterogeneidad fue evidenciada no solamente para los anticuerpos libres sino también por aquellos anticuerpos acomplejados. La combinación de los resultados individuales a los antígenos 38kDa, Ag 16 y Ag 85B para anticuerpos tanto libres como disociados permitió la obtención de niveles de sensibilidad y especificidad de 76% y 83%, respectivamente. Cuando se estudió la actividad serológica de los tres antígenos colocados en el mismo pocillo de la placa de EIE, los niveles de sensibilidad obtenidos (63%) fueron menores a los esperados en base a la combinación de los resultados individuales (76%), mientras que los niveles de especificidad fueron elevados aun para los grupos controles de micosis y micobacteriosis. Se evidenció que niveles altos de reactividad a un solo antígeno eran suficientes para dar un resultado positivo cuando se empleaba ese mismo antígeno en una mezcla. En cambio, algunos sueros de pacientes con TB y controles que mostraban baja reactividad para uno o más antígenos perdieron su positividad cuando se emplearon las mezclas. En conclusión, encontramos que ninguna de las proteínas recombinantes evaluadas, por sí sola, fue reactiva con la mayoría de los sueros de pacientes tuberculosos, ni siquiera después de considerar la contribución de la medición de anticuerpos disociados de complejos inmunes; el uso de mezclas de antígenos mejoró significativamente la utilidad del EIE como técnica complementaria para el diagnóstico de la enfermedad, permitiendo la identificación de casi un 70% de los pacientes con pTBb-, con una alta especificidad, especialmente en el grupo de enfermedades incluidas en el diagnóstico diferencial, como micosis o micobacteriosis.

Estos hallazgos son promisorios y permiten presumir que el empleo de antígenos recombinantes específicos adicionales podría conducir a la detección de anticuerpos libres y disociados de la mayoría de los pacientes con TB activa. Además, la observación acerca de que altas reactividades séricas frente a un antígeno son suficientes para mantener su positividad cuando se emplean mezclas de antígenos, mientras que algunas reactividades bajas hacia uno o más antígenos se pierden cuando estos sueros se enfrentan a las mezclas, tiene importantes implicancias prácticas para el diseño de combinaciones de antígenos que permitan incrementar la capacidad diagnóstica de una prueba serológica; por tanto para una buena caracterización de un determinado antígeno sería muy valioso que los estudios acerca de su reactividad evaluaran no sólo la proporción de pacientes tuberculosos positivos, sino también la proporción de los sueros con alta reactividad frente al antígeno en cuestión.

INTRODUCCIÓN

Desde que Chopin, Dostoiewski, Keats, Allan Poe, Voltaire y otros muchos padecieron y murieron de tuberculosis, la dolencia fue tema de interés en el campo de las Letras, destacando Thomas Mann con “La Montaña Mágica”, Cela con “Pabellón de Reposo”, y más recientemente Manuel Rivas, en “O Lapis do Carpinteiro” retoma el viejo tema de la belleza tísica. A causa de la evolución de las ciencias, la enfermedad dejó de pertenecer a almas románticas y pasó a ser una enfermedad de los cuerpos.

Al hallazgo del germen causal comunicado por Koch en Berlín el 24 de marzo de 1882, siguieron múltiples estudios y descubrimientos (1)

La tuberculosis (TB) continúa siendo un importante problema de salud pública en el mundo. Se estima que anualmente mueren por TB cerca de dos millones de personas, siendo una de las causas más comunes de muerte atribuible a un único agente infeccioso. Aproximadamente un tercio de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tuberculosis*) y entre ocho y diez millones de personas desarrollan la enfermedad cada año (2). En Argentina, desde 1980, la tasa de mortalidad por TB mantiene una tendencia descendente. Durante 2005 ocurrieron 837 defunciones; de las mismas, 114 (13,8 %) estuvieron asociadas a infección con Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). También la tasa de notificación de casos de TB ha sufrido una disminución desde 60,5 a 28,4 casos por cada 100.000 habitantes, informándose durante 2006 un total de 11.068 casos nuevos de todas las formas de tuberculosis (3,4). Sin embargo, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), durante 2006 la tasa de detección de casos nuevos fue sólo cercana al 61% del total de casos estimados (2). En este sentido, el principal objetivo del Programa Nacional de Control de Tuberculosis (PNCTB) en Argentina, conducido por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) “Emilio Coni”, Santa Fe, es diagnosticar los pacientes en un estadio temprano de la enfermedad y tratarlos efectivamente utilizando la estrategia de Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES) que se encuentra en proceso de expansión.

Historia natural de la enfermedad

La TB es una enfermedad infectocontagiosa granulomatosa crónica, causada por organismos del complejo *M. tuberculosis* que comprende las siguientes especies: *M. tuberculosis*, agente de la enfermedad humana, *Mycobacterium bovis*, el agente de la enfermedad en ganado, *Mycobacterium africanum*, reponsable de una proporción variable de casos de tuberculosis humana en África central y *Mycobacterium microti*, el agente de la enfermedad en roedores (5,6).

El mecanismo de transmisión más importante y el que causa la casi la totalidad de los contagios es la vía aérea. La transmisión de la enfermedad se lleva a cabo cuando una persona inhala uno o más bacilos contenidos en el núcleo de una gotita de Pflüge, que es el material infectante que un paciente bacilífero nebuliza, especialmente, al toser. Las microgotas más grandes (>10 μm), aunque son las que llevan mayor número de micobacterias, debido a su gran peso sedimentan o impactan en la vía aérea superior, y por lo tanto no son infecciosas. Otro grupo de microgotas aerosolizadas, con un tamaño de 5-10 μm , alcanzan las vías aéreas más proximales, sin que aquí encuentre el bacilo condiciones idóneas para su multiplicación. Sin embargo, las microgotas de 1-5 μm , formadas por la condensación de las anteriores, al perder parte de su contenido en agua, que contienen aproximadamente entre 1 y 5 bacilos cada una, son las realmente infecciosas, al poder llegar y depositarse en la región alveolar. La zona de llegada es, lógicamente, la zona mejor ventilada del pulmón, o sea, la región subpleural del lóbulo medio. Es en esta parte del pulmón, donde *M. tuberculosis* encuentra las condiciones ideales para reproducirse por su elevada tensión de oxígeno (7).

La llegada del bacilo de Koch a los alvéolos produce una inflamación inespecífica, inicialmente de grado mínimo, caracterizada por hiperemia, edema, e infiltración de polimorfonucleares neutrófilos. A las 48 horas aparece la respuesta de células mononucleares, constituida por macrófagos residentes en el pulmón. Los macrófagos alveolares fagocitan el germen, y lo transportan a los ganglios linfáticos hiliares. Las micobacterias se multiplican libremente dentro de los macrófagos, pudiendo llegar a destruirlos liberándose en el medio extracelular. Algunos bacilos son transportados por circulación linfática o dentro de los macrófagos a los ganglios hiliares y del mediastino; desde allí se vacían a la sangre venosa y se diseminan por todo el organismo produciendo las llamadas siembras orgánicas de la TB. Hoy se acepta que durante la primera infección se produce siempre una bacteriemia silenciosa, mediante la cual el bacilo se siembra en uno u

otro órgano dependiendo de la tensión de oxígeno que en él encuentre; así, se explicaría el desarrollo de tuberculosis en la metafisis de los huesos en la etapa del crecimiento o en órganos genitales durante la pubertad (8).

Sin embargo, no todas las personas que reciben la visita del bacilo contraerían la infección. En algunos casos el germen puede ser destruido por las defensas naturales innatas, las que no le darían muchas oportunidades de multiplicarse. No se sabe aún si esto depende del momento inmunitario del individuo, de la carga antigénica o de otros factores desconocidos.

Una vez producida la primera infección, en la mayoría de los casos el bacilo queda encapsulado en pequeños focos que no progresan ni determinan enfermedad; sólo sabemos que el individuo ha sido infectado, es decir que tiene bacilos tuberculosos vivos que se encuentran en un estado latente en alguna parte del organismo. Se estableció que alrededor de un 10% de las personas infectadas por *M. tuberculosis* tienen riesgo de enfermar durante su vida; en la mitad de las veces tempranamente determinando las llamadas TB posprimarias y en la otra mitad de los casos más tardíamente produciendo la TB de reactivación endógena (8). No se conoce en forma precisa cual es el mecanismo íntimo por el cual un individuo pasa de infectado a enfermo y sólo se saben algunos factores que pueden favorecer este evento: i. los factores que dependen del bacilo, como virulencia, ii. otros que dependen del ambiente como intensidad y duración de la exposición y iii. los factores que dependen del huésped como son: edad, sexo, genética, desnutrición, tratamiento con inmunosupresores y la co-infección con VIH.

En los primeros cinco años que siguen a la primera infección se presenta la tuberculosis posprimaria. En los países con alta prevalencia de TB, la mayoría de las formas de la enfermedad proviene de las siembras posprimarias tempranas, pulmonares o extrapulmonares. Estas siembras pueden tener diferentes tiempos de maduración en los distintos órganos antes de producir las diversas formas de la enfermedad, como son pleuresía tuberculosa, linfadenitis, tuberculosis osteoarticular, genitourinaria, entre otras.

En la reactivación endógena, la enfermedad se produce a partir de focos latentes derivados de siembras posprimarias ocurridas hace muchos años atrás. Además, la tuberculosis puede también adquirirse debido a reinfecciones exógenas, que ocurren como consecuencia de nuevas infecciones que se presentan en sujetos infectados anteriormente. En conclusión se puede progresar a enfermedad a partir de la primoinfección misma. También pueden quedar bacilos latentes en un equilibrio inestable en lesiones activas pero subclínicas, para activarse en cualquier momento de la vida, según varíen las condiciones inmunitarias del

organismo. Además, cualquier individuo que se defendió bien de la primera infección, puede desarrollar la enfermedad frente a una reinfección que lo sorprende en otro momento inmunitario.

Formas de tuberculosis más frecuentes

Tuberculosis pulmonar de tipo adulto

Es la forma más frecuente de la TB en los países de alta prevalencia, la más contagiosa y la principal causa de muerte. Puede aparecer poco después de la primoinfección como una manifestación más de las siembras hematógenas posprimarias, también puede aparecer como resultado de una reactivación endógena de un foco tuberculoso dormido o como consecuencia de una reinfección exógena. Las formas de presentación más frecuentes de la TB pulmonar suelen combinar una mezcla de manifestaciones sistémicas inespecíficas y respiratorias. Los síntomas sistémicos, consisten en astenia, decaimiento, fatiga, pérdida de peso, sensación febril y malestar general. Los síntomas respiratorios son más orientadores, tos, expectoración mucopurulenta (con eliminación de bacilos cuando se expectora) y hemoptisis, que sigue siendo un signo importante de la TB pulmonar.

Tuberculosis infantil

Puede presentarse con manifestaciones sistémicas inespecíficas como por ejemplo: febrículas, tos, expectoración, disminución del apetito, compromiso ganglionar y ocasionalmente irritación meníngea. El diagnóstico muchas veces es difícil debido a que no presenta una expresión radiológica definida. La bacteriología tampoco ayuda demasiado al diagnóstico ya que la mayoría de las veces se trata de lesiones cerradas con escasa población bacilar en pacientes que tienen poca expectoración.

Tuberculosis extrapulmonar

Las formas extrapulmonares de TB derivan de las siembras hematógenas secundarias a la infección. Constituyen aproximadamente el 20% de todos los casos de esta afección y las formas más frecuentes son pleuresía y adenitis tuberculosa seguidas por la TB genitourinaria, osteoarticular, miliar y meningitis tuberculosa. La evolución de la pandemia de Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), entre cuyas complicaciones se destacan las formas diseminadas y extrapulmonares de TB, sin duda ha alterado las frecuencias de las diversas presentaciones clínicas de esta enfermedad. El diagnóstico de la TB extrapulmonar plantea un

importante problema, ya que las poblaciones bacilares son reducidas, asentadas en órganos relativamente inaccesibles, lo que hace más difícil la confirmación bacteriológica (8).

Respuesta inmune del huésped

Inmunidad innata

La respuesta inmune frente a la infección por bacilos es muy variable, dependiendo principalmente del bagaje genético del individuo, de su edad, de sus condiciones nutricionales y del ambiente biológico que lo rodea. En la TB pulmonar, el *M. tuberculosis* ingresa al organismo por vía aérea y alcanza a los alvéolos. La llegada del *M. tuberculosis* hasta el espacio alveolar significa que ha superado la barrera mucociliar del tracto respiratorio; sin embargo, ahora se enfrenta a los macrófagos (MA) que constituyen la primera línea de defensa y este primer contacto es crucial ya que va definir el control de la infección por inmunidad innata o el desarrollo de la respuesta inmune específica. Los bacilos tuberculosos se encuentran en la región alveolar con tres tipos de células que potencialmente se oponen a la infección: los macrófagos alveolares, en la luz y las células “natural killer” (NK) y los linfocitos T gamma/delta ($\gamma\delta$) en el parénquima pulmonar. El papel de las células NK parece ser poco relevante en las fases iniciales de la infección e incluso se ha demostrado que determinados lípidos micobacterianos modulan negativamente la función de esta estirpe celular, mientras que el de los linfocitos T $\gamma\delta$ es más controvertido, y no se ha podido demostrar hasta el momento que cumplan en el humano ninguna función importante durante la primoinfección. Por ello, en humanos, los MA alveolares con alta capacidad para generar oxígeno reactivo, particularmente H_2O_2 con óxido nítrico sintetasa, van a ser las células clave en la interacción inicial con el bacilo de la tuberculosis, aunque también participan en los mecanismos innatos de defensa las células dendríticas, los neutrófilos, las células epiteliales, las células alveolares y factores solubles como la mucina, lisosima, etc. (9-12). Estas defensas, alcanzarían el control de la infección antes de desarrollar la respuesta inmune adquirida.

Las micobacterias, son fagocitadas inespecíficamente por los MA residentes no activados, que tratan de controlar la infección. Si se tiene en cuenta que los MA no se encuentran “primados” por citocinas linfocitarias y que varios componentes de las micobacterias inhiben los sistemas bactericidas de estas células, se puede comprender que en esta fase predomine el crecimiento bacteriano. Prácticamente todos los mecanismos

bactericidas macrofágicos son anulados por productos derivados de las micobacterias. En este momento es importante mencionar los mecanismos que utiliza *M. tuberculosis* como estrategia para escapar de los mecanismos inmunológicos y sobrevivir dentro del MA (11):

- la inhibición de la fusión de los fagosomas y lisosomas (11), causada principalmente por los glicolípidos bacterianos,
- la liberación, en caso de que ocurra la unión del fagosoma y el lisosoma, de grandes cantidades de amonio, las que alcalinizan el contenido intralisosomal, inactivando muchas enzimas microbicidas del macrófago (13-15),
- la producción de catalasa micobacteriana que destruye el peróxido de hidrógeno y de diversos componentes micobacterianos que inhiben la generación de superóxido, y
- la exportación de lípidos desde el interior de la micobacteria hacia la pared celular, lo que juega un papel crucial en la evasión a la respuesta inmune de los macrófagos (16).

Esta fase termina con la destrucción de los MA y el crecimiento intracelular de los bacilos. La resistencia natural a la infección radica, fundamentalmente, en esta fase.

Los bacilos llegan así por vía linfática, hacia los ganglios regionales, en los que tiene lugar la respuesta inmunológica del organismo a la infección. Para ello, y pesar de las estrategias utilizadas por la micobacterias, la fagocitosis puede ser exitosa, y así la micobacteria es incluida en un fagosoma, destruida en el fagolisosoma por enzimas lisosomales y algunos de sus antígenos (Ags) son procesados y presentados junto al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) a linfocitos T CD4+ y CD8+; por ello, los MA, además de ser células efectoras funcionan como células presentadoras de antígenos (CPA) y pueden definir el curso de la respuesta de inmunidad adaptativa. Este es el paso de transición entre la respuesta de inmunidad innata a la respuesta de inmunidad adaptativa, que consiste en el reconocimiento específico entre diferentes células y la secreción de factores solubles como las citocinas y quimiocinas (17).

Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa, que es la respuesta específica, comprende la inmunidad celular y la inmunidad humoral.

Inmunidad celular

El control de la infección o de los bacilos tuberculosos requiere principalmente del desarrollo de una respuesta celular del tipo Th1 con la participación de los MA, los linfocitos

T CD4+, TCD8+ y T γ δ , y la producción de citocinas como IL-2, IFN- γ , IL-12 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). La inmunidad celular es generada cuando los linfocitos T CD4+ ($\alpha\beta$ TCR) reconocen antígenos de *M. tuberculosis* provenientes del fagosoma que son presentados por los MA en el contexto de moléculas CMH II. Como resultado de esto, los linfocitos TCD4+ son activados y comienzan a producir IFN- γ , con capacidad de incrementar la función microbicida de los MA. Por otra parte, los MA liberan principalmente otras dos citocinas, **i.** la IL-1, que promueve la producción de IL-2 y la expresión del receptor para IL-2 con la subsecuente expansión clonal de los linfocitos T CD4+ y **ii.** la IL-12, que induce la producción de IFN- γ , la proliferación de linfocitos T CD4+ y aumenta la citotoxicidad de los linfocitos CD8+ y las células NK (13,18).

Además de los linfocitos CD4+ y las células NK, otra fuente importante de IFN- γ la constituyen los linfocitos T CD8+ ($\alpha\beta$ TCR), los cuales reconocen antígenos micobacterianos en el contexto de moléculas CMH I con funciones citotóxicas sobre las células infectadas a través de un mecanismo dependiente de gránulos (2,19,20).

Otra citocina importante en la respuesta inmune celular contra *M. tuberculosis* es el TNF- α , mediador principal de la respuesta inflamatoria aguda frente a microorganismos intracelulares. Una de las funciones más importantes del TNF- α , es la de inducir la formación del granuloma; para lo cual provoca la expresión de “las quimiocinas”, que son factores que reclutan células del sistema inmunológico (linfocitos, monocitos (MN) y neutrófilos) para la formación del granuloma al sitio de infección (21). Así, el granuloma, es una estructura defensiva muy eficaz, suficiente para limitar o controlar la infección, desarrollando un medio anaeróbico en el cual los bacilos no pueden sobrevivir (22-24). Cumplido su papel defensivo, este acúmulo de células inflamatorias puede reabsorberse, o bien se organiza dejando cicatrices fibrosas que pueden contener desde material caseoso y cretáceo, hasta calcificaciones. Sin embargo, cuando la respuesta inmune se demora, las micobacterias alcanzan una población considerable y la concentración de células inflamatorias es muy elevada, el tejido se daña, produciendo extensas áreas de necrosis caseosas y posteriormente ese caseum es licuado por enzimas proteolíticas y eliminado, dejando paso a la formación de cavernas que son la principal fuente de progresión y cronicidad (8). La diseminación del bacilo es consecuencia de una falla en la formación de granuloma, debido a que no hay producción de las citocinas (principalmente TNF α) y las quimiocinas involucradas en este proceso, lo que da lugar a que los MN/MA se conviertan en células permisivas dentro de las cuales se multiplica la micobacteria (19).

Inmunidad humoral

La respuesta inmunitaria humoral no es protectora frente a la infección tuberculosa y generalmente puede asociarse con anergia cutánea; y elevada población bacilar. Sin embargo, los pacientes con una muy deficiente inmunidad celular generalmente presentan una pobre respuesta humoral; ambos mecanismos se hallan altamente relacionados aunque la respuesta mediada por células no ocurre simultáneamente con la producción de anticuerpos (25).

La respuesta humoral en TB es **heterogénea**, esto es, los niveles de anticuerpos y el número de antígenos reconocidos por los pacientes varía fuertemente de un individuo a otro (25). Esta variación en el reconocimiento es el resultado de múltiples factores como los antecedentes inmunogenéticos del huésped infectado y el estadio de la enfermedad; así, por ejemplo, cuando aparecen lesiones cavitarias, el *M. tuberculosis* expresa ciertos antígenos que no son expresados en estadios tempranos de la infección (26). Además, en presencia de grandes concentraciones de antígenos, es decir cuando las poblaciones bacilares son numerosas, aumentaría la síntesis de anticuerpos, con la consiguiente formación de inmunocomplejos circulantes que tendrían una acción depresora sobre la inmunidad celular (8).

Diagnóstico microbiológico

El diagnóstico de TB no es sencillo; los signos clínicos y cambios radiológicos incrementan la sospecha de tuberculosis, pero la distinción con enfermedades como, cáncer de pulmón o histoplasmosis, entre otras, puede ser dificultosa. La radiología, es una técnica diagnóstica complementaria, que requiere de un alto entrenamiento y experiencia por parte del profesional médico para su interpretación y aun en las mejores condiciones presenta menor especificidad que la bacteriología (7).

El diagnóstico de tuberculosis recae fundamentalmente en el examen bacteriológico de muestras clínicas. La piedra angular del diagnóstico de la TB pulmonar en el laboratorio es el examen microscópico directo de las muestras de esputo sometidas a técnicas de tinción adecuadas para la detección de bacilos de la tuberculosis (baciloscopia). Esta técnica es simple, rápida, de bajo costo, puede diagnosticar alrededor de un 70% de los casos y es de un alto valor predictivo positivo; además es una técnica útil para el monitoreo del tratamiento; sin embargo presenta una sensibilidad limitada, ya que para que una muestra sea positiva a la baciloscopia se requieren alrededor de 5000-10000 bacilos por mililitro, y sólo una

proporción de los pacientes con TB presentan tan alta concentración bacilar. Por otro lado, el método de cultivo, que provee el diagnóstico de certeza de la enfermedad, es específico y más sensible que la baciloscopia, permitiendo aumentar el rendimiento del diagnóstico bacteriológico (hasta un 30-50% de los casos confirmados); además el cultivo también provee el material necesario para la prueba de susceptibilidad a medicamentos antimicobacterianos. Presenta como desventaja que el resultado de un cultivo en medio sólido a base de huevos se obtiene en forma tardía (como mínimo 3 semanas), es más costoso y requiere un espacio dentro del laboratorio para la preparación de medios de cultivos, así como un personal altamente entrenado y condiciones de bioseguridad adecuadas (27,28).

En comparación con los métodos de cultivo convencionales, los sistemas que monitorean automáticamente botellas en las que se cultivan muestras de pacientes, permiten disminuir a la mitad el tiempo necesario para detectar el desarrollo del bacilo. Estos medios contienen algún sensor que cambia de color o emite fluorescencia cuando el bacilo consume O₂ o libera CO₂ (los sistemas comerciales que se ofrecen en Argentina son BACTEC-960 y MB/Bact) (7). Por otro lado el equipo BACTEC-460 que utiliza medios de cultivo con una fuente marcada radioactivamente, está en proceso de reemplazo por los inconvenientes que originan el empleo y desecho del material radioactivo. Una vez evidenciado el desarrollo del bacilo, los equipos BACTEC permiten detectar con precisión la resistencia a drogas antituberculosas, en la mayor parte de los casos, en el transcurso de una semana; sin embargo poseen como desventaja el importante incremento de los costos (29).

Métodos diagnósticos no convencionales

En los últimos años, se han propuesto diversas metodologías alternativas para el diagnóstico que incluyen técnicas cromatográficas, determinación de la enzima adenosín deaminasa (ADA) en líquidos de punción, metodologías moleculares y serológicas. La Cromatografía Gaseosa, que permite detectar los ácidos grasos constitutivos de la pared celular de la micobacteria y los productos de degradación de ácidos micólicos, es una técnica rápida y de alto valor predictivo. Presenta como desventaja que es una prueba de alta complejidad con equipamiento caro y es necesario contar con personal altamente capacitado (30).

La técnica de ADA se utiliza como prueba complementaria en el diagnóstico de pleuresía tuberculosa. No detecta ningún componente específico ni del bacilo ni de la respuesta inmune en TB, sino que un valor elevado de ADA es el reflejo de la presencia de

linfocitos T activados que producen la enzima en el líquido de punción. La presencia aumentada de esta enzima en una muestra de líquido pleural claro, con predominio de linfocitos, puede contribuir al diagnóstico, si es posible descartar por los signos e imagen radiológica algunas otras enfermedades que también pueden estimular la producción de esta enzima tales como linfoma o neoplasias (31-33).

Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos son un conjunto de técnicas, cuyo principal exponente es la denominada PCR (polymerase chain reaction) que, mediante la mutiplicación de segmentos específicos del material genético del microorganismo permiten su detección e identificación. Se ha demostrado que aplicando procedimientos estrictos, estas técnicas pueden resultar de utilidad para el diagnóstico de casos de TB a partir de muestras respiratorias (esputo, lavado bronquial) de pacientes sospechosos sin historia de tratamiento previo por TB. En muestras baciloscopia positiva, su utilidad reside sólo en la capacidad de diferenciar la presencia de M tuberculosis de otras micobacterias. Por otro lado, se ha evidenciado que aún en las mejores condiciones de aplicación, existe riesgo de generar falsos resultados positivos, por lo cual un resultado positivo a partir de una muestra respiratoria baciloscopia negativa debe ser confirmado procesando una nueva muestra del paciente durante otro día. Además, dado que estas técnicas pueden resultar negativas en pacientes con TB confirmada por cultivo o con diagnóstico clínico, no pueden ser utilizadas para descartar la enfermedad. Los organismos de regulación de EEUU y Europa aún no han aprobado el uso de estas pruebas para el diagnóstico de TB extrapulmonar. Por otro lado, es importante recalcar que la evidencia actual indica que su sensibilidad para el diagnóstico de casos extrapulmonares es menor que para el de casos pulmonares. Un metaanálisis reciente (34), muestra de la sensibilidad de los métodos moleculares comerciales es inferior a la del cultivo, lo que sumado a la ocurrencia de falsos positivos, la necesidad de equipamiento y condiciones edilicias especiales, constituyen importantes limitaciones para su empleo en laboratorios de rutina (35-38).

Los métodos serológicos, por otro lado, están usualmente basados en la detección de anticuerpos libres solubles circulantes contra antígenos de micobacterias. La identificación de los antígenos más apropiados para el diagnóstico de TB, ha sido motivo de estudio durante muchos años y existe aun, un largo camino por recorrer (39-41). Se trata de métodos simples, rápidos, de bajo costo, reproducibles, confiables y relativamente no invasivos, por lo que desde el inicio de su desarrollo han sido vistos como **técnicas complementarias** muy atractivas para el diagnóstico de TB.

Pruebas serológicas: alcances y limitaciones actuales

La existencia de anticuerpos antimicobacterianos fue demostrada en sueros de pacientes con TB en forma reiterada desde hace más de un siglo. En 1898 Arloing reportó la primer prueba serológica para tuberculosis; durante las décadas siguientes, se evaluaron numerosas técnicas serológicas, pero con resultados poco exitosos debido a las reacciones cruzadas que se presentaban como consecuencia de los antígenos utilizados. 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 y col (42) publicaron el primer trabajo de enzimoimmunoensayo (EIE) aplicado al diagnóstico de TB, comenzaron a sucederse numerosas experiencias para la detección de anticuerpos empleando antígenos obtenidos a partir de *M. tuberculosis* o BCG. Los diferentes antígenos utilizados comprendieron desde células sonicadas (43,44), cultivos filtrados (45,46), antígenos de proteínas purificados (47) así como numerosos lípidos de la pared celular (48-50), hasta los actuales antígenos recombinantes.

Hasta ahora, las pruebas serológicas no han sido usadas de rutina en el diagnóstico de TB; una de las principales razones es la baja sensibilidad y especificidad de varios de los antígenos probados. En los primeros años, estos ensayos fueron realizados con antígenos semipurificados. Sin embargo estos antígenos contenían epitopes con reactividad cruzada con otras especies bacterianas, lo que daba lugar a reacciones de baja especificidad. La especificidad ha sido incrementada utilizando antígenos purificados pero desafortunadamente a costa de la persistencia de una baja sensibilidad (40).

El conocimiento actual de la respuesta humoral durante la TB, evidencia que la producción de anticuerpos no estaría dirigida contra un sólo antígeno, sino que se trataría de una **respuesta heterogénea**; mientras en la TB post-primaria se cree que los anticuerpos estarían dirigidos contra antígenos secretados, en la TB primaria, se postula que la respuesta humoral estaría dirigida contra moléculas citoplasmáticas (40). Además, el repertorio de anticuerpos producidos durante la enfermedad es muy diverso; sueros de diferentes personas son reactivos con diferentes antígenos, lo que reflejaría que para un correcto serodiagnóstico posiblemente se requiera de múltiples antígenos para cubrir la amplia respuesta de anticuerpos (51). Sin embargo, independientemente del uso de antígenos simples o combinados, un porcentaje de pacientes con TB, presenta escasa respuesta o ausencia de anticuerpos específicos contra cualquiera de los antígenos evaluados. Tales resultados falsos

negativos podrían ser explicados por la ausencia de la detección de anticuerpos libres mediante los EIE regulares a causa de la formación de inmunocomplejos (IC), como ya se ha reportado (52-54). La formación de IC esta presente en una gran cantidad de enfermedades autoinmunes (Lupus, Tiroiditis de Hashimoto, Hemofilia y de origen infeccioso como es la TB. Así, trabajos recientes han evidenciado que los métodos basados en la determinación de anticuerpos específicos libres y acomplejados en suero pueden ser estrategias válidas para aumentar la sensibilidad de las técnicas serológicas (55,56).

El desarrollo de reactivos requiere de gran cantidad de antígenos. La purificación de antígenos de *M. tuberculosis* es dificultosa debido a su alta virulencia y a la poca producción de células, asociada a la velocidad de crecimiento lento del bacilo. Una potencial solución del problema es la producción de antígenos recombinantes en organismos tales como *Escherichia coli* (E.Coli).

Por otro lado, parece claro que la utilización de antígenos específicos del complejo TB es un requisito primordial para la obtención de una prueba confiable. Entre los antígenos específicos más frecuentemente estudiados se hallan el antígeno de 38kDa (Ag 38kDa), el antígeno de 16kDa (Ag 16) y el complejo proteico de Antígeno 85.

Características del antígeno 5 (38 kDa phoS)

El antígeno 5 (38kDa phoS) es una lipoproteína extracelular específica del complejo TB, involucrada en el metabolismo del fosfato; según los resultados de diversos estudios serológicos, la especificidad de la proteína de 38kDa utilizada para la detección de anticuerpos libres, fue de aproximadamente 98%, mientras que la sensibilidad varió entre 45-80% (40,41,57). Los genes que codifican la expresión de este antígeno han sido clonados y secuenciados, y la proteína recombinante fue expresada en *E. coli* (58,59). El Ag 38kDa, presenta epitopes específicos para *M. tuberculosis* denominados TB71 y TB72, altamente inmunogénicos. Los anticuerpos anti-38kDa, están presente fundamentalmente en TB avanzadas, recurrentes y crónicas, es decir que el nivel de su producción depende de la carga bacteriana o de ciertos eventos asociados a estadios avanzados de la enfermedad (57). Este antígeno se encuentra en una concentración diez veces menor en *M. bovis* BCG que en *M. tuberculosis*; en personas sanas vacunadas con BCG en áreas endémicas (60,61) se ha demostrado una escasa respuesta para este antígeno. Además, en pacientes coinfectados con VIH-TB, la respuesta de anticuerpos anti 38kDa fue escasa (62).

Características del antígeno 16 (Ag 16)

La molécula citosólica de 16 kDa de *M. tuberculosis* mostró ser potencialmente útil para la detección de pacientes con examen directo de esputo negativo. El Ag 16 ha sido secuenciado y se encontró homología estructural con proteínas que integran la familia de las proteínas del shock térmico de bajo peso molecular (63). Como en el caso del Ag 38kDa se ha sugerido que su antigenicidad específica de “especie micobacteriana” no reside en la molécula completa sino en sus epitopes inmunodominantes (64). Este antígeno es altamente inmunogénico en etapas tempranas de la infección y en tuberculosis primarias (40,64). En Argentina, se realizó una prueba de EIE para determinar su valor diagnóstico en la TB infantil; se obtuvo una especificidad del 95% con una sensibilidad máxima alcanzada de 43% (65).

Características del antígeno del Complejo 85

El complejo proteico del antígeno 85, es fuertemente inmunogénico en infecciones por micobacterias tanto naturales como experimentales, induciendo respuesta humoral y celular (66). Es uno de los antígenos excretados más tempranamente por el *M. tuberculosis*, induciendo una importante respuesta linfoproliferativa. Cuando *el M. tuberculosis* está reproduciéndose, este complejo es una de las proteínas que se hallan en mayor concentración en el medio de cultivo. Actúa como micolico transferasa y como tal, juega un papel importante en la síntesis de la pared celular y el crecimiento del bacilo. Este antígeno fue estudiado en forma intensiva por diferentes investigadores, obteniéndose valores de sensibilidad desde un 41% a 94%. Aun cuando se ha observado la presencia de antígenos con homología al antígeno 85 en micobacterias no patógenas y corinebacterias (67), se ha sugerido que su inmunogenicidad, al igual que en el caso de los antígenos 38kDa y Ag 16, está asociada a la presencia de epitopes serodominantes específicos del complejo TB (68). El complejo se halla formado por tres proteínas 85A (32kDa), 85B (30kDa) y 85C (32,5 kDa). La proteína 85C es cuantitativamente menor y la respuesta de anticuerpos para Ag 85A y Ag 85B en suero de pacientes es significativamente mayor que para Ag 85C. Los genes para Ag 85A y Ag 85B han sido identificados tanto en *M bovis* BCG (69) como en *M. tuberculosis*. Distintos ensayos serológicos utilizaron Ag 85A y Ag 85B, con una sensibilidad aproximada del 70% (70). Además, se ha descrito que este antígeno circula por sangre formando un gran complejo junto con Inmunoglobulinas G y fibronectina del plasma (71). La respuesta a la proteína 85B, fue hasta ahora la más valorable en el diagnóstico de TB, ya que cuando se

utilizó la proteína 85A como antígeno se obtuvieron títulos elevados tanto en pacientes tuberculosos como en controles sanos (72,73).

OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo fueron:

- Evaluar el potencial diagnóstico de la determinación de anticuerpos libres y disociados de complejos inmunes en sueros de pacientes con TB y en subgrupos de controles, empleando en forma individual tres proteínas recombinantes previamente caracterizadas (Ag 38kDa, Ag 16 y Ag 85B).
- Evaluar el potencial diagnóstico de la determinación de anticuerpos libres y disociados de complejos inmunes en sueros de pacientes con TB y en subgrupos de controles, empleando los tres antígenos antes mencionados combinados en un solo pocillo de la microplaca de EIE.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

Se obtuvieron un total de 375 muestras de sueros, según los siguientes grupos de pacientes:

- (i) Pacientes tuberculosos. Se estudiaron ciento sesenta y un (161) muestras de sueros de pacientes VIH negativos (rango de edad 16-70 años, 60% hombres). Ciento diez de las muestras provenían de pacientes con TB pulmonar (**pTB**) y 51 muestras de pacientes con TB extrapulmonar (**epTB**) En el grupo pTB, 50 muestras correspondían a pacientes con TB baciloscopía y cultivo positivo (**pTBb+**) y 60 muestras de pacientes con dos baciloscopía consecutivas negativas (**pTBb-**); 47 de ellos con cultivo positivo y lesión activa de radiografía de torax y 13 pacientes con cultivo negativo, los cuales habían sido diagnosticado por clínica y radiografía, con mejoramiento clínico luego del tratamiento antituberculoso. La localización extrapulmonar de los casos incluyó pleura (28 pacientes), tracto urinario (5 pacientes), localización diseminada (5

pacientes), meningitis (4 pacientes) tejido linfático (4 pacientes), peritoneo (2 pacientes), pericardio (2 pacientes), hueso (1 paciente). En el momento en que se tomaron las muestras de suero los pacientes no habían iniciado el tratamiento antituberculoso.

(ii) Controles. Se incluyeron doscientos catorce muestras de sueros de individuos VIH negativos, los que fueron subdivididos en los siguientes grupos:

a. Pacientes con micobacteriosis y micosis (PMM): Este grupo estaba constituido por 28 pacientes (rango de edad: 23-61 años, porcentaje de hombres: 58%) con enfermedades pulmonares usualmente consideradas en el diagnóstico diferencial de tuberculosis, micobacteriosis y micosis. Se incluyeron 14 pacientes con enfermedades pulmonares producidas por micobacterias no tuberculosas (MNT) (complejo *Mycobacterium avium*, diez pacientes; *Mycobacterium abscessus*, dos pacientes; *Mycobacterium fortuitum*, dos pacientes), y 14 pacientes con micosis pulmonares (paracoccidiodimicosis, diez pacientes; aspergilosis, dos pacientes; histoplasmosis, dos pacientes).

b. Pacientes con otras enfermedades distintas a micosis y micobacteriosis (POE): Este grupo estuvo compuesto por pacientes en los que inicialmente se sospechaba TB pero en quienes fue confirmado otro diagnóstico. Incluyó a 82 pacientes (rango de edad: 16-78 años, porcentaje hombres: 54%) cuyos diagnósticos fueron; neumonía, 48 pacientes; cáncer de pulmón, 2 pacientes; asma, 2 pacientes y enfermedades no respiratorias, 30 personas (síndrome nefrótico, 6 personas; abscesos por estafilococos, 2 personas; fallo cardíaco, 11 personas; meningitis bacteriana aguda, 11 personas). Todos los pacientes controles con síntomas respiratorios fueron evaluados por radiología; aquellos con tos productiva fueron evaluados por estudios bacteriológicos para TB. Setenta y un pacientes tenían historia de vacunación BCG.

c. Personas clínicamente sanas (PCS): Este grupo incluyó a 100 pacientes aparentemente sanos (rango de edad: 15-69 años, porcentaje de hombres: 51%) que concurrieron a un laboratorio para realizarse controles de rutina. Estos pacientes presentaron valores normales tanto en los análisis de sangre de rutina como en los exámenes clínicos. Noventa y cinco de estos pacientes tenían historia de vacunación BCG.

- d. Pacientes con lepra Este grupo incluyó a cuatro pacientes con lepra (rango de edad: 36-46, porcentaje de hombres: 75%).

Antígenos micobacterianos

Los antígenos de un cultivo filtrado (ACF) de *M. tuberculosis* obtenidos según se describió previamente (74) fueron provistos por el CEPANZO. Para ello se utilizó un cultivo de *M. tuberculosis H37Rv* realizado en medio Dorset Henley. Después de un período de incubación de 8 semanas, el mismo fue tratado con fenol al 1% a 37° C durante 3 días y filtrado a través de membrana de celulosa. El filtrado fue precipitado con ácido tricloroacético (4%) y redisoluto en un buffer salino de fosfato (BSF) pH 8 a una concentración de 2mg/ml.

Los antígenos recombinantes 38kDa, Ag 16 y Ag 85B fueron provistos por Lionex GmbH, Alemania. Las proteínas recombinantes unidas a una cadena de polihistidinas, se expresaron en *E.coli* y se purificaron por cromatografía de afinidad con Níquel (75).

Disociación de inmunocomplejos y preparación de anticuerpos

La disociación de inmunocomplejos (IC), se realizó tal como se describió previamente (56). A 100 µl de suero se le adicionaron 100 µl de BSF (1:1). Luego se le agregó (200 µl) de polietilenglicol (PEG 6000) al 5% en BSF (PEG-BSF) y la mezcla fue incubada a 4°C durante toda la noche. Después de la incubación, se centrifugó a 1500g durante 20 minutos; el precipitado fue lavado dos veces con solución de PEG-BSF al 2,5%, resuspendido en 200 µl de BSF con 10mM EDTA a pH 7,4 e incubado por 30 minutos a 37°C. Después de su redisolución, se agregaron 600µl de una solución de Glicina – HCl (0,2 M) (pH 6,8) fría, y se incubó durante 15 minutos a 4° C. La mezcla se neutralizó con 50µl de una solución de K₂HPO₄ (1M) pH 9, después de lo cual se le adicionaron 2,35ml de solución de BSF con albúmina al 1%, dando una dilución final de 1:32. Las muestras así preparadas fueron utilizadas para Enzimoimmunoensayo (EIE) dentro de los 30 minutos.

Estandarización del enzimoimmunoensayo.

El pH óptimo de adsorción de los antígenos a las placas de poliestireno (utilizadas como fase sólida de este EIE) fue determinado utilizando como soluciones para la disolución del antígeno buffer carbonato 0,05 M pH 9,6 y buffer salino de fosfatos 0,02 M pH 7,2.

Para estudiar la concentración óptima de antígeno a utilizar para la sensibilización de la fase sólida se realizó una titulación empleando una mezcla de sueros de pacientes con TB confirmada bacteriológicamente (utilizado como control positivo) y una mezcla de sueros de pacientes aparentemente sanos (utilizado como control negativo). Siguiendo las concentraciones de sensibilización publicadas por otros autores (51, 76-79) se realizó una curva **dosis-respuesta** empleando 4 concentraciones diferentes del antígeno (0,5, 1, 2, 4 $\mu\text{g/ml}$ de cada antígeno). Para ello, se sensibilizaron microplacas Immulon II (Dinatech Laboratory, Alexandria, VA), fondo plano, con 75 μl de una solución del antígeno diluido en buffer carbonato o fosfato. Después de una incubación de 16 hs a 4°C en cámara húmeda, las placas fueron lavadas 3 veces durante 1 minuto con BSF-0,1% Albúmina Sérica Bovina (ASB) -0,05% de Tween-20, bloqueadas durante 1 hora a 37°C con 100 μl de BSF -5% ASB e incubadas durante 1h a 37°C con 50 μl de diluciones seriadas (de 1:50 a 1:800) de una mezcla de sueros positivos y negativos. Las diluciones de los sueros fueron realizadas en BSF -1% ASB-0,05% Tween-20. Después de 3 lavados de 1 minuto, las placas fueron incubadas durante 1 h a 37°C con anticuerpo anti IgG humana marcado con peroxidasa (SIGMA CHEMICAL) diluido 1:2000-1:16.000 en BSF 1% ASB. Después de los lavados, se colocaron 100 μl de una solución de 3, 3',5 ,5' Tetrametil bencidina (TMB) en presencia de peróxido de hidrógeno utilizada como sustrato y se incubó durante 15 minutos. La reacción fue detenida por adición de 100 μl de H_2SO_4 2 N y se determinó la Absorbancia a doble lectura (450 ηm -620 ηm) utilizando el lector de microplacas Dynatech MR250.

Para el inicio de la puesta a punto de la técnica, se utilizó como solución de bloqueo un BSF al que se adicionó un 5% de ASB. Para determinar la concentración óptima del bloqueante se emplearon soluciones con ASB en concentraciones de 1 %, 2,5% y 5%.

Cada muestra fue probada por duplicado en cuadrantes opuestos. Para evaluar la reproducibilidad intra-ensayo se determinó el coeficiente de variación de cada muestra calculado como $\text{CV \%} = \text{SD} / \text{X} \times 100$, donde X es la media de las dos lecturas y SD es la desviación estándar. Se consideró que la variación intra-ensayo era aceptable si el CV % de cada muestra no superaba el 5%.

EIE para la determinación de anticuerpos libres anti-ACF

Los niveles de anticuerpos libres fueron determinados como fue descrito previamente, con modificaciones menores (74). Las microplacas fueron sensibilizadas con ACF diluido a una concentración de 25 µg/ml en 0,05M buffer carbonato, pH 9,6 e incubado toda la noche a 4° C. Después de la incubación, los posibles sitios reactivos libres fueron bloqueados por incubación durante 1h a 37° C con BSF-ABS al 1%. Las muestras de suero fueron diluidas 1:200 en 1% de leche descremada – BSF con la adición de 0,05% de Tween–20. Para revelar los complejos inmunes se empleó Proteína A conjugada con peroxidasa (Sigma Chemical Co;St Louis, MO,USA), 2,2 –azino –bis (3-ethylbenzthiazolin –6-sulfonicacid) (ABTS) y peróxido de hidrógeno, la reacción se detiene con ácido fluorhídrico 0,1M pH 3,3 y se lee 410 nm .

EIE para la determinación de anticuerpos disociados

Para la determinación de anticuerpos disociados, las muestras fueron diluidas 1:32 en ASB-BSF sin Tween-20 como fue descrito anteriormente (Sección **Preparación de los anticuerpos disociados de los complejos inmunes**). Con el fin de eliminar la posible existencia de uniones inespecíficas, para cada muestra estudiada y cada antígeno evaluado, se adicionaron 50 µl de la muestra de inmunocomplejos (diluida como se indicó previamente), tanto a un pocillo de la placa sensibilizada (placa con antígeno) (preparada como se indicó en las secciones “**Estandarización del EIE para la determinación de anticuerpos libres con antígenos recombinantes**” y “**EIE para la determinación de anticuerpos libres anti-ACF**”), como a un pocillo de la placa no sensibilizada, la que previamente fue bloqueada con ASB (placa sin antígeno).

Cuantificación de los anticuerpos libres o acomplexados

Para la cuantificación de los anticuerpos se incluyeron en cada placa seis pocillos en los que se colocaron una muestra de suero de referencia diluida al medio desde 1:50 a 1:1600. Los títulos de cada muestra incógnita fueron determinados en relación a los de la muestra de suero de referencia usando el “método de línea de la referencia con punto único”. Así, se realizaron curvas dosis-respuesta en las que se graficaron los valores de absorbancia de las diluciones del suero de referencia en el eje de las Y contra 2log de los títulos sueros de referencia en el eje de las X. Se utilizó el método de los cuadrados mínimos para generar una

línea recta, que se consideró aceptable si la correlación entre A450y log de las diluciones fue $\geq 0,95$ (80). Los valores considerados desviados de la recta fueron omitidos. Para anticuerpos libres el valor de absorbancia de cada muestra fue transferido a la línea recta de la curva para obtener el título en unidades enzimáticas (ue)/ml. Para anticuerpos disociados de inmunocomplejos, el valor de absorbancia de cada muestra fue calculado sustrayendo el valor de la absorbancia de cada muestra en pocillos sin antígenos de la absorbancia de cada muestra en pocillos con antígenos; el valor de absorbancia de cada muestra calculado así fue transferido a la curva para obtener ue/ml.

Todas las muestras fueron realizadas en duplicados cada día y al menos dos veces en diferentes días para verificar la reproducibilidad de los resultados.

Análisis de datos

La comparación de la distribución de títulos anticuerpos y la frecuencia de positividad entre los grupos de pacientes fue realizada usando la prueba de la U de Mann-whitney y la prueba de χ^2 , respectivamente. El grado de significación de la diferencia entre las frecuencias de positividad obtenidas con cada par de pruebas fue estudiado usando la prueba de Mc Nemar. La correlación entre los niveles de anticuerpos libres y acomplejados contra cada uno de los antígenos fue estudiada por el análisis de Regresión de Pearson. El nivel de concordancia de la respuesta a diferentes antígenos en los mismos pacientes fue investigado usando el estadístico Kappa, un método que corrige el acuerdo debido al azar. La sensibilidad y especificidad fue calculada por métodos standard (81).

RESULTADOS

Estandarización del EIE para la determinación de anticuerpos libres con antígenos recombinantes

Condiciones de pH óptimas para la adsorción del antígeno

En la Figura 1 se observa que los valores de Absorbancia obtenidos utilizando el control positivo son mayores cuando el Ag16 es inmovilizado con buffer carbonato, lo que indica una mayor adsorción de este antígeno a pH alcalino. Aunque, en esta figura se representan los valores de absorbancia obtenidos cuando se utilizó 4 $\mu\text{g/ml}$ de Ag16 en la

solución de sensibilización, esta observación se repitió cuando se empleó este antígeno a las concentraciones de 2, 1 o 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

Por otro lado, cuando se empleaba BSF pH 7,2, la proporción de malos duplicados (es decir aquellas muestras cuyo CV (%) superaba el 5%) alcanzó el 13%, 6%, 6% y 4% para las placas en las que se empleó 4, 2, 1 y 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de antígeno respectivamente en tanto que fue del 0% cuando se usó buffer Carbonato pH 9,6 como diluyente.

Aunque en la figura se representan los valores cuando se empleó Ag16, la observación acerca de la mayor adsorción del antígeno a la fase sólida a pH alcalino se repitió tanto para el Ag 38kDa como para el Ag 85B.

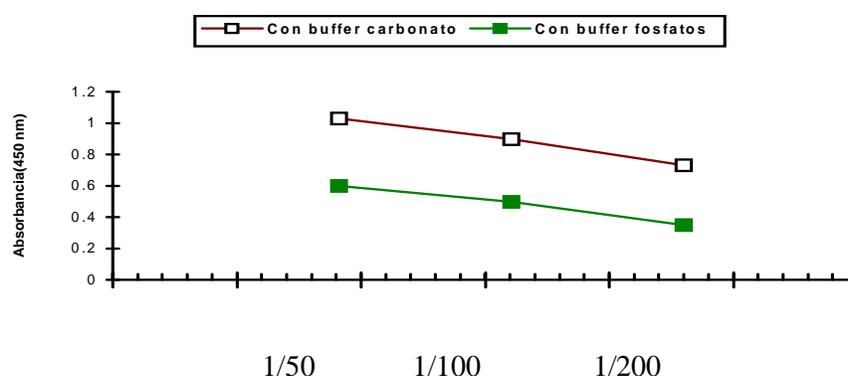


Figura 1: Condiciones de pH óptimas para la adsorción del antígeno recombinante. Las placas Immulón II se incubaron durante 18 hs a 4°C con una solución de 4 $\mu\text{g/ml}$ de antígeno recombinante preparada en buffer Carbonato pH 9,6 y buffer fosfatos pH 7,2. Después de los lavados, se incubó con diluciones de una mezcla de sueros positivos (de 1/50 a 1/200). La inmunoglobulina sérica unida al antígeno recombinante fue revelada por agregado de un conjugado anti IgG humana según se describe en Materiales y Métodos.

Concentración óptima del antígeno recombinante para la inmovilización

La curva dosis-respuesta para la mezcla de sueros de pacientes con TB mostró que la máxima sensibilidad, es decir la mayor pendiente de la curva, se alcanza a concentraciones de alrededor de 2 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 2). Mayores concentraciones del antígeno fallan en producir una señal mayor, posiblemente debido a la superposición de moléculas de antígeno sobre sí mismas y no sobre el soporte. En estas condiciones, las moléculas de antígeno, que se hallan levemente unidas a otra molécula, se despegan durante el período de bloqueo de la placa por lo que la cantidad de antígeno inmovilizado resulta menor.

Se grafican los valores de Absorbancia (450 nm) obtenidos para distintas diluciones de una mezcla de sueros positivos utilizando diferentes concentraciones del Ag16 como sensibilizante. Dado que los resultados fueron similares para cada antígeno empleado sólo se graficó una curva.

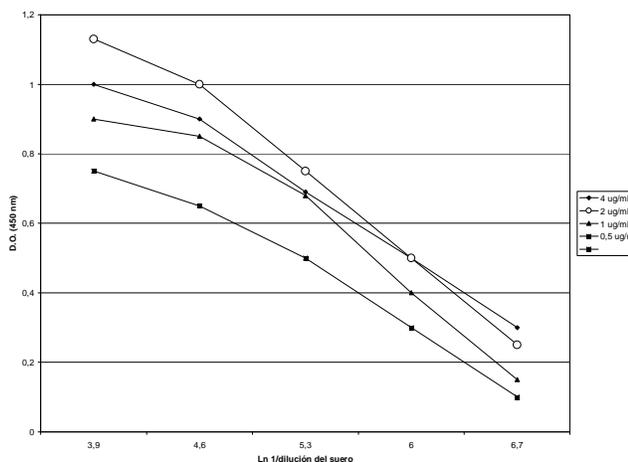


Figura 2: Representación de los valores de absorbancia a 450 nm obtenidos por EIE empleando distintas concentraciones del antígeno recombinante de 16 kDa como sensibilizante. Las placas Immulón II se incubaron durante 18 hs a 4°C con soluciones de 0,5, 1, 2 y 4 µg/ml del antígeno recombinante. Después del bloqueo y lavados de las placas, se incubó a 37°C con diluciones de una mezcla de sueros positivos (de 1/50 a 1/800). La inmunoglobulina sérica unida al antígeno recombinante fue revelada por agregado de un conjugado anti IgG humana según se describe en Materiales y Métodos.

Concentración óptima de albúmina durante el bloqueo

Para el inicio de la puesta a punto de la técnica, se utilizó como solución de bloqueo una solución bufferada de fosfatos a la que se adicionó un 5% de ASB. Para determinar la concentración óptima del bloqueante se emplearon soluciones con ASB en concentraciones de 1%, 2,5% y 5%.

Tabla 1: Concentración óptima de albúmina durante el bloqueo empleando Ag16 como sensibilizante

		Absorbancia 450 nm		
		Albúmina al 1%	Albúmina al 2,5%	Albúmina al 5%
Suero positivo	1:50	1,200	1,220	1,150
	1:100	1,030	1,000	1,100
	1:200	0,850	0,830	0,800
Suero Negativo	1:50	0,220	0,180	0,250
	1:100	0,105	0,080	0,110
	1:200	0,065	0,025	0,070

Como se ve en la tabla, el aumento de la concentración de ASB por encima de 1 % durante la etapa de bloqueo no altera los valores de Absorbancia obtenidos con las distintas muestras, por lo cual se consideró que una concentración de ASB al 1% era suficiente para bloquear los sitios reactivos remanentes luego de la sensibilización.

Dilución óptima de suero y conjugado

La selección de la dilución óptima del suero y conjugado fue realizada sobre la base de encontrar aquella concentración en la que se minimice su unión inespecífica a la placa, pero se obtengan señales elevadas para las muestras en que se encuentran los anticuerpos en alta concentración. Se probaron en un esquema tipo damero, diluciones de sueros positivos y negativos desde 1/50 a 1/800 y diluciones de conjugado desde 1/3000 a 1/24.000 empleando como sensibilizantes los antígenos 38kDa, Ag 16 y Ag 85B a las concentraciones de 2 µg/ml. Para la selección de la dilución óptima de suero y conjugado, se consideraron los siguientes criterios:

- Absorbancia del control de PBS
< 0,1.
- Absorbancia del control negativo
< 0,2.
- Absorbancia de control positivo
fuerte > 0,9.

Bajo estas condiciones se decidió que la dilución óptima de suero era de 1/100 mientras que la de conjugado era de 1:6000.

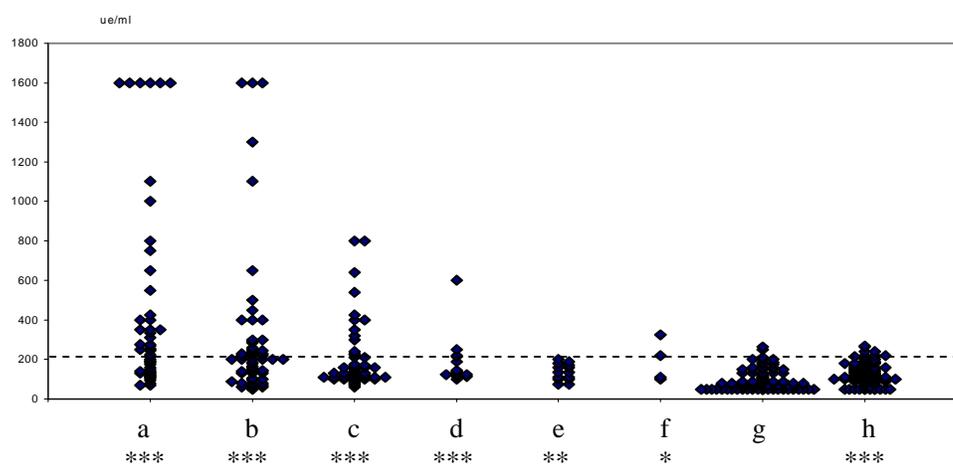
En resumen, para la realización del EIE empleando antígenos recombinantes, las microplacas fueron cubiertas con antígenos recombinantes diluido a una concentración de 2 µg/ml en 0,05M buffer carbonato, pH 9,6 e incubadas toda la noche a 4°C. Después de esta incubación, los posibles sitios reactivos remanentes fueron bloqueados con ASB al 1% en BSF durante 60 minutos a 37° C. Los sueros fueron diluidos 1:100 en 1% ASB-BSF con el agregado de 0,05% de Tween-20 y 50µl de esta dilución se adicionaron en cada pocillo de la placa sensibilizada con antígenos. Después de una incubación durante 60 minutos a 37°C, las placas fueron lavadas tres veces y se agregaron a cada pocillo 50µl de conjugado anti -IgG humano marcado con peroxidasa diluido 1: 6000 en BSF-1% ASB. Luego de una incubación a 37°C durante 1 hora, los pocillos fueron lavados tres veces con BSF-0,1% ASB-0,05% de Tween-20. La cuantificación de anticuerpos fue realizada usando TMB como sustrato en

presencia de peróxido de hidrógeno. La reacción fue detenida por adición de 100 μ l de SO_4H_2 2 N y se determinó la Absorbancia a doble lectura (450 η m-620 η m) utilizando el lector de microplacas Dynatech MR250.

Niveles de anticuerpos anti-antígenos recombinantes y ACF libres en suero e inmunocomplejos disociados

Los niveles de anticuerpos contra los antígenos recombinantes de 38kDa, Ag 16, y Ag 85B y el antígeno crudo ACF libres en suero y en inmunocomplejos disociados se presentan en las Figuras 3, 4, 5 y 6. Estas figuras muestran también el grado de significación de la diferencia entre los niveles medios de anticuerpos en el grupo de los (PCS) y aquellos encontrados en cada uno de los grupos estudiados.

A



B

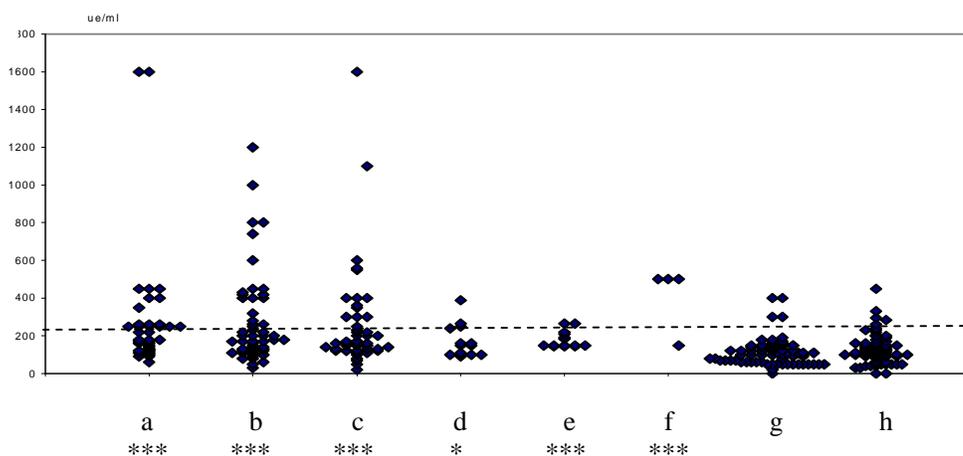
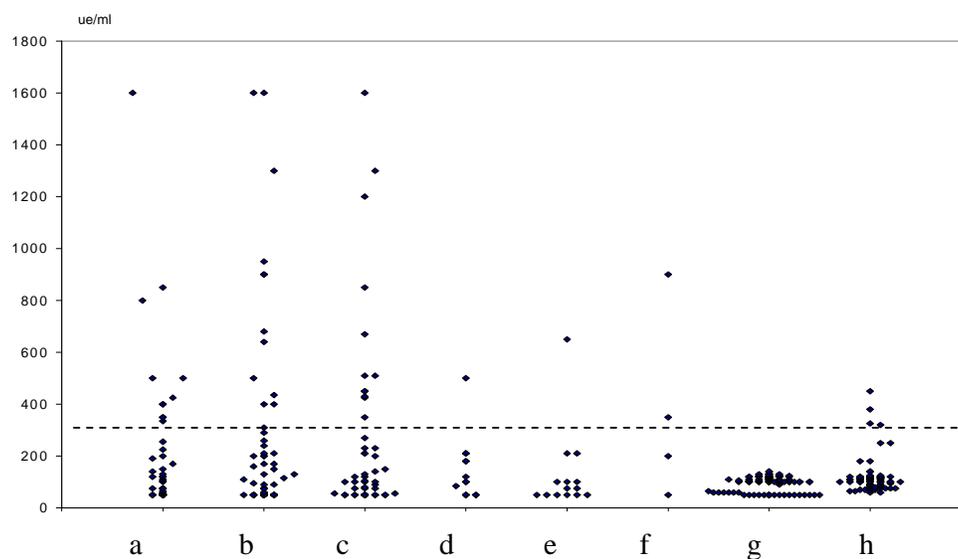


Figura 3: Diagrama de dispersión de los niveles de anticuerpos anti-38kDa libres (A) y en inmunocomplejos disociados (B) identificados en los siguientes grupos de pacientes: TB pulmonar examen directo positivo (a), TB pulmonar examen directo negativo (b), TB extrapulmonar (c), micobacteriosis (d), micosis (e), lepra (f), personas clínicamente sanas (g), pacientes con otras enfermedades (h). Las líneas de puntos cortadas representan el valor de corte calculado para cada anticuerpo; mediante asteriscos se muestra el grado de significación de la

diferencia entre los niveles medios de anticuerpos en el grupo de PCS y los niveles medios de anticuerpos encontrados en cada uno de los otros grupos (Prueba de la U de Mann-Whitney; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

A



B

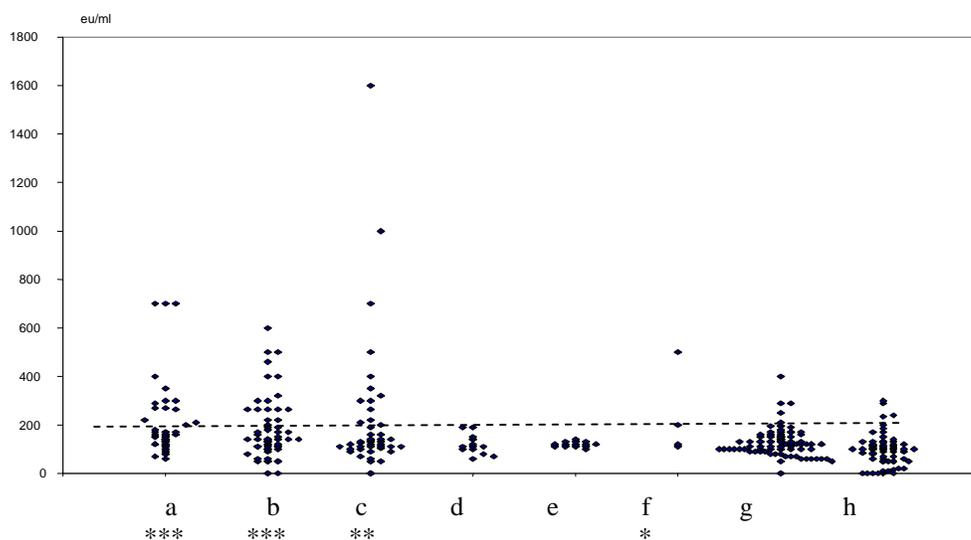


Figura 4: Diagrama de dispersión de los niveles de anticuerpos anti-Ag 16 libres (A) y en inmunocomplejos disociados (B) identificados en los siguientes grupos de pacientes: TB pulmonar examen directo positivo (a), TB pulmonar examen directo negativo (b), TB extrapulmonar (c), micobacteriosis (d), micosis (e), lepra (f), personas clínicamente sanas (g), pacientes con otras enfermedades (h). Las líneas de puntos cortadas representan el valor de corte calculado para cada anticuerpo; mediante asteriscos se muestra el grado de significación de la diferencia entre los niveles medios de anticuerpos en el grupo de personas clínicamente sanas y los niveles medios de anticuerpos encontrados en cada uno de los otros grupos (Prueba de la U de Mann-Whitney; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

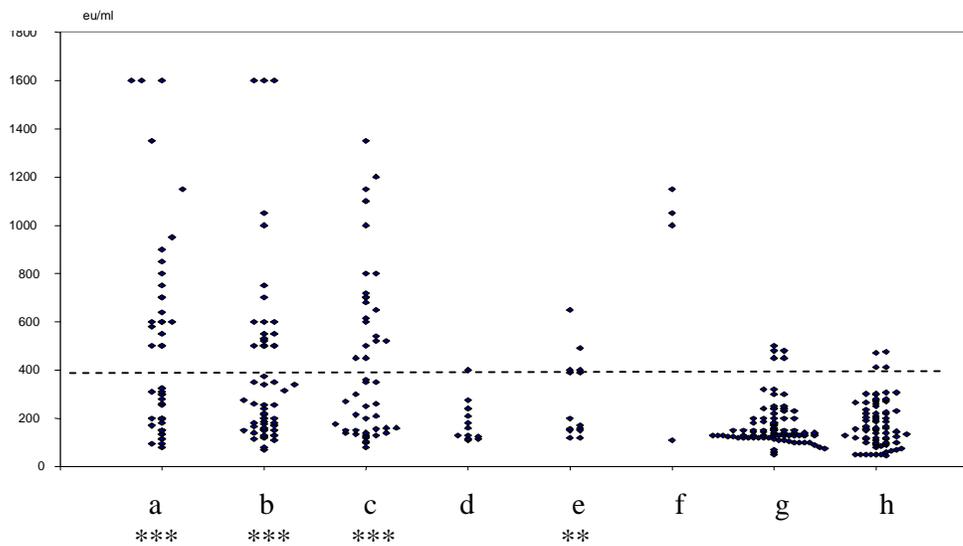
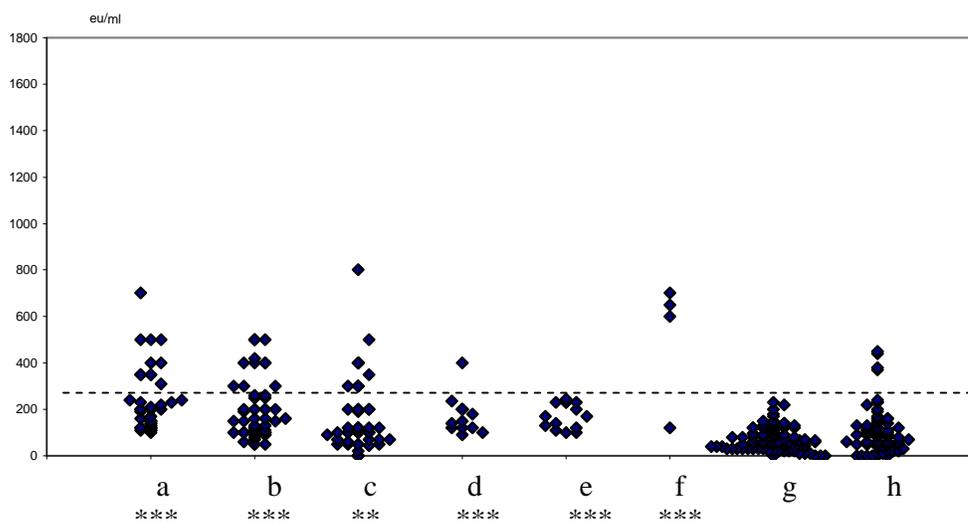
A**B**

Figura 5: Diagrama de dispersión de los niveles de anticuerpos anti-Ag 85B libres (A) y en inmunocomplejos disociados (B) identificados en los siguientes grupos de pacientes: TB pulmonar examen directo positivo (a), TB pulmonar examen directo negativo (b), TB extrapulmonar (c), micobacteriosis (d), micosis (e), lepra (f), personas clínicamente sanas (g), pacientes con otras enfermedades (h). Las líneas de puntos cortadas representan el valor de corte calculado para cada anticuerpo; mediante asteriscos se muestra el grado de significación de la diferencia entre los niveles medios de anticuerpos en el grupo de PCS y los niveles medios de anticuerpos encontrados en cada uno de los otros grupos (Prueba de la U de Mann-Whitney; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

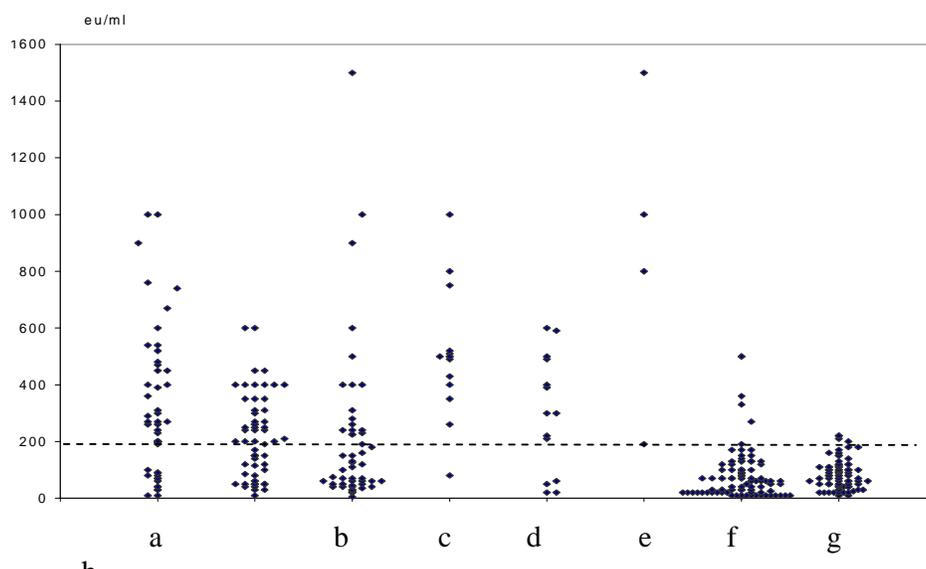
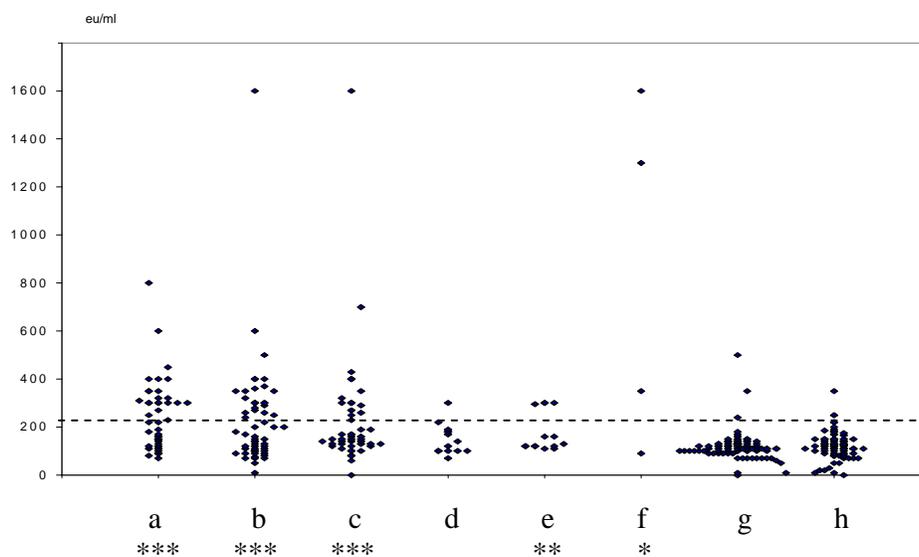
A**B**

Figure 6: Diagrama de dispersión de los niveles de anticuerpos anti-ACF libres (A) y en inmunocomplejos disociados (B) identificados en los siguientes grupos de pacientes: TB pulmonar examen directo positivo (a), TB pulmonar examen directo negativo (b), TB extrapulmonar (c), micobacteriosis (d), micosis (e), lepra (f), personas clínicamente sanas (g), pacientes con otras enfermedades (h). Las líneas de puntos cortadas representan el valor de corte calculado para cada anticuerpo; mediante asteriscos se muestra el grado de significación de la diferencia entre los niveles medios de anticuerpos en el PCS sanas y los niveles medios de anticuerpos encontrados en cada uno de los otros grupos (Prueba de la U de Mann-Whitney; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

Entre los grupos de pacientes con TB se observó que, sólo para los antígenos de 38-kDa y ACF, el nivel de anticuerpos libres en el grupo pTBb+ era significativamente mayor comparado con los niveles encontrados en los grupos de pacientes con pTBb- y epTB, ($p < 0,05$; Prueba de la U de Mann-Whitney). Por otro lado, se encontró que el nivel medio de anticuerpos disociados en el grupo pTBb+ era significativamente mayor que los observados para los grupos pTBb- y epTB sólo para Ag 85B ($p < 0,05$; Prueba de la U de Mann-Whitney)

Además, el análisis de correlación entre los niveles individuales de anticuerpos libres y disociados contra cada antígeno recombinante en los sueros de pacientes con TB mostró una leve correlación entre estos dos parámetros ($r = 0.24$, $p = 0,03$ para anticuerpos libres y disociados anti-38kDa); ($r = 0.12$, $p = 0.04$ para anticuerpos libres y disociados anti-Ag16); ($r = 0.24$, $p = 0.02$ para anticuerpos libres y acomplexados anti-Ag 85B); se obtuvieron resultados similares cuando este análisis se hizo para ACF ($r = 0.17$, $p = 0.03$).

Determinación del valor de corte del EIE

En evaluaciones previas de diferentes pruebas serológicas utilizadas para el diagnóstico de TB, se ha encontrado que los pacientes con enfermedades no tuberculosas mostraban una mayor frecuencia de resultados falsos positivos que la observada en personas sanas; probablemente esto esté indicando que algunas enfermedades (especialmente la neumonía aguda) pueden causar ciertas interferencias para los estudios serológicos, posiblemente debido a desórdenes en la respuesta inmunológica que aparecen durante el curso de estas enfermedades (82,83). En el presente trabajo, los niveles medios de anticuerpos libres y disociados obtenidos para pacientes con enfermedades diferentes a micosis, micobacteriosis lepra (POE) fueron mayores que los encontrados para el grupo PCS, con excepción de la determinación de anticuerpos disociados anti-Ag 16. Sí bien la diferencia fue solamente significativa para anticuerpos libres anti-antígenos 38kDa y AFC, el valor de corte para cada antígeno fue calculado como el promedio más 2 desviaciones standard del nivel de anticuerpos encontrado en el grupo POE (Figura 3,4,5,6).

Resultados del EIE con antígenos recombinantes individuales y ACF

En la Tabla 2 se presentan los porcentajes de resultados positivos por EIE para anticuerpos libres y disociados anti-antígenos recombinantes (Ag 38kDa, Ag 16 y Ag 85B) y ACF en los subgrupos de pacientes con TB y en los controles. Para cada antígeno evaluado,

se muestran los resultados del EIE para anticuerpos libres y disociados tanto individualmente como en combinación (calculados sobre la base de los resultados obtenidos con cada anticuerpo y antígeno individualmente).

En relación a la determinación de anticuerpos libres, la sensibilidad de la prueba para el Ag de 38kDa fue significativamente mayor en el grupo **pTBb+** que en el grupo **pTBb-** (54% vs 33% para pTBb+ vs pTBb-, respectivamente; prueba χ^2 , $p= 0,047$) y en el grupo de pacientes **pTB** con respecto al grupo de pacientes con **TB extrapulmonar** (41% vs 22%, para pTB y epTB respectivamente; prueba χ^2 , $p= 0,015$). Por otro lado, el Ag 85B, fue el más eficiente para el diagnóstico de TB extrapulmonar (47% vs. 22%, para Ag 85B y 38kDa, respectivamente, prueba de Mc Nemar, $p = 0.004$; 47% vs. 25% para Ag 85B y Ag16 respectivamente, prueba de McNemar, $p = 0.041$) (Tabla 2). Para los tres antígenos recombinantes la especificidad fue del 95% en POE, mientras que varió entre 95% y 100% en PCS, de 86% a 100% en MNT y micosis y de 25% a 75% en lepra; por otro lado cuando se empleó ACF como antígeno se obtuvieron niveles extremadamente pobres de especificidad, con valores del 7% en el grupo de MNT, 29% en micosis y 0% en lepra. Analizando la concordancia entre la respuesta serológica de anticuerpos libres y disociados anti- cada uno de los antígenos dentro del mismo subgrupo de pacientes TB, encontramos que el nivel de Kappa nunca fue superior a 0,4, lo que refleja una alta heterogeneidad entre las respuestas de anticuerpos libres y disociados frente a cada uno de los antígenos estudiados. Considerando esta heterogeneidad, era importante estudiar, para cada antígeno, la contribución de la respuesta de anticuerpos disociados a los resultados de la determinación de anticuerpos libres. En casi todos los subgrupos de pacientes tuberculosos y para cada uno de los antígenos estudiados, la combinación de anticuerpos libres y disociados incrementó significativamente la sensibilidad de la prueba en comparación con la determinación de anticuerpos libres únicamente (Prueba de Mc Nemar, $p<0.05$, para la combinación de resultados de anticuerpos libres y disociados vs. anticuerpos libres en todos los subgrupos de pacientes TB, con excepción del subgrupo de pacientes con pTBb+ para el antígeno de 38kDa y del subgrupo epTB para Ag 85B) sin ninguna pérdida significativa de especificidad (Prueba de Mc Nemar, $p>0.05$, para la combinación de anticuerpos libres y disociados vs. anticuerpos libres anti-antígenos en todos los subgrupos de controles sin TB).

Tabla 2. Resultados de EIE para anticuerpos libres y disociados anti antígenos recombinantes (38kDa, Ag 16 y Ag 85B) y antígenos de cultivo filtrado en subgrupos de pacientes tuberculosos y controles.

Antígenos	% de individuos positivos (nº de resultados positivos)								
	<i>Pacientes tuberculosos</i>				<i>Controles</i>				
	Todos TB N=161	pTBb+ n=50	PTBb- n=60	EpTB n=51	MNT n=14	Micosis n=14	Lepra n=4	POE n=82	PCS n=100
38kDa									
Libre	36% (58)	54% (27)	33% (20)	22% (11)	14% (2)	0% (0)	25% (1)	5% (4)	2% (2)
IC	24% (38)	18% (9)	32% (16)	25% (13)	7% (1)	0% (0)	75% (3)	5% (4)	4% (4)
Libre +IC	44% (79)	60% (30)	48% (29)	39% (20)	21% (3)	0% (0)	75% (3)	7% (6)	7% (7)
Ag 16									
Libre	25% (41)	24% (12)	27% (16)	25% (13)	7% (1)	7% (1)	50% (2)	5% (4)	0% (0)
IC	27% (44)	28% (14)	28% (17)	25% (13)	0% (0)	0% (0)	50% (2)	5% (4)	5% (5)
Libre +IC	43% (69)	40% (20)	50% (30)	37% (19)	7% (1)	7% (1)	50% (2)	7% (6)	5% (5)
Ag 85B									
Libre	42% (68)	44% (22)	37% (22)	47% (24)	0% (0)	14% (2)	75% (3)	5% (4)	5% (5)
IC	25% (41)	26% (13)	28% (17)	22% (11)	7% (1)	7% (1)	75% (3)	6% (5)	0% (0)
Libre +IC	53% (86)	56% (28)	52% (32)	51% (26)	7% (1)	14% (2)	75% (3)	7% (6)	5% (5)
ACF									
Libre	53% (86)	72% (36)	53% (32)	36% (18)	93% (13)	71% (10)	100% (4)	5% (4)	6% (6)
IC	42% (67)	48% (24)	42% (25)	36% (18)	14% (2)	29% (4)	75% (3)	6% (5)	3% (3)
Libre +IC	69% (111)	78% (37)	77% (46)	56% (28)	93% (13)	71% (10)	100% (4)	11% (9)	11% (9)

pTBb+ = pacientes con TB pulmonar baciloscopia positiva; **pTBb-** = pacientes con TB pulmonar con dos resultados negativos a la baciloscopia en el momento de la admisión; **epTB**= Pacientes con TB extrapulmonar; **MNT**= micobacteriosis; **POE**= Pacientes con otras enfermedades distintas a micobacteriosis, micosis y lepra; **PCS**= personas clínicamente sanos; **IC**= inmunocomplejos; **ACF**=Antígenos de Cultivo filtrado

La reactividad serológica de un antígeno dado puede ser evaluada no sólo mediante la estimación del número de pacientes con TB con resultados positivos frente a un determinado antígeno, sino también mediante la determinación de la proporción de pacientes altamente reactivos entre los pacientes positivos para un antígeno. Para analizar el grado de respuesta de anticuerpos, contamos el número de sueros altamente reactivos (definidos como aquellos sueros que tienen niveles de anticuerpos mayores o iguales al nivel medio de anticuerpos del grupo de POE más 6 desviaciones standard) y luego calculamos la proporción sueros altamente reactivos en relación a los positivos para cada uno de los antígenos. El Ag16 estimuló altos de niveles de anticuerpos libres en más de la mitad (21 de 41, 51%) de los pacientes TB positivos mientras que el Ag de 38kDa estimuló una respuesta inmune altamente reactiva en el 40% (23 de 58) de los positivos a este antígeno. Para el Ag 85B, se obtuvo una respuesta fuerte en sólo aproximadamente un tercio (22 de 68) de los pacientes positivos. Sólo alrededor de un cuarto de los pacientes que resultaron positivos para la determinación de anticuerpos disociados anti-38kDa y Ag16 (11 de 38 y 11 de 44, para 38kDa y Ag 16, respectivamente) tenían respuestas altamente reactivas, mientras que entre los reactores al Ag 85B, casi ninguno lo fue de alta reactividad (5%, 2 de 41).

Heterogeneidad del reconocimiento antigénico

El análisis del reconocimiento antigénico de los sueros individuales reveló que el patrón de antígenos que reaccionan con los anticuerpos séricos es altamente variable de paciente a paciente. Ningún antígeno solo o grupos de antígenos fue reactivo con todos los sueros de pacientes TB (o incluso con la mayoría). El número de antígenos reconocidos por anticuerpos libres varió ampliamente de uno (54 de 161 pacientes con TB) a tres (15 de 161 pacientes). Por otro lado el número de antígenos reconocidos por anticuerpos disociados de inmunocomplejos varió de uno (29 a 161) a tres (14 de 161 pacientes) Analizando la concordancia de la respuesta serológica de cada antígeno dentro del subgrupo de pacientes con TB (tabla 3), encontramos que los niveles de Kappa nunca fueron más altos que 0,5, reflejando la mencionada heterogeneidad en la respuesta de anticuerpos.

Tabla 3. Concordancia de las respuestas serológicas dentro del mismo subgrupo de pacientes TB

Grupo	38kDa y Ag 16		38kDa y Ag 85B		Ag 16 y Ag 85B	
	Kappa (95%IC)		Kappa (95%IC)		Kappa (95%IC)	
	<i>Libre</i>	IC	<i>Libre</i>	IC	<i>Libre</i>	IC
pTBb+	0.15 (-0.11-0.41)	0.31 (0.05-0.57)	0.43 (0.15-0.71)	0.22 (0.04-0.48)	0.32 (0.08-0.60)	0.44 (0.16-0.72)
pTBb-	0.16 (-0.10-0.42)	0.49 (0.23-0.75)	0.19 (-0.07-0.49)	0.45 (0.19-0.71)	0.19 (-0.05-0.43)	0.42 (0.16-0.68)
epTB	0.35 (0.07-0.63)	0.38 (0.1-0.66)	0.33 (0.09-0.57)	0.34 (0.06-0.62)	0.18 (-0.08-0.44)	0.46 (0.18-0.74)

IC= Intervalo de Confianza; **pTBb+** = pacientes con TB pulmonar baciloscopia positiva; **pTBb-** = Pacientes con tuberculosis pulmonar con dos baciloscopias negativas consecutivas en el momento de la admisión; **epTB**= pacientes con tuberculosis extrapulmonar.

Combinación de los resultados individuales de los distintos ensayos

Teniendo en cuenta la citada heterogeneidad de la respuesta inmune, era importante analizar los resultados de la combinación de los ensayos con cada uno de los antígenos considerando como positivo cuando cualquiera de los antígenos diera una respuesta positiva en las pruebas con anticuerpos libres y /o disociados.

Los resultados de combinación se muestran en la **tabla 4**.

En el grupo de pacientes con TB, la combinación de resultados positivos para anticuerpos libres contra cualquiera de los antígenos incrementó el porcentaje de positividad de los ensayos individuales desde 42% (para Ag85B, el antígeno con la mayor sensibilidad (tabla1)) hasta 64% (tabla 4); el mayor incremento en la sensibilidad se obtuvo en el grupo pTBb-, para el cual la sensibilidad se incrementó al menos en un 25% (de 37% para Ag 85B a 62% después de la combinación de diferentes ensayos individuales). La contribución de los resultados de los ensayos con anticuerpos disociados también incrementó la utilidad diagnóstica, pero este incremento fue sólo significativo para el grupo de pTB- (de 62% después de la combinación de los resultados de anticuerpos libres a 80% después de la combinación de los resultados de la medición de anticuerpos disociados contra cualquiera de los antígenos, $p=0.001$, Prueba de Mc Nemar test) y epTB (de 57% después de la combinación de los resultados de anticuerpos libres a 69% después de la combinación de los

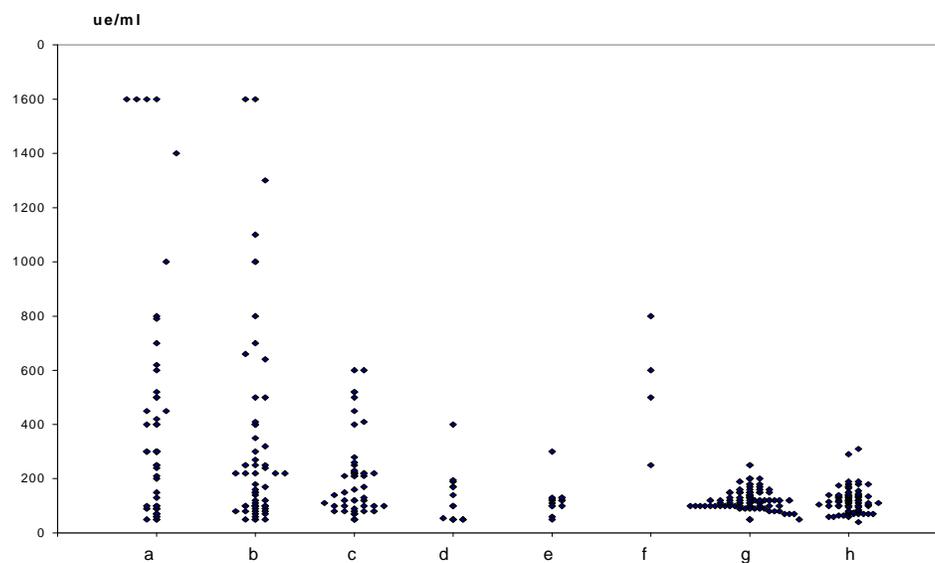
resultados de la medición de anticuerpos disociados contra cualquiera de los antígenos, $p=0.031$, Prueba de Mc Nemar)(tabla 4).

Por otro lado, la combinación de resultados individuales incrementó el porcentaje de falsos positivos, especialmente en el grupo de POE, en el cual la especificidad bajó de un 95% para los ensayos que determinaban anticuerpos libres contra cada uno de los antígenos recombinantes (Tabla 2), a un 88% después la combinación de resultados positivos de los ensayos de anticuerpos libres para cualquiera de los antígenos individuales, y a un 83% después de considerar la contribución de cualquier resultado positivo obtenido en la determinación de anticuerpos disociados contra cualquiera de los antígenos ($p = 0.002$, Prueba de Mc Nemar)(tabla 4).

Análisis de EIE utilizando una mezcla de antígenos

El desarrollo de pruebas serológicas utilizando mezclas de antígenos para la sensibilización de la fase sólida, es considerado actualmente, junto con la combinación de resultados de EIE que utilizan antígenos únicos, como un camino válido para el perfeccionamiento de la utilidad diagnóstica de estos métodos. Por tanto, decidimos estudiar la actividad serológica de la mezcla de los tres antígenos recombinantes. Los niveles de anticuerpos contra la mezcla de antígenos recombinantes de 38kDa, Ag 16, y Ag 85B libres y disociados se presentan en la Figura 7.

A



B

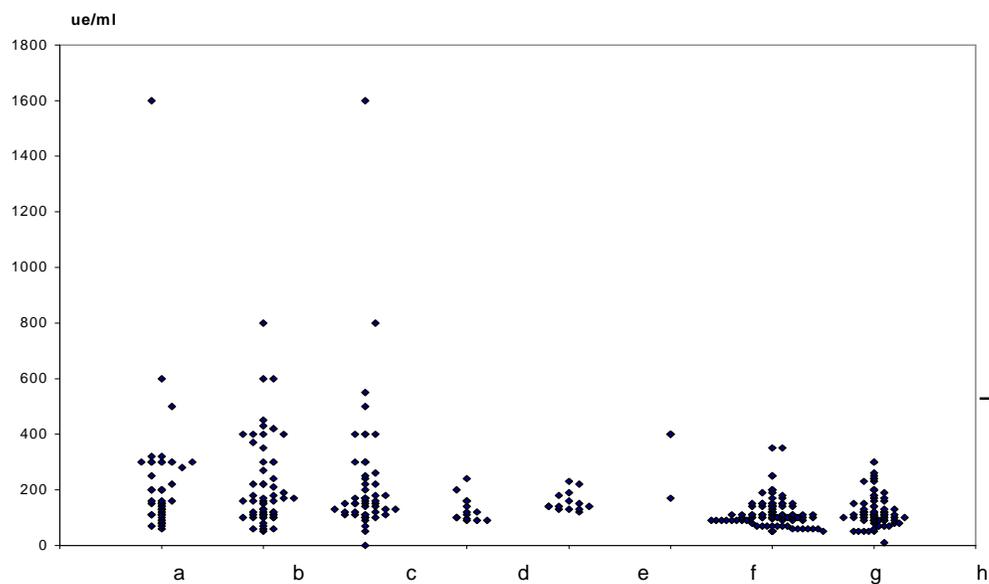


Figura 7: Diagrama de dispersión de los niveles de anticuerpos anti-mezcla de antígenos recombinantes (38kDa, Ag16 y Ag 85B) en suero (A) y en inmunocomplejos disociados (B) identificados en los siguientes grupos de pacientes: TB pulmonar examen directo positivo (a), TB pulmonar examen directo negativo (b), TB extrapulmonar (c), micobacteriosis (d), micosis (e), lepra (f), personas clínicamente sanos (g), pacientes con otras enfermedades (h). Las líneas de puntos cortadas representan el valor de corte calculado para cada anticuerpo.

Utilizando para la determinación del valor de corte el mismo método estadístico que el empleado para los antígenos simples, se calcularon los niveles de sensibilidad y especificidad para los distintos subgrupos de pacientes (Tabla 4). La sensibilidad de la mezcla resultó más baja que lo esperado en base a los resultados obtenidos con cada uno de los antígenos simples. Sólo 87 de las 103 muestras positivas esperadas en los ensayos de anticuerpos libres individuales y 48 de los 69 muestras positivas esperadas en los ensayos de anticuerpos disociados individuales fueron positivos empleando la mezcla de antígenos, lo que determinó una pérdida de sensibilidad de 10% y 13% para anticuerpos libres y disociados, respectivamente. Observamos que la positividad de algunos sueros con bajos niveles de reactividad para uno o más antígenos simples se perdía cuando dichos sueros eran evaluados usando la mezcla como antígeno (Figura 8). Esta observación fue también detectada para las muestras controles, resultando en una ganancia en la especificidad del diagnóstico tanto para los ensayos que determinaban anticuerpos libres como disociados.

La contribución de los resultados de la determinación de anticuerpos disociados a los resultados de la medición de anticuerpos libres anti-mezcla fue sólo significativa para el diagnóstico de pacientes pTBb-, con una ganancia en sensibilidad del 15% ($p = 0,04$, prueba de Mc Nemar). Es importante recalcar que luego de la combinación de los resultados de anticuerpos libres y disociados anti-mezcla, el nivel de resultados falsos positivos entre los controles fue bajo, con valores de especificidad que variaron en un rango de 93% a 98% entre los diferentes subgrupos de controles, con excepción del grupo de los pacientes con lepra.

Tabla 4. Resultados de la combinación de las pruebas serológicas con antígenos individuales (resultados acumulados) y del ensayo con la mezcla de los antígenos recombinantes en subgrupos de pacientes con TB y en controles.

Grupo de pacientes (número)	<i>Resultados acumulados con antígenos individuales^a</i>			<i>Mezcla^b</i>		
	Anticuerpos libres	Anticuerpos disociados	Libres + disociados	Anticuerpos libres	Anticuerpos disociados	Libres + disociados
Sensibilidad (número de resultados positivos)						
Todos los TB (161)	64% (103)	43% (69)	76% (123)	54% (87)	30% (48)	63% (102)
PTB b+ (50)	74% (37)	42% (21)	80% (40)	64% (32)	30% (15)	70% (35)
PTBb- (60)	62% (37)	45% (27)	80% (48)	50% (30)	30% (18)	65% (39)
EpTB (51)	57% (29)	41% (21)	69% (35)	49% (25)	29% (15)	55% (28)
Especificidad (número de resultados negativos)						
Controles (214)	89% (191)	90% (192)	83% (178)	96% (205)	96% (206)	95% (204)
MNT (14)	86% (12)	86% (12)	76% (11)	93% (13)	100% (14)	93% (13)
Micosis (14)	86% (12)	93% (13)	86% (12)	93% (13)	100% (14)	93% (13)
Lepra (4)	25% (1)	25% (1)	25% (1)	25% (1)	25% (1)	25% (1)
POE (82)	88% (72)	90% (74)	83% (68)	98% (80)	96% (79)	96% (79)
PCS (100)	94% (94)	92% (92)	86% (86)	98% (98)	98% (98)	98% (98)

^a calculado sobre la base de los resultados obtenidos con los antígenos individuales (38kDa, Ag16 y Ag85B)

^b experimentalmente obtenido mediante la mezcla de antígenos.

Mezcla = 38kDa + Ag16 + Ag 85B; **pTBb+** = pacientes con TB pulmonar baciloscopia positiva; **pTBb-** = pacientes con TB pulmonar con dos baciloscopias negativas al momento de la admisión; **epTB**= pacientes con TB extrapulmonar; **MNT**= micobacteriosis; **POE**= pacientes con otras enfermedades distintas de micosis, micobacteriosis y lepra; **PCS**= personas clínicamente sanas.

DISCUSIÓN

El diagnóstico de tuberculosis no es sencillo de realizar. Los signos clínicos no son específicos, las imágenes radiológicas incrementan la sospecha de TB y pueden mostrar patrones característicos, pero la distinción de otras enfermedades como micosis o micobacteriosis suele ser dificultosa. Si bien la baciloscopia de esputo es útil y tiene alto valor predictivo, una proporción de pacientes con pTB son baciloscopia negativa. Por otro lado, en pacientes con TB extrapulmonar, la detección de bacilos ácido alcohol resistentes mediante el examen microscópico directo de muestras de aspirados o material histológico es poco común. Entre todas las pruebas complementarias que se han investigado, las técnicas serológicas aparecieron como herramientas muy prometedoras para la detección temprana de TB, debido a su sencillez y costo-efectividad. En un principio, estas pruebas se realizaban usando antígenos parcialmente purificados. Estos antígenos contenían epitopes con reactividad cruzada, lo que conducía al desarrollo de pruebas con una especificidad relativamente pobre. Varios autores, sin embargo, identificaron que el uso de antígenos purificados podría solucionar parcialmente este problema, incrementado en forma importante la especificidad pero a costa de un descenso en la sensibilidad de las pruebas (40,51,84). Nuestro estudio confirma estas observaciones. En efecto, el uso de antígenos recombinantes simples tales como Ag 85B, 38kDa y Ag 16 para la detección de anticuerpos libres proporcionó una mayor especificidad que un ensayo basado en antígenos crudos obtenidos a partir de un filtrado de cultivo en medio líquido de *M. tuberculosis*, especialmente en el grupo de pacientes con micosis y micobacteriosis, pero con el costo de un pobre nivel de sensibilidad. La falta de respuesta serológica en una gran proporción de pacientes, que conduce a estos pobres niveles de sensibilidad, ha sido atribuida principalmente a dos factores: (i) la formación y circulación de complejos inmunes específicos que no son detectados por serología convencional (ii) la variación de reconocimiento antigénico de persona a persona.

Para la detección y cuantificación de inmunocomplejos en varias enfermedades crónicas (85) se han empleado numerosos métodos. Desde que Bhattacharya y col (86), Singh y col (87) y Bajaj y col (88) reportaron la utilidad de un método basado en la precipitación de IC mediante el uso de PEG en sueros de pacientes con TB, este método ha

sido el de elección en una gran cantidad de estudios. En nuestro trabajo, los niveles de IgG acomplejada se determinaron usando el método de precipitación con PEG, con la adición de un proceso de disociación de inmunocomplejos por tratamiento con una solución de pH ácido. Udaykumar y Saxena (89) demostraron que el pH ácido inducía una mayor habilidad de los anticuerpos disociados de los complejos inmunes de los pacientes con TB para unirse a los antígenos en el ensayo. Sin embargo, también observaron que los anticuerpos, después de este tratamiento con medio ácido, se volvían “más pegajosos”, y esto daba lugar a uniones inespecíficas que podían conducir a resultados falsos positivos; por lo tanto, y para evitar la disminución de la especificidad, cada suero se procesó en dos pocillos, con y sin la sensibilización con antígeno de tal manera que, para la evaluación estadística, el valor de absorbancia de cada muestra se obtuvo previa sustracción de los valores de absorbancia obtenidos en los pocillos sin antígeno.

En nuestro trabajo, usando un antígeno crudo, como es el antígeno de un filtrado de cultivo en medio líquido de *M. tuberculosis*, encontramos valores positivos para los anticuerpos disociados de inmunocomplejos en un rango que varió entre el 36% y el 48%, dependiendo del subgrupo de pacientes con TB estudiado. En concordancia con nuestros resultados, otros autores (89), usando antígenos similares, informaron que alrededor del 40% de los pacientes tuberculosos tenían resultados positivos para la determinación de anticuerpos IgG disociados. En total, en nuestro estudio, encontramos valores de sensibilidad de alrededor del 40% y 50% para la determinación de anticuerpos libres anti-ACF en pacientes con epTB y pTBb-, respectivamente, mientras que estos valores se incrementaban hasta 60% y 80%, respectivamente, después de sumar la contribución de los resultados positivos obtenidos para anticuerpos disociados de IC. Sin embargo, utilizando estos antígenos crudos, los niveles de especificidad eran pobres, especialmente en el grupo de enfermedades consideradas en el diagnóstico diferencial de TB, como micobacteriosis y micosis. Por otro lado, usando antígenos recombinantes, nuestros estudios mostraron para la determinación de IgG libre, niveles de sensibilidad entre 22% y 54% entre los diferentes subgrupos de TB estudiados; Lyashchenko y col (51) obtuvieron también niveles bajos de sensibilidad cuando estudiaron estos mismos antígenos recombinantes. Observamos que la contribución de anticuerpos acomplejados a los resultados obtenidos con los anticuerpos libres era variable, dependiendo de los distintos subgrupos de pacientes tuberculosos

estudiados y del antígeno utilizado. Globalmente, la determinación de anticuerpos libres y disociados contra cada antígeno individual mostró una sensibilidad de hasta un 55% de los casos de TB. El mejor aporte a la sensibilidad fue observado para los casos de tuberculosis pulmonar paucibacilar. En estudios previos (77-79) que utilizaron los mismos antígenos que los empleados por nosotros, es decir los antígenos de 38kDa, Ag 16 y Ag 85B, pero obtenidos en forma nativa a partir de su purificación cromatográfica, se evidenció que la detección de anticuerpos acomplejados, junto con la determinación de anticuerpos libres, incrementaba en forma muy importante la utilidad de los ensayos serológicos, con altos niveles de sensibilidad (cerca al 85% en casos pulmonares cultivo positivo y al 70% en casos pulmonares diagnosticados por radiología) y especificidad. Estos hallazgos, si bien difieren de los encontrados por nosotros, no son sorprendentes ya que otros estudios que emplearon antígenos recombinantes o péptidos sintéticos para la detección de anticuerpos libres obtuvieron una disminución de la reactividad de entre un 20% a un 50% en relación a la observada cuando se empleaban proteínas nativas (26,84,90). Además, algunos estudios acerca de la reactividad de sueros humanos y de ratón con antígenos de *M. tuberculosis*, mostraron que, a diferencia de los anticuerpos de ratón, los anticuerpos humanos producidos durante la progresión de la enfermedad natural podrían reconocer epitopes conformacionales glicosilados en las proteínas nativas (26,90). Debido a que los antígenos recombinantes usados en este estudio, fueron expresados en *E. coli*, la baja reactividad del suero frente a estas proteínas podría deberse a la falta de glicosilación. Este factor podría contribuir a explicar la reactividad disminuida observada con cada uno de los antígenos recombinantes en este estudio en comparación con los resultados obtenidos por Uma Devi y col y Raja y col (77-79) con proteínas nativas. Otro factor que puede estar relacionando con la baja reactividad de nuestros antígenos podría ser la existencia de una asociación entre los títulos de anticuerpos contra determinados epitopes de *M. tuberculosis* y ciertos alelos, de tal manera que la evaluación del mismo ensayo en poblaciones de diferentes orígenes étnicos podría conducir a resultados contrastantes. La restricción genética de la respuesta inmune para micobacterias (91) y/o las diferentes características entre cepas de micobacterias prevalentes en distintas regiones del mundo, que inducen diferentes respuestas humorales podrían ser las responsables de estas diferencias. Así, distintas evaluaciones de un mismo ensayo comercial basado en la determinación de anticuerpos

anti-38kDa y Ag16, dieron resultados contrastantes cuando fueron usados en poblaciones de diferentes orígenes étnicos (65, 92).

Nuestros resultados confirman la variabilidad en la respuesta de anticuerpos antimicobacterianos entre los diferentes individuos, así como reafirman la importante dificultad que existe al intentar identificar un antígeno único para el desarrollo de ensayos serológicos de amplia aplicación. El número de antígenos serológicamente reactivos, varía ampliamente de individuo a individuo. En un determinado suero, el nivel de anticuerpos específicos varía según el antígeno, independientemente del número total de antígenos reconocidos por este suero y esta heterogeneidad fue evidenciada no solamente para los anticuerpos libres sino también por aquellos anticuerpos que se hallaban acomplejados. Esta respuesta humoral heterogénea encontrada en la evaluación de antígenos proteicos es la que dio sustento al desarrollo de pruebas serológicas empleando mezclas antigénicas. En nuestro trabajo estudiamos la actividad serológica de tres antígenos recombinantes en una sola mezcla. En concordancia con lo encontrado por Gennaro (39), nuestro estudio mostró que niveles altos de reactividad a un solo antígeno eran suficientes para dar un resultado positivo cuando se empleaba ese mismo antígeno en una mezcla. En cambio, algunos sueros de pacientes con TB o de pacientes controles (no TB) que mostraban baja reactividad para uno o más antígenos perdieron su positividad cuando se emplearon las mezclas; por tanto, la proporción de falsos positivos asociados a sueros de pacientes no tuberculosos con reactividad baja, disminuyó cuando se empleó la mezcla de antígenos, con la consecuente ganancia de especificidad (tabla 4). Sin embargo, existió también una disminución de la sensibilidad diagnóstica asociada a sueros de pacientes tuberculosos con bajos niveles de reactividad a uno o más antígenos. Estos hallazgos presumiblemente serían debidos a que al colocar varios antígenos en un mismo pocillo, la competencia entre ellos para unirse al poliestireno podría causar ciertas interferencias entre unos y otros, las que serían responsables de la pérdida de reactividad hacia ciertos antígenos.

En este sentido, se observó que el Ag 16, aun mostrando el nivel más bajo de sensibilidad en forma individual, tuvo un rol importante en la positividad de la mezcla de antígenos, posiblemente, debido a que la mayoría de los sueros evidenciaron niveles de reactividad alta; en cambio, el Ag 85B, que probó un alto nivel de sensibilidad, debido a que la mayor parte de la respuesta serológica era de reactividad baja, su contribución a la

sensibilidad de la prueba empleando la mezcla de antígenos, fue marcadamente menor a la esperada.

Aunque claramente eliminan menos bacilos que las personas con baciloscopia positiva, los pacientes con baciloscopia negativa puede contribuir significativamente a la propagación de la TB a causa del retraso en su diagnóstico y tratamiento y a la ausencia de medidas de aislamiento (93). Aquellas medidas tendientes a acelerar el diagnóstico en estos pacientes pueden favorecer al control de la enfermedad. Nuestros resultados mostraron que sólo una baja proporción de pacientes con TB VIH negativos, con baciloscopia negativa, tienen niveles positivos para anticuerpos libres o disociados de inmunocomplejos cuando se emplea como método de diagnóstico un EIE basado en la sensibilización de la fase sólida con los antígenos 38kDa, Ag 16 y Ag 85B usados en forma individual; sin embargo, la combinación en un solo pocillo de los tres antígenos eleva la sensibilidad a cerca de un 65%, con un buen nivel de especificidad, especialmente en el grupo de pacientes incluidos en el diagnóstico diferencial de TB, como micobacteriosis o micosis.

Existen pocos estudios que evalúan la utilidad diagnóstica de la medición de anticuerpos libres y disociados en sueros de pacientes con tuberculosis extrapulmonar. Nuestros datos mostraron que, aun después de la combinación de resultados de los ensayos de anticuerpos libres y disociados anti- antígenos recombinantes, sólo el 55% de los casos de TB extrapulmonar dio un resultado positivo. En concordancia con estos hallazgos, Simmone y col (94), en su evaluación de los niveles de anticuerpos anti-glicolipídicos, también encontraron que el efecto contributivo de los anticuerpos acomplejados a los anticuerpos libres, estaba prácticamente restringido a las formas pulmonares de la enfermedad. En meningitis tuberculosa, muchos autores (95) han sugerido que los complejos antígenos-anticuerpos formados en el sistema nervioso central podrían ser incapaces de atravesar la barrera hematoencefálica, pudiendo ello ser la causa de los falsos resultados negativos encontrados en varios estudios en pacientes con meningitis; los complejos antígeno-anticuerpo podrían estar presentes en el LCR, pero no se encontrarían en suero. Así, en este estudio, en los cuatro casos de meningitis tuberculosa incluidos, los niveles de inmunocomplejos estuvieron por debajo del punto de corte. Estos pacientes respondieron a la terapia antituberculosa específica, lo que refuerza la posibilidad de que se trate de resultados falsos negativos a la serología.

En nuestro conocimiento, éste es el primer estudio que evalúa el potencial diagnóstico de la determinación de anticuerpos libres y disociados de complejos inmunes empleando un conjunto de proteínas recombinantes específicas del complejo *tuberculosis* y en un amplio rango de pacientes con TB incluyendo pacientes con tuberculosis extrapulmonar. Encontramos que ninguna de las proteínas recombinantes evaluadas, por sí sola, fue reactiva con la mayoría de los sueros de pacientes con TB, ni siquiera después de considerar la contribución de la medición de anticuerpos disociados de complejos inmunes; el uso de mezclas de antígenos mejoró significativamente la utilidad del EIE como técnica complementaria para el diagnóstico de la enfermedad, permitiendo la identificación de casi un 70% de los pacientes con tuberculosis pulmonar baciloscopia negativa, con una alta especificidad, especialmente en el grupo de enfermedades incluidas en el diagnóstico diferencial, como micosis o micobacteriosis; estos hallazgos son promisorios y permiten presumir que el empleo de antígenos recombinantes específicos adicionales podría conducir a la detección de anticuerpos libres y disociados de la mayoría de los pacientes con TB activa. Además, la observación acerca de que altas reactividades séricas frente a un antígeno son suficientes para mantener su positividad cuando se emplean mezclas de antígenos, mientras que algunas reactividades bajas hacia uno o más antígenos se pierden cuando estos sueros se enfrentan a las mezclas, tiene importantes implicancias prácticas para el diseño de combinaciones de antígenos que permitan incrementar la capacidad diagnóstica de una prueba serológica; por tanto para una buena caracterización de un determinado antígeno sería muy valioso que los estudios acerca de su reactividad evaluaran no sólo la proporción de pacientes con TB positivos, sino también la proporción de los sueros con alta reactividad frente al antígeno en cuestión.

REFERENCIAS

1. Pereira Poza A. “La paciencia al sol”. Edición Do Castro; 1999. Coruña.
2. World Health Organization. Global Tuberculosis Control: Surveillance, planning, financing. WHO/HTM/TB/2008. 393- Geneva; 2008.
3. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Dr. Emilio Coni”. Notificación de casos de tuberculosis en la República Argentina. PRO.TB.Doc.Tec.07/07. Santa Fe 2007.
4. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Dr. Emilio Coni”. Mortalidad por tuberculosis en la República Argentina. PRO. TB.Doc.Tec.08/07. Santa Fe 2007.
5. Kritski A, Fiuza de Melo FA. Tuberculosis in adults. *En: Tuberculosis 2007 from basic science to patient care*. Editores Palomino JC, Leao SC, Ritacco V <http://www.tuberculosis-textbook.com/tuberculosis2007> (Fecha de acceso: mayo 2007).
6. Morcillo N. Tuberculosis in children. *En: Tuberculosis 2007 from basic science to patient care*. Editores Palomino JC, Leao SC, Ritacco V. <http://www.tuberculosis-textbook.com/tuberculosis2007> (Fecha de acceso: mayo 2007).
7. Caminero Luna J. Guía de la tuberculosis para médicos especialistas. Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias 2003. Paris.
8. Farga V. Tuberculosis. Ed. Mediterráneo, Santiago de Chile 1982. Segunda edición.
9. Knowels MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airway. *J Clin Invest* 2002; 109: 571-577.
10. Van Crevel R, Ottenhoff THM, Van der Meer JWM. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002; 15: 294-309.
11. Ferguson JS, Schlesinger LS. Pulmonary surfactant in innate immunity and pathogenesis of tuberculosis. *Tubercle Lung Dis* 2000; 80:173-184.
12. Hershfield ES. Tuberculosis. New York .2000. 2nd Edition.
13. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001; 13:93-129.
14. Stugill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russel DG. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 1994; 263:678-681.

15. Ulrich T, Faufmann SHE. Mycobacterial persistence and immunity. *Front Biosci* 2002; 7:458-469.
16. Christensen D. Know your enemy. Genetic studies of tuberculosis. *Science News* 2000; 158: 270-274.
17. Rivas B, Santiago P, Vieyra R, Araujo Z. Respuesta de inmunidad celular en la tuberculosis pulmonar. *Rev Invest Clin* 2005; 46:391-412.
18. Schluger NW. Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis. *Respir Res* 2001; 2:157-163.
19. Kaufmann SHE. New issues in tuberculosis. *Ann Rheum Dis* 2004; 63:50-56.
20. Sadek M, Sada E, Toosi Z, Schwander S, Rich E. Chemokines induced by infections of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. *Am Respir Cell Mol Biol* 1998; 19:513-521.
21. Adams O. The granulomatous inflammatory response. Review. *Am J Pathol.*1976; 84:164–191.
22. Ramakrishnan L, Federspiel NA, Falkow S. Granuloma-specific expression of *Mycobacterium* virulence proteins from the glycine-rich PE-PGRS family. *Science* 2000; 288:1436-1439.
23. Volkman HE, Clay H, Beery D, Chang J, Sherman D R, Ramakrishnan L. Tuberculous granuloma formation is enhanced by a *Mycobacterium* virulence determinant. *PloS Biology* 2004; 2: 1946-1957.
24. Young DB. Structure of mycobacterial antigens. *Br Med Bull* 1988; 44:562-583.
25. Lyaschenko K, Colangeli R, Houde M, H.Jadhali, D.Menzies, Gennaro M.L. Heterogeneous antibody responses in Tuberculosis. *Infect Immun* 1998; 66:3936-3940.
26. Samanich K M, Belisle M G, Sonnerberg M A, Keen S, Laal S. Delineation of human antibody responses to culture filtrate antigens *M. tuberculosis*. *J Infect Dis* 1998; 178:1534-1538.
27. Foulds J, O'Brien R. New tools for the diagnosis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2:778-783.
28. Perkins MD. New diagnostic tools for tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4:182-188.

29. Barrera LB, Montoro E. Nuevas herramientas diagnósticas en las redes de laboratorios de Latinoamérica. OPS-OMS. 2007.
30. Zerbini E. Tipificación de micobacterias mediante cromatografía gaseosa. Tesis de Maestría en Microbiología Molecular. UNSAM 2000.
31. Salazar Lezama M, Quiroz Rosales H, Banales Mendez JL, Sánchez Guzmán M, Villareal-Velarde H, Baez Saldana R. Diagnostic methods of primary tuberculosis pleural effusion in a region with high prevalence of tuberculosis. A study in Mexican population. *Rev Invest Clin* 1997; 49:453-456.
32. Lima DM, Colares KB, Fonseca BA. Combined use of polymerase chain reaction and detection of adenosine deaminase activity on pleural fluid improves the rate of diagnosis of pleural tuberculosis. *Chest* 2003; 124:909-914.
33. Neves DD, Dias R, da Cunha A, Preza PC. What is the probability of a patient presenting a pleural effusion due to tuberculosis. *Bras J Infect Dis* 2004; 8:311-318.
34. Greco S, Girardi E, Navarra A, Saltini C. The current evidence on diagnostic accuracy of commercial based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. A meta-regression analysis. *Thorax*. 2006; 61:783-790.
35. Center for Disease Control. Update: Nucleic acid amplification test for tuberculosis *MMWR* 2000; 49:593-594.
36. Ridderhof JC, Williams LO, Legois S, Shult PA, Metchock B, Kubista LN. Assessment of laboratory performance of nucleic acid amplification tests for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2003; 41:5258-5261.
37. Suffys P, Palomino JC, Cardoso Leao S, Estipia C, Cataldi A, Alito AI. Evaluation of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4:179-183.
38. Beige J, Lokies J, Schaberg T et al. Clinical evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* PCR assay. *J Clin. Microbiol.* 1995; 33: 90-95.
39. Gennaro ML. Immunologic diagnosis of tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2000; 30:243-246.
40. Bothamley GH. Serological diagnosis of tuberculosis. *Eur Respir J* 1995; 20 (Suppl):676-688.

41. Chan ED, Heifets L, Iseman MD. Immunological diagnosis of tuberculosis: a review. *Tuberc Lung Dis* 2000; 80:131-140.
42. Nassau E, Parsons ER, Johnson GD The detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Tubercle*. 1976; 57: 67-70.
43. Grange JM, Gibson J, Batty A, Kardjito T. The specificity of the humoral immune response to soluble mycobacterial antigens in tuberculosis. *Tubercle* 1980; 61:153-156.
44. Grange JM, Kardjito T. Serological tests for tuberculosis: can the problem of low specificity be overcome? *Indian J Chest Dis Allied Sci* 1982; 24:108-117.
45. Benjamin RG, Debanne SM, Ma Y, Daniel TM. Evaluation of mycobacterial antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of tuberculosis. *J Med Microbio* 1984; 18:309-318.
46. Kiran U, Shriniwas, Kumar R, Sharma A. Efficacy of three mycobacterial antigens in the serodiagnosis of tuberculosis. *Eur J Respir Dis* 1985; 66:187-195.
47. Benjamín RG, Daniels TM. Serodiagnosis of tuberculosis using the enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) of antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126:1013-1016.
48. Reggiardo Z, Vazquez E, Schnaper L. ELISA tests for antibodies against mycobacterial glycolipids. *J Immunol Methods* 1980; 34:55-60.
49. Sada E, Brennan PJ, Herrera T, Torres M. Evaluation of lipoarabinomannan for the serological diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1990; 28:2587-2590.
50. Yukiko Fujita Takeshi Doi, Koji Sato, IkuyaYano. Diverse humoral immune responses and change IgG antibody levels against mycobacterial lipid antigens in active tuberculosis. *Microbiology* 2005; 115: 2065-2074.
51. Lyashchenko KP, Singh M, Colangeli R, Gennaro ML. A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases. *J Immunol Methods* 2000; 242:91-100.
52. Carr RI, Chakraborty AK, Brunda MJ. Immune complexes and antibodies to BCG in sera from patients with mycobacterial infections. *Clin Exp Immunol* 1980; 39:562-569.
53. Brostoff J, Lenzini L, Rottoli P. Immune complexes in the spectrum of tuberculosis. *Tubercle* 1981; 62:169-173.

54. Grange JM. The humoral immune response in tuberculosis: its nature, biological role and diagnosis usefulness. *Adv Tuberc Res* 1984; 21:1-78.
55. Shende N, Gupta S, Kumar S, Harinath BC. Levels of antibody, free antigen and immune-complexed antigen by ELISA in different grades of sputum positive patients of pulmonary tuberculosis. *Indian J Pathol Microbiol* 2004; 47: 438-443.
56. Yamashita JT, Cruaud P, Papa F, Rotta O, David HL. Circulating immune complexes in leprosy sera: demonstration of antibodies against mycobacterial glycolipidic antigens in isolated immune complexes. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1993; 61:44-50.
57. Chiang IH, Suo J, Bai KJ. Serodiagnosis of tuberculosis. A study comparing three specific mycobacterial antigens. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:906-1011.
58. Andersen A, Hansen E. Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1989; 8: 2481-2488.
59. Singh M, Andersen AB, Mc Carthy JEG. The *Mycobacterium tuberculosis* 38kDa antigen: overproduction in *E. coli*, purification and characterization. *Gene* 1992; 117: 53-60.
60. Bothamley GH, Rudd R, Festeintein F. Clinical value of the measurement of *Mycobacterium tuberculosis* specific antibody in pulmonary tuberculosis. *Thorax* 1992; 47: 270-275.
61. Espitia C, Cervera I, Gonzalez R. 38kDa *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection its isolation and serologic evaluation. *Clin Exp Immun* 1989; 77: 373-377.
62. Jackett PS, Bothamley GH, Batra HV, Mistry A, Young DB, Ivanyi J. Specificity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1988; 2:2313-2318.
63. Daniel T, Cauthen GM, Collins FM. Improving methods for detecting infecting persons at risk of developing disease. Supplement on future research in tuberculosis. Prospects and priorities for elimination. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134:409-413.
64. Bothamley GH, Beck JS, Potts RC. Specificity of antibodies and tuberculin response after occupational exposure to tuberculosis. *J Infect Dis* 1992; 166:182-186.

65. Imaz MS, Comini MA, Zerbini E. Evaluation of the recombinant 16 Kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in childhood tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5:1036-1043.
66. Wiker HG and Harboe M. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis* *Microbiol Rev*. 1992 December; 56(4): 648–661.
67. De Wit TF, Bekelie S, Osland A. The *Mycobacterium leprae* antigen 85 complex gene family: identification of the genes for the 85A, 85C, and related MPT51 proteins. *Infect Immun* 1993; 61:3642-3647.
68. Samanich K, Belisle JT, Laal S. Homogeneity of antibody responses in tuberculosis patients. *Infect Immun* 2001; 69:4600-4609.
69. Van Vooren JP, Drowart A, de Cock M. Humoral immune response of tuberculous patients against the three components of the *Mycobacterium bovis* BCG 85 complex separated by isoelectric focusing. *J Clin Microbiol* 1991; 129:2348-2350.
70. Sada ES, Ferguson E, Daniels MT. An ELISA for the serodiagnosis of tuberculosis using a 30kDa native antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1990; 162: 928-931.
71. Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ, Besra GS. Role of the major antigens of *M. tuberculosis* in cell wall biosynthesis. *Science* 1997; 276:1420-1422.
72. Raja A, Uma Devi, et al., Serologic response to secreted and cytolysed antigens *M. tuberculosis* in childhood tuberculosis *Pediatric Infect Dis J*, 2001 ; 20: 1161-1164
73. Wiker HG, Harboe M. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Rev* 1992; 56: 648–661.
74. Barrera L, Ritacco V, Eisele C, et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for the rapid diagnosis of paucibacillary tuberculosis in adults. *Medicina* 1989; 49:561-566.
75. Hogarth PJ, Logan KE, Vordermeier HM. Protective immunity against *Mycobacterium bovis* induced by vaccination with RV3109c- a member of the esat-6 gene family. *Vaccine* 2005; 23:2557-2564.
76. Sánchez-Rodríguez C, Estrada-Chávez C, García-Vigil J, Laredo-Sánchez F, Halabe-Cherem J, Pereira-Suárez A, Mancilla R. An IgG antibody response to the antigen 85 complex is associated with good outcome in Mexican Totonaca Indians with pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6:706-712.

77. Uma Devi KR, Ramalingam B, Brennan PJ, Narayanan PR, Raja A. Specific and early detection of IgG and IgM antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* 38kDa antigen in pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 2001; 81:249-253.
78. Raja A, Uma Devi KR, Ramalingam B, Brennan PJ. Immunoglobulin G, A and M responses in serum and circulating immune complexes elicited by 16-Kilodalton antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diagnostic Laboratory Immunol* 2002; 9:308-312.
79. Raja A, Uma Devi KR, Ramalingam B, Brennan PJ. Improved diagnosis of pulmonary tuberculosis by detection of free and immune complex bound anti-30kDa antibodies. *Diagnostic Microbiol Infect Dis* 2004; 50:253-259.
80. Draper N, Smith H. *Applied regression analysis*, 2 ed. New York, USA: Wiley, 1981.
81. Toman K. Sensitivity, specificity and predictive value of diagnostic tests. *Bull Int Union Tuberc* 1979; 54:275-276.
82. Cocito CG. Properties of the mycobacterial antigen complex A60 and its applications to the diagnosis and prognosis of tuberculosis. *Chest* 1991; 100:1687-1693.
83. Alifano M, De Pascalis R, Sofia M. Evaluation of IgA-mediated humoral immune response against the mycobacterial antigen P-90 in diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Chest* 1997; 11:601-605.
84. Verbon A. Development of a serological test for tuberculosis. *Trop Geog Med* 1994; 46:275-279.
85. Lambert PH, Dixon FJ, Zubler RH. A WHO collaborative study for the evaluation of eighteen methods for detecting immune complexes in serum. *J Clin Lab Immunol* 1978; 1:1-15.
86. Bhattacharya A, Ranadive SN, Kale M, Bhattacharya S. Antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for determination of immune complexes in clinical tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134:205-209.
87. Singh G, Bhau LN, Saxena SN. Circulating immune complexes in pulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res* 1986; 83:117-122.
88. Bajaj G, Rattan A, Ahmad P. Circulating immune complexes in tuberculosis an indicator of activity. *Indian J Pediatr* 1990; 57:203-207.

89. Udaykumar, Saxena RK. Acid pH-induced changes in the immunoreactivity of specific antigen and antibody in circulating immune complexes from tuberculosis sera. *J Clin Lab Annals* 1992; 6:94-200.
90. Saxena U, Saxena RK. Antigenic epitopes on *Mycobacterium tuberculosis* recognized by antibodies in tuberculosis and mouse antisera. *FEMS Microbiol* 1991; 76:7-12.
91. de Vries RR, Ottenhoff TH, van Schooten WC. Human leukocyte antigens (HLA) and mycobacterial disease. *Springer Semin Immunopathol* 1988; 10:305-318.
92. Wilkinson RJ, Haslov K, Rappuoli R. Evaluation of the recombinant 38-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis* as a potential immunodiagnostic reagent. *J Clin Microbiol* 1997; 35:553-557.
93. Behr MA, Warren SA, Salaman H. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet* 1999; 353: 444-449.
94. Simmone N, Bourrillon A, Lagrange PH. Analysis of circulating immune complexes (CICs) in childhood tuberculosis: levels of specific antibodies to glycolipid antigens and relationship with serum antibodies. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4:152-160.
95. Gupta I, Jain A, Singh NB, Chaturvedi V, Agarwal SK. Role of antigen specific circulating immune complexes in diagnosis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2:456-461.