

50524
25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS UTILIZANDO
LA FRACCIÓN 4MT DE *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra PARA
DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE TUBERCULOSIS PULMONAR.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

MARCELA

CRUZ

HERNÁNDEZ

ASESORES:

Q.F.B. SILVIA GONZÁLEZ MATEOS

Q.F.B. Ma. DE LAS MERCEDES ZAMUDIO DURÁN

México, D.F.

Noviembre, 2002



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACIÓN DISCONTINUA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS UTILIZANDO LA
FRACCIÓN 4MT DE *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra PARA
DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE TUBERCULOSIS PULMONAR.**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunología Aplicada del Departamento de Investigaciones Inmunológicas del INDR, con la dirección de la Q.F.B. Silvia González Mateos y el Dr. Alejandro Escobar Gutiérrez.

México, D.F. 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2

Los estudios de cromatografía en capa fina, se llevaron a cabo en colaboración con la Dra. María Isabel Baeza Ramírez y el Dr. Miguel Ibáñez Hernández en el laboratorio de Biomembranas del Departamento de Bioquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3

Dedico esta Tesis a mi esposo

Aldo Fabián Méndez Montes

A mi hijo Iván

A mi familia

A todos mis amigos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4

AGRADECIMIENTOS

A esta Honorable Institución por todo el apoyo que me ha brindado para alcanzar esta meta.

A mi Directora de Tesis, Q.F.B. Silvia González Mateos, por sus consejos, apoyo, y observaciones de este trabajo.

Al Dr. Alejandro Escobar Gutiérrez, Dra. Ma. Isabel Baeza Ramírez, Dr. Miguel Ibáñez Hernández, Q.F.B. Ma. de las Mercedes Zamudio Durán y Q.F.B. Yolanda Flores Cabrera, por sus acertados consejos que enriquecieron este trabajo.

A Lupita Torres, Lupita Granados y Fer por su invaluable ayuda.

A mis compañeros del laboratorio: Raquel, Geovani, Hugo, que han contribuido para la culminación de este trabajo.

A mi hijo por el tiempo concedido y su comprensión para la culminación de mi meta, TE AMO.

A mi esposo por todo su apoyo, amor y confianza que siempre me brindo, los cuales fueron de gran valor en los momentos difíciles, TE AMO.

A mis amigos: Lorena, Ale B., Ale F., Manuel, Maru, Nelly, Ale Almógar, Oscar, Ingrid, David, que de alguna manera han contribuido a la terminación de este trabajo.

A mi querido profesor: Antonino Saénz Prieto.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5

A MI FAMILIA

Hay cosas que prefiero expresarlas por escrito, sin embargo no encuentro palabras que reflejen fielmente todo lo que significan en mi vida, pero puedo asegurarles que son indispensables para sentirme feliz. Además debo admitir que con su ejemplo me han enseñado cosas que valoro y agradezco.

Gracias a ustedes siempre tengo un objetivo que alcanzar.

A mi Mamá y a mi Papá.

A mis hermanos: Luis, Rubén, Víctor, René, Eduardo, Gabriel, Miguel, Cecilia.

A mi Tía Nacha y mi prima Eli.

A mis suegros: Victoria y Eleazar

A mis cuñados: Cintli, Paty, Armida, Linda, Tatiana, Angélica, Dante, Alfonso.

A mis sobrinos: Hazel, Cristian, Ian, Lalo, Martha, Pame, Itzel, Aurora, Oscar,
Jericó

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	1
HISTORIA DE LA TUBERCULOSIS	3
EPIDEMIOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS	5
ASPECTOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD	7
PATOGENIA	9
ETIOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS	11
CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS	11
PROPIEDADES BIOLÓGICAS	12
MECANISMOS DE PROTECCIÓN CONTRA LAS DEFENSAS	
ORGÁNICAS DEL HOSPEDERO	12
COMPOSICIÓN QUÍMICA	13
a) PROTEÍNAS	15
b) MOLÉCULAS COMPUESTAS	16
c) LÍPIDOS	17
EFFECTO DE LOS LÍPIDOS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE DEL HUÉSPED	20
EFECTOS POTENCIADORES	20
EFECTOS SUPRESORES	22
RESPUESTA INMUNOLÓGICA CONTRA <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
RESPUESTA INMUNE CELULAR	23

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CD1	23	
RECEPTORES Toll-like (TLR) EN INMUNIDAD INNATA PARA TUBERCULOSIS	24	
HIPERSENSIBILIDAD DE TIPO TARDÍO	26	
RESPUESTA INMUNOLÓGICA HUMORAL	27	
IMPORTANCIA DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS	27	
MÉTODOS SEROLÓGICOS COMO DIAGNÓSTICO	28	
LIPOSOMAS	29	
ELISA LIPOSOMAL	32	
DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS	33	
ESTUDIO MICROSCÓPICO	33	
CULTIVO	34	
PRUEBAS CUTÁNEAS	35	
WESTERN BLOT	36	
DIAGNÓSTICO MOLECULAR	37	
CROMATOGRAFÍA	37	
INMUNOPROFILAXIS	38	
TRATAMIENTO	39	
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	42	
OBJETIVOS	43	
HIPÓTESIS	43	
DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	44	
MATERIAL Y MÉTODOS	45	
MATERIAL DIVERSO Y EQUIPO		45
SOLUCIONES Y REACTIVOS	46	
METODOLOGÍA	47	
PLAN DE TRABAJO	54	

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS	55
ANÁLISIS	77
CONCLUSIONES	81
ANEXO 1	82
ANEXO 2	87
ANEXO 3	88
ANEXO 4	89
REFERENCIAS	90

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS	Página
Figura 1. Robert Koch	4
Figura 2. Incidencia de tuberculosis pulmonar en México año 2001	6
Figura 3. Incidencia de tuberculosis pulmonar en México año 2002	6
Figura 4. Focos tuberculosos en México	7
Figura 5. Modo de transmisión	8
Figura 6. Bacilos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
Figura 7. Aspecto de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> por tinción de Ziehl Neelsen	11
Figura 8. Disposición típica de las colonias de <i>M. tuberculosis</i> y estructura general	13
Figura 9. Pared celular micobacteriana	14
Figura 10. Estructura química de algunos lípidos de importancia de las micobacterias	19
Figura 11. Arreglo típico de un liposoma	29
Figura 12. Clasificación de los lípidos con base en su forma molecular	31
Figura 13. Tinción de Ziehl Neelsen y tinción de fluorescencia	33
Figura 14. Cultivo en medio de Lowenstein Jensen	34
Figura 15. Prueba de PPD	36
Figura 16. Mecanismo de acción de la isoniacida	41
Figura 17. Gel de poliacrilamida al 18% con 1% de glicerol con Sudán negro y Azul de Comassie	55
Figura 18. Curva estándar de marcadores de bajo peso molecular	56
Figura 19. Reconocimiento inmunogénico de la fracción 4MT	56
Figura 20. Cromatografía en capa fina de la fracción 4MT	57
Figura 21. Placa de ELISA empleando sueros problema y control	57
Figura 22. Gráfico de resultados por ELISA-4MT	63
Figura 22. Gráfico de resultados por ELISA-4MT	69

INDICE DE TABLAS

TABLAS	Página
Tabla 1. Lípidos micobacterianos	17
Tabla 2. Lípidos presentes en diferentes especies de <i>Mycobacterium</i>	20
Tabla 3. Tratamiento para <i>M. tuberculosis</i>	40
Tabla 4. Marcadores de bajo peso molecular	55
Tabla 5. Elaboración de la curva estándar de marcadores de bajo peso molecular	55
Tabla 6. Resultados de grupo de sueros sanos con ELISA-4MT	58
Tabla 7. Resultados de grupo de sueros con tuberculosis pulmonar con ELISA-4MT	60
Tabla 8. Resultados de grupo de sueros con lepra lepromatosa por ELISA-4MT	61
Tabla 9. Resultados de grupo de sueros con histoplasmosis por ELISA-4MT	61
Tabla 10. Resultados de grupo de sueros con cisticercosis por ELISA-4MT	62
Tabla 11. Resultados de grupo de sueros con micetoma por ELISA-4MT	62
Tabla 12. Resultados de grupo de sueros sanos con ELISA-liposomal	64
Tabla 13. Resultados de grupo de sueros con tuberculosis pulmonar con ELISA-liposomal	66
Tabla 14. Resultados de grupo de sueros con lepra lepromatosa por ELISA-liposomal	67
Tabla 15. Resultados de grupo de sueros con histoplasmosis por ELISA-liposomal	67
Tabla 16. Resultados de grupo de sueros con cisticercosis por ELISA-liposomal	68

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 17. Resultados de grupo de sueros con micetoma por ELISA-liposomal	68
Tabla 18. Resultados de las pruebas aplicadas a la población de sueros sanos	70
Tabla 19. Resultados de las pruebas aplicadas a la población de sueros con tuberculosis pulmonar	72
Tabla 20. Tabla de contingencia para el ELISA-4MT	74
Tabla 20. Tabla de contingencia para el ELISA-liposomal	75
Tabla 21. Índice operativo de las pruebas aplicadas e intervalo de Confianza al 95%	75
Tabla 22. Prueba de concordancia de las pruebas aplicadas	76

ABREVIATURAS

BAAR	Bacilo ácido alcohol resistente
BCG	Bacilo de Calmette y Guerin
BSA	Albúmina sérica bovina
CCF	Cromatografía en capa fina
DAB	Diaminobencidina
DTH	Hipersensibilidad de tipo tardío
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ESMTB	Extracto soluble de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
ELISA-ESBCG	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas utilizando extracto del bacilo de <i>Mycobacterium bovis</i> cepa BCG
ELISA-4MT	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas utilizando la fracción 4MT de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
ELISA-LIPOSOMAL	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas utilizando liposoma constituido de fosfatidilcolina-fracción 4MT
Fracción 4MT	Extracto lipídico de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra con peso molecular cercano a 4 kDa.
Gp	Glicoproteína
HLA	Antígeno linfocitario humano
HSP	Protelna de choque térmico
IET	Inmunolectrotransferencia o Western blot
IFN- γ	Interferón γ
IL	Interleucina
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INH	Isoniazida
LAM	Lipoarabinomanana
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MAF	Factor activador de macrófagos
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1
MDGF	Factor de crecimiento derivado de macrófagos
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MOOT	Micobacterias diferentes de tuberculosis
MPM	Marcadores de peso molecular
NK	Células "asesinas naturales"
PAS	Ácido peryódico de Schiff
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMN	Polimorfonucleares
PPD	Derivado proteico purificado
Rf	Relación de frentes de corrimiento
ROI	Intermediarios reactivos de oxígeno
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poli(acrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
T- $\alpha\beta$	Linfocitos T $\alpha\beta$
T- $\gamma\delta$	Linfocitos T $\gamma\delta$
TBP	Tuberculosis pulmonar
TGF- β	Factor de crecimiento transformante- β
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
VPP	Valor predictivo de positividad
VPN	Valor predictivo de negatividad

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

El diagnóstico de tuberculosis por aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* es la prueba ideal o "estándar de oro", pero debido a su lento crecimiento es necesario desarrollar técnicas alternativas. La búsqueda de anticuerpos específicos es una excelente opción por su bajo costo, especificidad y rapidez. Se compararon dos ELISA, una con la forma seca de la fracción lipídica 4MT (peso molecular de 4 kDa) de *M. tuberculosis* y otra con la misma incluida en liposomas organizados con fosfatidilcolina, para analizar la importancia de arreglos moleculares en la presentación de antígenos. Se analizaron sujetos clínicamente sanos (n=73), tuberculosis confirmados bacteriológicamente (n=34) y sospechosos de tuberculosis (n=39). Los resultados muestran que el ELISA-4MT con la fracción seca es la más útil en el diagnóstico (sensibilidad del 80.8% y especificidad del 93.1%). La especificidad de ELISA-LIPOSOMAL fue alta (94.5%) pero no su sensibilidad (71.2%) por lo que se sugiere ensayar el mismo antígeno en liposomas organizados con otros lípidos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis continua siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, incluyendo a México, esta enfermedad se pensaba prácticamente controlada, pero en años recientes ha vuelto a incrementarse por lo cual ahora se le considera como reemergente; en nuestro país es un problema muy importante de salud pública y más del 90% de los casos son pulmonares. Entre los mecanismos de control de la enfermedad que son de mayor relevancia está el diagnóstico oportuno de casos. Los métodos rutinarios para este efecto incluyen la identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en frotis de material clínico y el cultivo e identificación del agente causal. Sin embargo estos procedimientos tienen limitaciones: se necesitan por lo menos 5,000 bacilos por mililitro de muestra para que la baciloscopía sea positiva y no se diferencia *Mycobacterium tuberculosis* de otros BAAR, en tanto que la confirmación por cultivo es un procedimiento caro y tardado. Además en casos extrapulmonares, estos métodos resultan muy ineficientes por la dificultad de obtención de muestras y por la escasez relativa de bacilos. Por estos motivos, es necesario buscar otros métodos diagnósticos de laboratorio que sean rápidos, confiables y de bajo costo.

En este trabajo la fracción purificada 4MT de *M. tuberculosis* H37Ra se caracterizó parcialmente por tinción de geles de poliacrilamida con Sudán Negro B, azul de Coomassie, plata y tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS), posteriormente se analizó su composición bioquímica por cromatografía en capa fina (CCF) revelándose con diferentes soluciones: con yodo, con molibdato, con bismuto y con ninhidrina.

Posteriormente se evaluaron dos ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas o ELISA (del inglés: *enzyme-linked immunosorbent assay*) para la detección de casos de tuberculosis activa por medio de la búsqueda de anticuerpos en sueros de individuos con síntomas compatibles con esta enfermedad. El antígeno utilizado fue la fracción 4MT de *M. tuberculosis*, previamente identificada por

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

inmunoelctrotransferencia (IET), en dos presentaciones, una en forma seca (ELISA-4MT) y la otra incorporada en liposomas (ELISA-LIPOSOMAL), como "estándar de oro" se utilizó el cultivo en medio de Lowenstein-Jensen y se compararon los resultados con los datos previos de presencia de BAAR, los obtenidos con ELISA-ESBCG (ELISA utilizando como antígeno un extracto soluble de *M. bovis* cepa bacilo de Calmette y Guérin, bacilo ácido alcohol resistente) y con IET. Se ensayaron seis grupos de sueros: (1) de individuos clínicamente sanos, (2) pacientes con lepra lepromatosa, (3) con cisticercosis, (4) con histoplasmosis, (5) con micosis diferentes de histoplasmosis y (6) con tuberculosis con cultivo e identificación positiva de *M. tuberculosis*, al ser evaluados los dos ensayos se halla que la ELISA-4MT es una herramienta útil para complementar el diagnóstico serológico de la tuberculosis pulmonar y ser considerada como prueba diagnóstica en un centro de referencia, esperándose mejorar aún más al emplear antígenos purificados, sintéticos, solos o en mezclas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MARCO TEÓRICO

HISTORIA DE LA TUBERCULOSIS

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa, generalmente crónica, causada por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*), que se trasmite del enfermo al sujeto sano por inhalación de material infectante, ingestión de leche de vaca infectada por dicho complejo, contacto con personas enfermas bacilíferas o bovinos enfermos. No obstante, en nuestro entorno hay personas que son portadores asintomáticos o con tuberculosis de tipo extrapulmonar y siguen propagando la enfermedad.¹⁻⁵

Es una enfermedad antigua, las primeras referencias sobre esta se encuentran en escritos del Antiguo Egipto, Babilonia y China. En cambio, el término tuberculosis, derivado de la palabra latina *tubercula* que significa protuberancia pequeña o nódulo pequeño, no se utilizó hasta 1839. La tuberculosis aparece en Europa y en los Estados Unidos en el siglo XIX en forma de epidemia. Los mayores registros se alcanzaron durante la Revolución Industrial causando más del 30% de las muertes. La superpoblación y el hacinamiento en las ciudades, común en esta época, favorecían esta enfermedad. En los primeros años del siglo XIX los médicos franceses Gaspard Laurent Bayle y René Laénc establecieron las formas y estadios de la tuberculosis como enfermedad; ambos fallecieron por su causa.^{1,6-8}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En 1882, el alemán Robert Koch aisló la bacteria causal y demostró cómo se transmitía. A partir de entonces, *Mycobacterium tuberculosis* se conoce también con el nombre de "bacilo de Koch".^{1, 6-8}



Figura 1. Roberto Koch ⁶⁷

Ocho años después, se desarrolló la prueba de la tuberculina para el diagnóstico de la enfermedad. En 1924, los bacteriólogos franceses Albert León Calmette y Alphonse F.M. Güerin desarrollaron una vacuna denominada BCG (Bacilo de Calmette-Güerin). El primer agente quimioterapéutico específico para la tuberculosis fue la estreptomicina, descubierta por el microbiólogo norteamericano Selman Abraham Waksman en 1944.^{1, 6-8}

En la actualidad existen fundamentalmente, cuatro factores responsables del incremento de número de casos de tuberculosis:

- la coinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)
- la aparición de resistencias a los tuberculostáticos,
- la inmigración desde zonas de alta prevalencia y
- las deficiencias en las medidas de salud pública.^{1, 6-8}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

EPIDEMIOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS

La fuente de infección más frecuente es el ser humano. El contacto estrecho y la exposición masiva hacen más probable la transmisión, el riesgo de enfermar es proporcional a la tasa de infección activa en la población. La enfermedad está influida por la edad, sexo, desnutrición, estado inmunitario, otros factores de resistencia individuales del huésped y en gran medida a las desventajas socioeconómicas de los individuos. ^{6, 9-12}

Hoy en día, la tuberculosis produce la muerte de más jóvenes y adultos en el mundo que cualquier otra enfermedad infecciosa. Es la primera causa de mortalidad femenina y acaba con la vida de unos 100,000 niños cada año. La tuberculosis es frecuente en todo el mundo especialmente en los países en vías de desarrollo y en las áreas urbanas más pobladas de los países desarrollados. Camboya, Zimbabwe, Perú y Uganda registran la mayor incidencia acumulativa de casos nuevos de la enfermedad. La prevalencia mayor se encuentra en el sudeste de Asia. En los últimos años, se han detectado nuevos brotes infecciosos en Europa del Este, donde las muertes por esta causa están aumentando después de casi 40 años de descenso continuo. ^{6, 9-12}

Cada segundo *M. tuberculosis* infecta a una persona en el mundo.

A pesar de que la tuberculosis se había considerado controlada en los países desarrollados la OMS informa que en el mundo un tercio de la población se encuentra infectada por el *Mycobacterium tuberculosis*, cada año se estima una ocurrencia de más de 10 millones de casos nuevos y 3.5 millones de defunciones por tuberculosis. En nuestro país, la tasa de incidencia varía de acuerdo a las diferentes entidades federativas, entre 4.5 y 42 casos por cada 100,000 habitantes reportados en el año 2001. ^{1, 3, 6, 9-12}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Incidencia de Tuberculosis Pulmonar en México en el año 2001

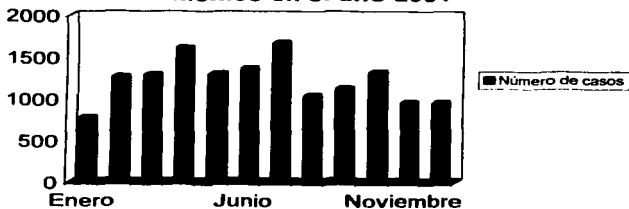


Figura 2. Incidencia de tuberculosis pulmonar en México en el año 2001 según el reporte del Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Secretaría de Salud.¹²

Incidencia de Tuberculosis Pulmonar en México hasta julio del 2002

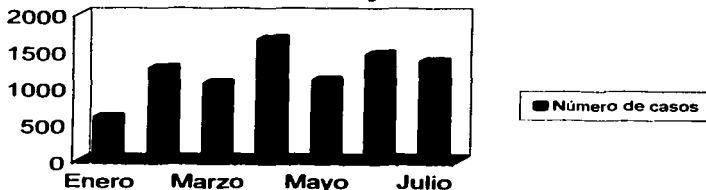


Figura 3. Incidencia de tuberculosis pulmonar en México reportada hasta julio del año 2002.¹²

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 4. Focos tuberculosos en México⁸⁷

ASPECTOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD

La bacteria se transmite de persona a persona, fundamentalmente por aerosoles, por lo cual los focos de infección se localizan básicamente en los pulmones. Una persona al tener un primer contacto desarrolla una infección primaria o enfermedad tuberculosa primaria, en la cual la principal forma de diseminación es a través de circulación sanguínea y linfática (linfohematógena) y las principales formas clínicas de la enfermedad son el complejo primario gangliopulmonar (complejo de Ranke, neumonía tuberculosa, tuberculosis miliar pulmonar, meningoencefalitis tuberculosa y/o tuberculosis miliar sistémica o diseminada. Dicha enfermedad primaria frecuentemente se autolimita, dejando un nódulo calcificado pulmonar, ganglionar o bien focos latentes o "inactivos" en diferentes órganos o tejidos. Se ha calculado que no más del 5% de las personas infectadas son capaces de progresar a enfermedad en los meses o años siguientes

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

determinando la tuberculosis posprimaria y muchos años después causando las tuberculosis de reactivación endógena. 7, 10, 13, 14

Los factores que favorecen la transmisión de la enfermedad son: 15-17

- ❖ Virulencia de los bacilos
- ❖ Cantidad de bacilos
- ❖ Condiciones del hospedero (edad, sexo, factores genéticos, desnutrición, alcoholismo, infecciones virales (VIH), asociación con otras enfermedades o tratamientos inmunosupresores).



Figura 5. Modo de transmisión, contacto-caso nuevo(cortesía Q.F.B. Silvia González)

Cuando la infección tuberculosa ocurre en una persona previamente expuesta al bacilo tuberculoso, se le denomina infección o enfermedad tuberculosa secundaria, de reinfección o de tipo adulto. La reinfección puede ser endógena (a partir de un foco o nódulo tuberculoso latente) o exógena (por contacto del paciente con nuevos bacilos a partir de una persona enferma bacilífera). En ésta las lesiones progresan por extensión directa o por diseminación broncógena y menos frecuentemente por vía hematógena y las formas clínicas más

frecuentemente observadas corresponden a tuberculosis pulmonar cavitada, o bien a formas clínicas localizadas en ciertos órganos o tejidos (renal, óseo, ganglionar, etc.) sin aparente relación con un foco pulmonar "activo", difíciles de tratar y que rara vez se autolimitan. Los síntomas de la tuberculosis diseminada tienden a ser inespecíficos: fiebre, pérdida de peso, estado mental anormal. La imagen de rayos X puede ser normal. Aunque los hallazgos de laboratorio no son diagnósticos, puede haber cambios hematológicos, deficiencia de sales de sodio en sangre (hiponatremia) y elevaciones de la fosfatasa alcalina. En ausencia de tratamiento, el curso de la tuberculosis diseminada puede ser fatal. ^{7, 15-17}

PATOGENIA

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa, involucra diversos órganos o tejidos, preferentemente en nivel pulmonar, la primera infección con un bacilo de tuberculoso se produce en cualquier parte del cuerpo, al azar, afectando con mayor frecuencia los tercios medios de los pulmones, la transmisión se lleva a cabo cuando una persona inhala uno ó más bacilos contenidos en el núcleo de una gotita de saliva, que es el material infectante que un tuberculoso bacilífero nebuliza a su alrededor al toser, hablar, reír, gritar, cantar o estornudar, siendo la tos la que genera mayor cantidad. Al contacto con el aire estas gotitas se evaporan dejando núcleos tan pequeños que se dispersan fácilmente con cualquier corriente de aire, conteniendo unas pocas bacterias que pueden ser inhaladas simultánea o sucesivamente. ^{6, 17-20}

El tamaño de partícula suficiente para alcanzar el espacio alveolar contiene no más de 3 bacilos. El número exacto para que se establezca la infección depende de la virulencia del bacilo y de la resistencia genética del individuo, aunque es probable que sean más de 10 partículas. Una vez deglutidos por los macrófagos alveolares, los bacilos comienzan a multiplicarse libremente y acaban destruyendo las células fagocitarias. De esta manera se produce un ciclo posterior de fagocitosis por los macrófagos (monocitos) inmaduros de la sangre, dentro de los

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

cuales crecen en forma logarítmica. Se forma un tubérculo o granuloma con un centro caseoso (semejante al queso) sólido en el cual el bacilo se puede multiplicar, aunque muy lentamente. Estas lesiones están compuestas principalmente de macrófagos activados en respuesta a los antígenos micobacterianos; dichos macrófagos producen citocinas como el TNF- α (factor de necrosis tumoral α), el MDGF (factor de crecimiento derivado de macrófagos), el TGF- β (factor de crecimiento transformante β) y la IL-1, las cuales inducen la proliferación de fibroblastos y la producción de colágeno y juegan un papel importante en la producción de tejido cicatrizante ^{2, 6, 17-21}

La respuesta histológica a la infección se caracteriza por una inflamación granulomatosa. Al cabo de algunas semanas y antes de la respuesta inmune eficaz, se observa un predominio de macrófagos, algunos de los cuales forman células multinucleadas o células de Langhans. Cuando la inmunidad celular es débil para detener el crecimiento celular, se produce la licuefacción del *caseum* (*caseum*; materia con aspecto de queso que resulta de la muerte fisiológica de los tejidos, licuefacción; transformación de un sólido en líquido) que es seguida frecuentemente por la formación de cavidad. En el *caseum* licuado, los bacilos se multiplican extracelularmente por primera vez en grandes cantidades y entran al árbol bronquial distribuyéndose a otras partes del pulmón y al exterior del mismo. Por vía linfohematológica, los bacilos pueden migrar a iniciar focos infecciosos extrapulmonares, invadiendo así otros órganos. ^{7, 11, 21}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ETIOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS

Características microbiológicas

La tuberculosis es causada generalmente por *M. tuberculosis*, bacteria intracelular miembro de la familia Mycobacteriae.⁶



Figura 6. Bacilos de *M. tuberculosis*.⁶⁷

Mide 1-4 μm de longitud y 0.2-0.6 μm de diámetro; absorbe el colorante carbolfucsina cuando es calentado y una vez teñido resiste a la decoloración por ácidos y alcoholes, de ahí la denominación común de bacilo ácido alcohol resistente (BAAR).^{4-7, 22}



Figura 7. Aspecto de *M. tuberculosis* por tinción de Ziehl Neelsen (cortesía Q.F.B. Sílvia González)

Propiedades biológicas

Entre las propiedades de *M. tuberculosis* están: 2, 4, 5, 15

- ✓ Es un parásito estricto, por lo cual su transmisión generalmente es directa, de persona a persona.
- ✓ No tiene toxinas conocidas, así puede persistir en bacteriostasis por largos periodos en el interior de las células.
- ✓ Es aerobio estricto, determinado por tener una capacidad de metabolización y de crecimiento muy diferentes según la tensión parcial de oxígeno del órgano o lesión que invade.
- ✓ Es de multiplicación lenta, con un tiempo de división \geq a 12 horas, factor condicionante de su tendencia a la cronicidad.
- ✓ Las cepas tienen una virulencia variable, explicándose así algunas de sus características epidemiológicas.
- ✓ Tiene numerosos antígenos, capaces de despertar gran variedad de respuestas inmunológicas en el hospedero, algunas de las cuales determinan el característico daño tisular producido.
- ✓ El bacilo tuberculoso puede sobrevivir en un ambiente seco por largo tiempo y muere rápidamente cuando es expuesto a la luz solar directa o a rayos ultravioleta, así como a ebullición por un minuto y por pasteurización a 60° C durante 20 minutos.

Mecanismos de protección contra las defensas orgánicas del hospedero ¹⁸.

20, 23-25

- a) Produce enzimas detoxificantes de intermediarios reactivos de oxígeno (ROI).
- b) El NH_4^+ está involucrado en la neutralización del pH endosomal ácido, en el bloqueo de la producción del ROI y en la inhibición de movimientos del lisosoma y la fusión con fagosomas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- c) La lipoarabinomanana interfiere con la preparación/activación de los macrófagos y los sulfolípidos inhiben la fusión del lisosoma-fagosoma e interfieren con la producción de ROI.

Composición química

Las micobacterias tienen la pared más compleja de todas las bacterias conocidas con un esqueleto de peptidoglucano y moléculas de arabinogalactanomicolato unidas por enlaces covalentes y cubiertas por lípidos libres y polipéptidos. Estos lípidos contienen ceras, micósidos específicos de especie (glucolípidos complejos y peptidoglucolípidos) y el factor de cordón (6, 6"-dimicolato de trehalosa) que se asocia al alineamiento en paralelo de las filas de bacilos (formación de cordones), que es una de las características de las cepas virulentas y además se ha encontrado ser el responsable de la inhibición de la migración de células polimorfonucleares (PMN) al sitio de colonización, e induce la formación de granulomas.²⁶⁻³⁰

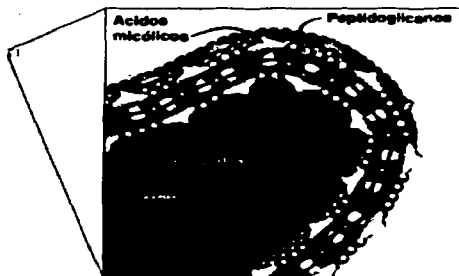


Figura 8. Disposición típica de las colonias de *M. tuberculosis*, vistas al microscopio y estructura general de la micobacteria (<http://www.novartis.es/docpdf/Tuberculosis.pdf>)

El esqueleto del péptidoglicano es relativamente uniforme en todas las especies micobacterianas y representa el elemento fundamental de la pared celular, los puentes intrapeptídicos de las cadenas de péptidoglicano confieren una rigidez al esqueleto estructural. Los ácidos micólicos están unidos a estas cadenas por enlaces covalentes con la D-arabinosa y D-galactosa, estos ácidos son los principales de la pared celular micobacteriana.^{28, 29,30}

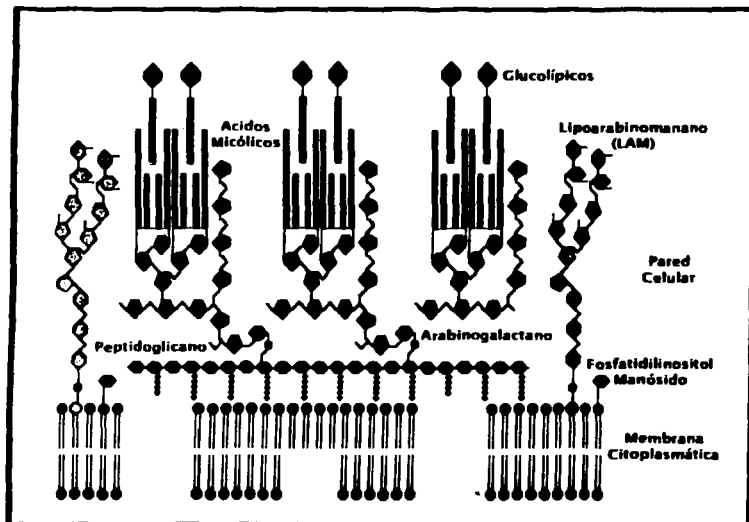


Figura 9. Pared celular micobacteriana ⁶⁷

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

a) Proteínas

El bacilo tuberculoso es un verdadero mosaico de antígenos constituidos por múltiples determinantes antigénicos. La mayoría de ellos parecen estar en la pared celular, pero algunos derivan de proteínas citoplasmáticas y algunos son secretados in vivo. Presenta antígenos pertenecientes a la familia de proteínas de choque térmico, antígenos con actividades enzimáticas y una proteína participante en el metabolismo de fosfatos de la micobacteria. Por otra parte, con base en sus propiedades bioquímicas se han encontrado antígenos con capacidad de unirse a fibronectina y proteínas con residuos de carbohidratos de pesos de 50-55 y 38 kDa (Gp50-55 y Gp38) con capacidad de unirse a concanavalina A.^{31-36.}

La glicoproteína de 38 kDa ha sido la más estudiada, es una proteína específica de especie y se ha demostrado su presencia únicamente en el complejo *M. tuberculosis*. La Gp 38 se ha considerado como antígeno inmunodominante, un alto porcentaje de los enfermos tuberculosos tienen anticuerpos contra ella y no así los controles sanos. La secuencia de este antígeno es homóloga con el gen PhoS de *E. coli*. La protección contra *M. tuberculosis* está asociada definitivamente con antígenos proteicos constituyentes de la bacteria. Desafortunadamente no se ha podido definir aún los más importantes como protectores. Se ha caracterizado bien la de 30 kDa como una proteína antigénica principal de *M. tuberculosis* la cual puede ser preparada con suficiente pureza para su uso en serodiagnóstico por simples medios fisicoquímicos (precipitación con sulfato de amonio al 50% y cromatografía de intercambio iónico).^{33-36.}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

b) Moléculas compuestas

Se han estudiado muchos de ellos, como por ejemplo, la lipoarabinomanana (LAM), los glicolípidos DAT (diacil trehalosa) y el PGLTb (glicolípidos fenólicos de *M. tuberculosis*) como antígenos útiles en serodiagnóstico y activaciones celulares *in vitro*.³⁷⁻⁴²

La molécula no proteínica inmunodominante en las respuestas humorales es el disacárido arabinogalactana, rápidamente provoca producción de anticuerpos en animales experimentales inmunizados, pero induce poca o nula respuesta inmune celular, y otro complejo antigénicamente importante de la pared celular está constituido por la LAM, un carbohidrato que provoca respuesta importante de anticuerpos en la mayoría de pacientes con tuberculosis activa, pero no produce reacciones de hipersensibilidad retardada. La LAM inhibe la producción de IFN- γ y puede servir como un depósito de radicales libres de oxígeno, inhibiendo de esta manera un mecanismo importante para la destrucción de patógenos intracelulares. Sin embargo, tanto la arabinogalactana como la LAM son moléculas comunes a todas las micobacterias, nocardias y corinebacterias.³⁷⁻⁴²

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

c) Lípidos

La distribución característica de los lípidos micobacterianos es reflejo de su abundancia llegando a constituir hasta el 60% de la pared celular y hasta el 40% del peso seco de la bacteria, su clasificación esta basada en sus características químicas. El interés por los lípidos micobacterianos radica no solamente en sus características químicas sino también en su posible participación en la relación huésped-parásito. ^{26, 32, 39, 41-44}

Tabla 1. Lípidos micobacterianos agrupados por familias y características propias.²⁶

FAMILIA	ELEMENTOS	CARACTERÍSTICAS
Ácidos grasos metilramificados	a) Micocerósico b) Ftienoico c) Ftioceránico d) Hidroxiptioceránico	Presentan 1 o más metilramificaciones, forman parte de lípidos más complejos aunque se pueden encontrar aislados.
Ácidos micólicos	a) Alfa b) Alfa' c) Metoximicólico d) Cetoximicólico e) Epoximicólico f) Dicarboximicólico	Son β hidroxiacidos substituidos en su posición α con una cadena alifática de ente 20 y 30 átomos de carbono. Son los más abundantes y sirven de anclaje al resto de los lípidos a la pared celular, se encuentran solos o formando parte de lípidos más complejos. No son exclusivos del género, son miembros de <i>Corynebacterium</i> , <i>Nocardia</i> y <i>Rhodococcus</i>

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FAMILIA**ELEMENTOS****CARACTERÍSTICAS**

Glicolipidos	<p>a) Factor cuerda (6, 6'-dimicoil-α-α'-D-trehalosa, los ácidos micólicos pueden ser iguales o no)</p> <p>b) Sulfátido (presencia de un grupo sulfato unido directamente al hidroxilo 2 de la trehalosa)</p>	Presentan un máximo de 2 residuos de carbohidrato y más de un ácido graso que esterifica a los hidroxilos del disacárido.
Glicósidos del fenol- phtiocerol	Anteriormente micósidos tipo A, B, G.	En la cepa Canetti de <i>M. tuberculosis</i> , el nombre trivial es PGL-Tb1
Peptidoglicolipidos	Anteriormente micósidos tipo C	Contienen aminoácidos en su estructura.
Lipooligosacáridos	Lípidos conteniendo trehalosa (en todos ellos esta acilada y unida al oligosacárido, como xilosas, metil-ramnosas)	Sus propiedades inmunogénicas son conferidas por la presencia de los azúcares en su estructura.
Lipopolisacáridos	<p>a) Lipomanana</p> <p>b) Lipoarabinomanana (porción glicosídica compuesta por arabinosa y manosa, porción lípida constituida de glicerol, poliol fosfato y ácidos grasos como lactato, succinato, tuberculoestearato)</p> <p>c) Micolil-arabinogalactana (Cera D)</p>	La cantidad relativa del carbohidrato es muy alta con respecto al lípido, siendo solubles en agua. La lipoarabinomanana es altamente antigénica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dentro de los lípidos micobacterianos al factor cuerda se le ha descrito toxicidad, junto con la infección tuberculosa estimula la NADasa, provocando depresión en los niveles de NAD especialmente en hígado y bazo, encontrándose además alteraciones en la síntesis del glucógeno en músculo e hígado, se ha descrito el ataque físico directo a las membranas mitocondriales de hígado, de bazo y de pulmón, tanto *in vitro* como *in vivo* causado por la pérdida del control de cadena respiratoria y la destrucción de la fosforilación oxidativa.^{26, 32, 39, 41-44}

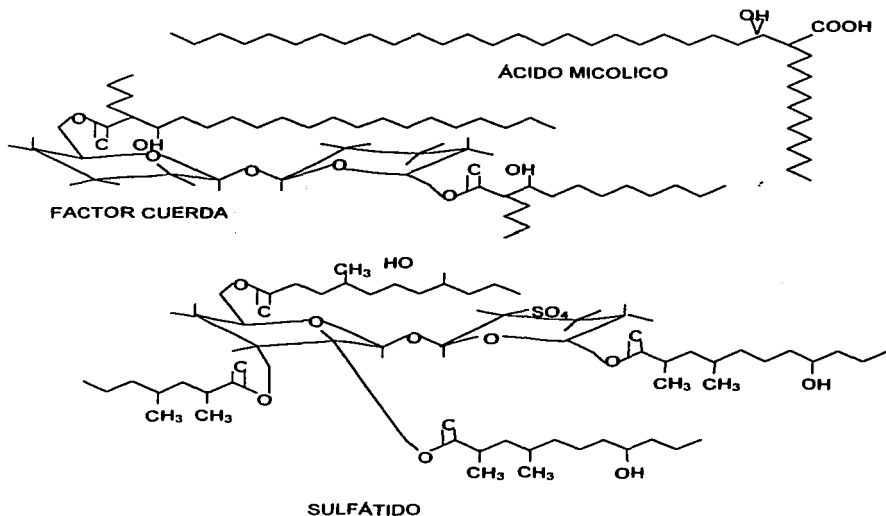


Figura 10. Estructura de algunos lípidos de importancia en micobacterias.²⁶

Tabla 2. Lípidos presentes en diferentes especies de *Mycobacterium*

	<i>M. bovis</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. leprae</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. lepraemurium</i>
Ácidos micólicos	+	+	+	+	+	+	+
Factor cuerda	+	+	+	+	+	+	+
Sulfátido	-	+	+	+	H37 Rv	+	+
Glicolípido fenólico	+	+	+	+	Canetti	-	+
Peptoglicolípidos	-	+	-	-	-	-	-
Lipooligosacáridos	+	+	+	-	+	+	+
Lipoarabinomanana	+	+	+	+	+	+	+

+ presente - ausente * no estudiado

EFFECTOS DE LOS LÍPIDOS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE DEL HUÉSPED

Las alteraciones en el huésped conocidas son provocadas por los lípidos aislados y no con bacterias integrales, en general la respuesta inmune se agrupa en efectos potenciadores o activadores y en efectos supresores. 26, 32, 39, 41- 44

Efectos potenciadores

Las infecciones micobacterianas producen granulomas activos que son el ejemplo más evidente de la respuesta inmune de hipersensibilidad tipo IV, algunos autores consideran capaces al factor cuerda y a la cera D de inducir el desarrollo de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

granulomas similares aunque otros afirman que es una respuesta de tipo cuerpo extraño. Al factor cuerda se le confiere la propiedad de activar a macrófagos elevando los niveles de enzimas lisosomales como la fosfatasa ácida, fagocitando así cantidades mayores de la bacteria, además es capaz de inhibir el crecimiento de líneas celulares y se considera un potente quimiotáctico de macrófagos e inducir su transformación a células epiteliales. Como consecuencia de la activación de los macrófagos sobresale la capacidad adyuvante hacia respuestas específicas (los ratones inmunizados con el factor cuerda pueden resistir el reto con *M. tuberculosis*) y no específicas (incrementan su respuesta hacia glóbulos rojos de carnero, *Salmonella typhi* y *Salmonella typhimurium*).⁴⁵⁻⁴⁷

Dentro de la respuesta inmune efectora, los macrófagos son las células que más alteraciones presentan por la acción de los lípidos micobacterianos en donde encontramos mecanismos de evasión, inhibición y desactivación.^{30, 32,38, 42}

Evasión: desde que se describió la presencia de la zona transparente a los electrones alrededor de las micobacterias, se postuló como un mecanismo de evasión y por lo tanto de protección.^{48,49}

Inhibición: *M. tuberculosis* inhibe la fusión fagolisosoma en los macrófagos, esta propiedad es atribuible a la presencia del sulfátido en la bacteria, representando también otro mecanismo de evasión ya que evita el contacto directo de las enzimas lisosomales y de los metabolitos reactivos de oxígeno.^{25, 50}

Desactivación: se confiere por la propiedad de abatir la fuerte reactividad química de compuestos derivados del oxígeno que son generados durante estallido respiratorio de los fagocitos. Uno de los compuestos más estudiados es el glicolípido fenólico que es capaz de reaccionar con los metabolitos del oxígeno, el sulfátido ejerce su actividad a nivel de la activación del macrófago y bloquea la culminación del estallido respiratorio.^{32,39,}

Efectos supresores

Los lípidos micobacterianos aislados y purificados que tienden a suprimir los mecanismos de protección del huésped son entre otros:

- el glicolípido fenólico que tiene propiedades tanto estimuladoras como supresoras,
- la lipoarabinomanana que se señala como inhibidora potente de la respuesta proliferativa de células humanas, además altera la participación de factores solubles como el interferón.
- Los fosfolípidos micobacterianos como el fosfatidilinositol y la fosfatidiletanolamina, son capaces de estimular la proliferación de las células supresoras y así disminuir la respuesta mitogénica de células humanas de sangre periférica.^{30, 32, 38, 42}

RESPUESTA INMUNOLÓGICA CONTRA *Mycobacterium tuberculosis*

La respuesta inmunológica frente a la infección con bacilos tuberculosos es muy variable, dependiendo principalmente de las características genéticas del individuo (se ha asociado a HLA-DR2 con mayor riesgo de progresión de infección pulmonar avanzada, y en México se ha asociado un efecto de protección por un gen ligado a HLA-DR11), de su edad, de su estado nutricional, y del ambiente epidemiológico que lo rodea.^{6, 9, 27, 51}

El pulmón sirve como la principal vía de entrada para *M. tuberculosis*, invade al hospedero si se inhala en microgotas ya que las gotas grandes son removidas por mecanismos bronquiales no específicos, la adhesión a los tejidos es fácil por las condiciones estériles en el interior del pulmón por lo que los bacilos son engullidos por los macrófagos alveolares y son destruidos por medio de mecanismos potentes como la síntesis de enzimas proteolíticas y radicales tóxicos de oxígeno como el H₂O₂, pero si estos macrófagos fallan, muchos macrófagos de sangre (monocitos) entran al sitio, probablemente debido a factores quimiotácticos del

bacilo [(C5a del complemento y la quimiocina MCP-1 (Proteína Quimiotáctica de Monocitos-1)]. Estos nuevos macrófagos inmaduros rápidamente ingieren al bacilo liberado y se establece una simbiosis en la cual no hay daño mutuo, por lo que los macrófagos aún no han sido activados. Aquí pueden entrar en acción las células NK, las cuales al ser activadas por la IL-12 producida por macrófagos, pueden lisar directamente células infectadas o producir IFN- γ activador de macrófagos en forma inespecífica.^{9, 10, 14, 15}

Con el tiempo se acumulan más macrófagos y más bacilos en la lesión. Esto se da entre los días 7 y 21 después de la infección, el bacilo no estimula el mecanismo microbicida. Cuando el crecimiento logarítmico dentro de los macrófagos se detiene (2 a 3 semanas después de la inhalación del bacilo), el hospedero posee inmunidad celular y se desarrolla hipersensibilidad de tipo retardado (DTH).¹⁵

RESPUESTA INMUNE CELULAR

CD1

Hace relativamente poco tiempo se estableció la existencia de una nueva familia de "moléculas presentadoras de antígeno" denominadas CD1. Existen 5 isoformas a, b, c, d y e, son codificadas por genes localizados en el cromosoma 1 en el humano, son estructuralmente similares a las moléculas MHC de clase I y como ellas, se presentan asociadas a β 2-microglobulina. Las moléculas CD1 se expresan de manera abundante por las células presentadoras de antígeno y más en células dendríticas. La característica principal de las moléculas CD1 es su alta afinidad por epítopos de naturaleza lipídica, aunque también se pueden asociar a epítopos peptídicos. El acoplamiento entre las moléculas CD1 y los epítopos lipídicos ocurre en el citoplasma de las células presentadoras de antígeno y los complejos CD1- lipido son llevados a la superficie de las células así como son llevados los complejos antigénicos donde participan las moléculas MHC de clase I. Las células T que reconocen a los antígenos asociados a CD1b son linfocitos T-CD4+ y T-CD8+, estas células al activarse adquieren, entre otras cualidades, la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

capacidad de destruir macrófagos infectados con microorganismos y parásitos intracelulares. Se ha descrito un nuevo mecanismo de escape de *M. tuberculosis* que involucra la regulación negativa de la molécula presentadora de antígeno CD1 en la superficie celular de las células presentadoras de antígeno, y esta pérdida de CD1 está asociada con una completa inhibición de la capacidad de las células infectadas para la presentación de antígenos lipídicos y glicolípidos de *M. tuberculosis* a las células T en el contexto de CD1. Para ser este mecanismo efectivo se requiere la infección de las células con micobacterias vivas, las cuales parecen disminuir los niveles de RNA mensajero para CD1 y de esta manera lograr la regulación y su persistencia intracelular. ^{52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59}

Receptores Toll-like (TLR) en inmunidad innata para tuberculosis

El reciente descubrimiento de la familia de proteínas TLR ha dado un nuevo enlace entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa, los efectos antimicrobianos de esta familia se estudiaron primero en *Drosophila*, ahora se sabe que se encuentran en todos los organismos vivos. En el humano su estructura es rica en leucina, su dominio extracelular y citoplasmático es homólogo para el receptor IL-1, jugando un papel importante, en la respuesta del hospedero contra la infección. Sólo a los receptores TLR2, TLR4 y TLR9 se le conoce quien se les une. Al TLR 9 se le unen fragmentos de DNA, al TLR4 se sabe que es un receptor para lípidos y ácidos lipoproteicos, mientras que la TLR2 regula la respuesta para lipoproteínas de micobacterias. Se ha demostrado *in vitro* la inducción de IL-12 que genera la respuesta de citocinas de Th1 y NOS₂ (óxido nítrico sintetasa) esto es importante para la producción de óxido nítrico por los macrófagos ya que representa el poder antimicrobiano para la lipoproteína de 19-kDa y la lipoarabinomanana de *M. tuberculosis*. ^{20, 23}

Una vez que el bacilo ha penetrado al organismo, generalmente por inhalación, evade los mecanismos de defensa inespecíficos implantándose en un sitio primario en donde se multiplican sin resistencia aparente del hospedero;

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

posteriormente son fagocitados por los macrófagos y destruidos (por activación de citocinas de linfocitos T cooperadores, principalmente interferón- γ), o bien pueden permanecer viables y seguir multiplicándose, de modo que al llegar el macrófago al ganglio linfático, se disemina el bacilo por vía linfática y sanguínea a cualquier otro órgano, en donde puede ser destruido (junto con las células infectadas mediante linfocitos T citotóxicos (CD8+) o persistir en forma latente durante años dentro de los monocitos, con proliferación bacilar y gran reclutamiento de macrófagos en el sitio de la lesión.^{20, 23}

Los linfocitos T CD4+ Th1, son activados por células NK, que a su vez se activan con la micobacteria, las células NK producen IFN- γ 12, y los macrófagos IL-12 y juntos favorecen la diferenciación y predominio de la subpoblación Th1, que producen básicamente IFN- γ , IL-2 y TNF- β en cuanto a las células Th2 producen principalmente IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, de modo que inducen una respuesta mediada por anticuerpos, así las células Th1 producen IFN- γ junto con los linfocitos T CD8+, activando potentemente a los macrófagos aumentando la eficiencia de destrucción de los bacilos alojados en su interior, gracias al incremento en los mecanismos intracelulares mediados por los radicales reactivos de oxígeno y óxido nítrico. Otros cambios en el macrófago, amplifican ésta respuesta inmune, como el incremento en la expresión de moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y el incremento en el número de receptores para TNF- α , de modo que hay presentación antigénica a mayor número de linfocitos T cooperadores y una mejor respuesta a TNF- α . No obstante esta activación constante consume mucha energía y produce daños a los tejidos, probablemente por liberación de radicales de oxígeno, óxido nítrico y proteasas, dañando a las células del hospedero.^{14, 17, 20, 56, 58, 60}

Por otra parte los linfocitos T con cadenas $\gamma\delta$ (5% del total de la población linfocitaria) reconocen proteínas de choque térmico y antígeno de micobacterias, los linfocitos T con cadena $\alpha\beta$ constituyen el 95% de los linfocitos T y están ampliamente distribuidos en el organismo, existe un tipo de linfocitos T $\alpha\beta$ CD4-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CD8- y se ha observado que se encuentran principalmente en individuos PPD positivos, muestran proliferación con ácido micótico, de modo siendo capaz de lisar a células que presenten el compuesto CD1b y representan por tanto protección adicional ante la micobacterias.^{14, 17, 20, 56, 58, 60}

HIPERSENSIBILIDAD DE TIPO TARDÍO

El hospedero usa la hipersensibilidad de tipo tardío (DTH) para causar necrosis caseosa como respuesta al exceso de antígeno local, por destrucción de macrófagos no activados en los cuales el bacilo está creciendo, el hospedero elimina el ambiente intracelular que es favorable para tal crecimiento, aunque esto implica la destrucción local del tejido.^{15, 17, 60}

Cuando la proliferación de las bacterias llega a un punto crítico, se reinicia una respuesta con gran actividad de macrófagos, productores de IL-12, que a su vez activa a subpoblaciones de linfocitos CD4 Th1, liberan IFN- γ , TNF- β , IL-3 y factor estimulante de monocitos y macrófagos (GM-CSF), incrementando los mecanismos de muerte intracelular. Pero si la respuesta no es eficaz, existe un estímulo antigénico persistente y esas citocinas promueven la diferenciación de los macrófagos a células epiteloideas (que liberan gran cantidad de TNF- α), algunas de las cuales se fusionarán, dando lugar a las células gigantes multinucleadas y a la formación del granuloma; además se incrementan los macrófagos por acción del GM-CSF e IL-3 (pues tiene efecto hematopoyético en la médula ósea). Si bien los granulomas encapsulan a las bacterias, también las aíslan del sistema inmune y previene el daño al tejido por parte de los macrófagos que al quedar en el centro del granuloma mueren dando lugar a la necrosis.^{15, 17, 60}

La necrosis caseosa es entonces una reacción DTH producida por células T, especialmente citotóxicas (CD8). Además de otros factores involucrados como enzimas hidrolíticas, citocinas (TNF- α , etc.) intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno proveniente de macrófagos y probablemente de otras células, quizá aún

complejos antígeno-anticuerpo, complemento y productos tóxicos liberados de bacilos muertos. La licuefacción del *caseum* y su eliminación al exterior, explica las siembras broncogénas o intracaniculares de la tuberculosis a otras partes de los pulmones, y explica también, el contagio de la enfermedad a través de la expectoración. ^{15, 17, 60}

RESPUESTA INMUNOLÓGICA HUMORAL

Importancia de la presencia de anticuerpos

La patogénesis de la tuberculosis está en su mayoría determinada por la respuesta celular aunque la respuesta humoral mediada por linfocitos B ocurre en pacientes con tuberculosis y no se ha demostrado su rol en la patogénesis, los niveles de IgG son el indicador usual de la enfermedad activa, siendo la infección primaria asintomática y la enfermedad pulmonar leve no induce una respuesta de anticuerpos significativa, durante el tratamiento los niveles de anticuerpos se elevan un poco en el primero o segundo mes disminuyendo después, aunque permanecen en niveles detectables por uno o varios años los pacientes con tuberculosis sanadas no tienen IgG detectada hacia antígenos micobacterianos. La respuesta de IgM está dirigida principalmente a antígenos polisacáridos no específicos, se desarrolla primero aunque no en altos títulos y su nivel no correlaciona bien con la presencia o ausencia de la enfermedad activa, por otro lado se han determinado a bajos niveles de IgA en el suero de pacientes con tuberculosis activa, pero no en sujetos control, sin embargo las IgA contra antígenos micobacterianos no se han estudiado adecuadamente en secreciones externas por lo que no se puede excluir un papel importante en la protección de mucosas. ^{62, 63}

Métodos serológicos como diagnóstico

La historia de las pruebas serológicas para la tuberculosis hasta 1972 describe la aplicación de numerosas técnicas sin el conocimiento de la reactividad cruzada de los antígenos micobacterianos. En consecuencia, estas pruebas resultaron altamente variables y sólo mostraron alta sensibilidad si era correspondida por una pobre especificidad. Entre estas pruebas están: fijación del complemento, hemaglutinación, radioinmunoensayo (en esta última técnica, uno de los mayores avances fue la demostración de anticuerpos contra *M. tuberculosis* en suero de sujetos sin exposición al bacilo) y ELISA (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas).^{2, 22}

La técnica de ELISA usando antígeno en fase sólida, es el ensayo serológico más empleado. Se han desarrollado ensayos utilizando extractos crudos, extractos proteínicos y derivados de constituyentes de *M. tuberculosis* como glicolípidos, polisacáridos y antígenos purificados como el antígeno de 38 kDa, con el cual se ha logrado una especificidad cercana al 80 % en casos de tuberculosis pulmonar con baciloscopia positiva. Se han desarrollado ensayos empleando extractos solubles de *M. bovis* BCG cepa 1331, lográndose una sensibilidad de 91.5 % y una especificidad de 92.5%.^{6, 11}

El diagnóstico de tuberculosis meníngea se ha estudiado por la medición de IgG e IgM anti-PPD en LCR, con una sensibilidad y especificidad superiores al 90% y de igual manera se ha utilizado un ELISA indirecto amplificado para detectar IgG en LCR empleando un extracto soluble de *M. tuberculosis* con sensibilidad del 95 % y especificidad cercana al 100%. También se ha demostrado respuesta inmunodominante de IgG contra LAM (lipoarabinomanana) y contra la proteína de 14 kDa.^{6, 61}

Actualmente, con la técnica **ELISA** se obtiene una sensibilidad cercana al 90 % y una especificidad próxima al 100% en enfermos bacilíferos con alta carga antigénica, pero no así para tuberculosis paucibacilares y extrapulmonares.²

LIPOSOMAS

Los liposomas son micelas formadas por lípidos que en su interior pueden contener agua. El interés de los liposomas radica en su membrana que puede estar compuesta de fosfolípidos (como la fosfatidilcolina) y cuya estructura, composición y proporción es prácticamente igual a la membrana de las células del hospedero. Los fosfolípidos tienen una cola hidrofóbica y una cabeza hidrofílica que, al disolverse en agua, se autoorganizan de la siguiente manera: las colas hidrofóbicas se atraen entre sí y las cabezas hidrofílicas contactan con el exterior e interior acuoso. De este modo se forman las vesículas, similares a las células corporales y a sus organelos. Una de las características más importantes de los liposomas es que son fagocitados con eficiencia por macrófagos, lo que los convierte en fantásticos adyuvantes para muchos antígenos purificados.^{64, 65}

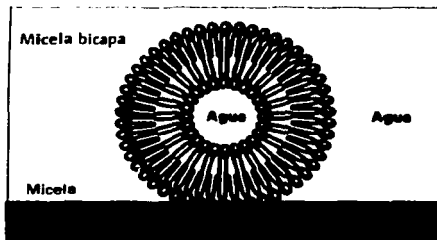


Figura 11. Arreglo típico de un liposoma.⁶²

Los liposomas se describieron por primera vez por Bangham en 1965, su tamaño varía de 25 nm a 5 μm de diámetro y se clasifican en vesículas unilamelares y multilamelares, estas últimas miden de 1 a 5 μm , las vesículas unilamelares se dividen en pequeñas de 25 a 50 nm, y en grandes de 150 a 900 nm, estas se han empleado en el estudio de los diferentes arreglos moleculares en que los lípidos se pueden asociar; debido a que en estas es posible reproducir los arreglos moleculares que los lípidos pueden tener en las membranas celulares además de controlar su composición lipídica, e inducir cambios de las asociaciones moleculares lipídicas.

Los lípidos que pueden conformar a los liposomas pueden ser de forma de cono invertido como los lisofosfolípidos, los gangliósidos y los monoglucosildiacilglicéridos se asocian en micelas; en tanto que los lípidos de forma cónica como la fosfatidiletanolamina, la cardiolipina y el fosfatidato en presencia de cationes divalentes como el Ca^{2+} y el Mn^{2+} , dan el arreglo tubular de fase hexagonal H_{II} (Figura 12).^{64, 65}

ESTRUCTURA QUÍMICA



A) Fosfatidilcolina



U) Fosfatidiletanolamina



G) Gangliósido

FORMA MOLECULAR



B) Cilíndrica

$$\frac{A_1}{A_2} = 1$$



E) Cónica

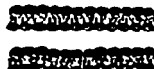
$$\frac{A_1}{A_2} < 1$$



H) Cono invertido

$$\frac{A_1}{A_2} > 1$$

ASOCIACIÓN MOLECULAR



C) Bicapa o fase lamelar



F) Fase Hexagonal II



I) Fase Micelar

Figura 12. Clasificación de los lípidos con base en su forma molecular dinámica. La forma molecular (B, E, H) depende de la estructura química del lípido (A, D, G) y determina su asociación molecular en un medio acuoso (C, F, I).⁶²

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ELISA LIPOSOMAL

Se ha desarrollado un método que se basa en la unión de liposomas a placas de ELISA y la reacción inmune se pone de manifiesto con un segundo anticuerpo conjugado a la enzima peroxidasa por el desarrollo de color que produce esta enzima en su substrato específico y como **carecen de proteínas**, los anticuerpos que se detectan sólo van dirigidos a los lípidos. ^{62, 64, 65}

a) Aplicación del ELISA LIPOSOMAL

Los lípidos en general son moléculas poco inmunogénicas comparadas con las proteínas, los carbohidratos y los ácidos nucleicos. Sin embargo, en una serie de enfermedades humanas se ha descrito la presencia de anticuerpos antilípidos que origina al Síndrome anti-fosfolípido (Hughes et al., 1986; Alarcón-Segovia, 1991). Estudios de difracción de rayos X han mostrado que los lípidos membranales tienen una geometría molecular característica (cilíndrica, cónica y de cono invertido), los lípidos cilíndricos como la fosfatidilcolina se asocian en el medio acuoso en bicapas cerradas o liposomas, estas vesículas se han empleado ampliamente en el estudio de los diferentes arreglos moleculares en que los lípidos se pueden asociar, para el desarrollo de diversos tratamientos con antitumorales de terapia génica y como vehículo de antígenos. ^{64, 65}

DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS

ESTUDIO MICROSCÓPICO

El hallazgo de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) en extensiones teñidas por tinción de Ziehl Neelsen y examinadas al microscopio es la primera evidencia de la presencia de micobacterias en una muestra clínica, con lo cual se observan bastoncillos ligeramente curvados, rojos sobre fondo azul. Es el procedimiento más fácil y rápido que se puede efectuar y que aporta al clínico una orientación preliminar del diagnóstico. La visualización de BAAR en esputo no es afirmativa de *M. tuberculosis* porque otras micobacterias pueden también causar enfermedad pulmonar sin embargo en conjunción con la clínica y hallazgos radiológicos puede utilizarse para un diagnóstico presuntivo.^{1, 2, 5}



(a)



(b)

Figura 13. (a) Tinción de Ziehl Neelsen, (b) tinción de fluorescencia.⁴

La no observación de BAAR en una muestra clínica no descarta el diagnóstico de tuberculosis, ya que es una técnica de sensibilidad limitada, se ha demostrado que son necesarios de 5,000 a 10,000 bacilos por mL de esputo para el reconocimiento en la microscopía directa. La interpretación de baciloscopía de sangre y médula ósea por la gran cantidad de material celular presente es difícil.^{1,}

2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La sensibilidad de la baciloscopía depende, en gran parte, de una buena preparación de la tinción y de la lectura, se han documentado sensibilidades desde un 20 a un 80%, dependiendo de donde se haya hecho el estudio y del tipo de muestras estudiadas. ^{1,2,4}

CULTIVO

El diagnóstico definitivo se establece con el aislamiento del bacilo a partir de expectoración, lavado gástrico, líquido pleural, LCR, orina y en tejido de biopsia. Los cultivos son mucho más sensibles que los exámenes microscópicos, pudiendo detectar una cantidad tan pequeña como de 10 bacterias por mL de muestra clínica digerida y concentrada, además de obtener aislamientos en cultivo puro necesarios normalmente para poder identificar las especies de las cepas aisladas, el cultivo permite la confirmación de un diagnóstico. ^{1,2,3,4}

El método tradicional de cultivo incluye la inoculación de varios medios sólidos o líquidos con y sin antibióticos. Un medio con base de huevo como el Lowenstein Jensen es el más conocido. También los medios sin base de huevo como el Middlebrook 7H10 y 7H11. ^{1,2} Se incuban durante 3 o más semanas, las colonias aparecen rugosas, no pigmentadas, formando cordones. ^{4,66}

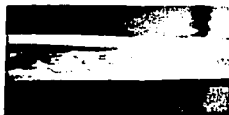


Figura 14. Cultivo en medio de Lowenstein-Jensen

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La identificación de especies incluye determinación de temperatura de crecimiento, acumulación de niacina y reducción de nitratos, actividad de catalasa a un pH de 7 y 68° C de temperatura y actividad de arilsulfatasa. ²⁻⁴

Los medios líquidos suponen un mejor crecimiento, para esto existen métodos líquidos de lectura manual como el sistema Septi-Chek MB (*Becton Dickinson*) medio bifásico que ofrece la posibilidad de disponer de un crecimiento que puede utilizarse para practicar pruebas de identificación sin necesidad de realizar resiembras adicionales, los principales inconvenientes de éste son la lentitud en la detección del crecimiento con respecto al sistema BACTEC 460 TB, no permite realizar estudios de sensibilidad *in vitro* y falla con frecuencia el sistema de identificación presuntiva de tuberculosis que lleva incorporado en su fase sólida.

El medio líquido de lectura semiautomática se llama BACTEC 460TB, es el más ampliamente evaluado, utiliza el medio Middlebrok 7H12 y como sustrato ácido palmítico marcado con C₁₄. Durante el crecimiento bacteriano se produce ¹⁴CO₂, que es detectado por el sistema y lo traduce en índice de crecimiento. Este sistema utiliza reactivos radioactivos, es semiautomatizado y requiere de una amplia manipulación de los viales a lo largo de todo el periodo de incubación, su tiempo de detección es de 1 a 2 semanas, es utilizado para pruebas de sensibilidad. ^{1, 26}

PRUEBAS CUTÁNEAS

La tuberculina antigua es un filtrado concentrado del medio en el cual han crecido bacilos tuberculosos durante seis semanas. Además de las tuberculoproteínas reactivas, este material contiene varios otros constituyentes de los bacilos tuberculosos y del medio de crecimiento. El PPD es un *Derivado Proteico Purificado* del medio de cultivo en donde crece la micobacteria, se obtiene por fraccionamiento químico de la tuberculina antigua, se estandariza en términos de su reactividad biológica como unidades de tuberculina (UT). Por norma en México la dosis de administración es un décimo de mL equivalente a 2UT de PPD por vía

intradérmica en la cara anteroexterna del antebrazo izquierdo. Se debe realizar la lectura de la induración a las 72 horas, expresada siempre en milímetros del diámetro transverso. En la población general, la induración de 10 mm o más indica reactor al PPD. En el recién nacido, el desnutrido, personas infectadas por VIH y personas con inmunodepresión, se considera reactor al que presenta induración de 5 o más milímetros del diámetro trasverso, en niñas y niños menores de 5 años reactores a PPD, se requiere precisar el diagnóstico y de acuerdo con el resultado, decidir si se administra quimioprofilaxis o tratamiento.^{3,5}



Figura 15. Prueba de PPD

WESTERN BLOT

La técnica de inmunoelectrotransferencia (IET), descrita por Towbin (1979), es uno de los métodos inmunoenzimáticos más útiles en la actualidad para el diagnóstico de algunas infecciones activas así como para analizar una mezcla de antígenos o para demostrar variaciones individuales de la magnitud de las respuestas. Permite identificar antígenos inmunodominantes reconocidos por anticuerpos específicos provenientes del paciente. La IET combina el poder resolutivo de la electroforesis en geles de poliacrilamida, que separa moléculas de acuerdo a su peso molecular y carga, las cuales a su vez son electrotransferidas a papel de nitrocelulosa para posteriormente llevarse a cabo el reconocimiento antígeno-anticuerpo en la fase sólida. Esta inmunodetección se hace evidente por la adición de un segundo anticuerpo marcado con una enzima y la adición del sustrato correspondiente.

Mediante IET se han buscado moléculas inmunodominantes de bajo peso molecular a partir de un extracto soluble de *M. tuberculosis* H₃₇Rv que fueran reconocidas por sueros de pacientes tuberculosos y se encontró que la molécula de 4kDa (fracción 4MT) podía ser un antígeno importante para identificar la infección tuberculosa en casos de individuos con síntomas sugerentes a esta enfermedad, la sensibilidad y especificidad de esta técnica fueron de 72.4% y 72.3% respectivamente. ²

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

La PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) es una técnica rápida que logra la generación *in vitro* de millones de copias de un segmento de DNA específico. El uso de la PCR aplicado a tuberculosis ha reducido el tiempo para identificar las micobacterias clínicamente importantes desde varias semanas hasta un día. Los blancos están representados por el gen de la proteína de 38 kDa, la secuencia de inserción IS6110, repetida 10-16 veces en el cromosoma del complejo *M. tuberculosis*, el gen de la proteína de choque térmico (HSP) de 65 kDa y el RNA ribosomal (rRNA). Seguramente el uso de la biología molecular es la solución a futuro aunque aun requiere de avances en cuanto a su estandarización y aplicación diagnóstica. ^{2,67}

CROMATOGRAFÍA

La cromatografía es una técnica con la que se estudia la composición de lípidos de la pared celular de las micobacterias, existen tres tipos de cromatografía que se han aplicado a la identificación de las micobacterias, la cromatografía en capa fina, la cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), las dos últimas son las de mejores resultado además son rápidas (resultados en dos horas) y dan buenos resultados aunque su inconveniente es su elevado costo.^{1,5}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la cromatografía de gases, la identificación se basa en el perfil de ácidos grasos de las micobacterias, permitiendo la identificación de prácticamente todas las especies de micobacterias descritas en unas cuantas horas. Por su parte la HPLC se basa en el perfil de ácidos micólicos. Requiere muy poco inóculo y técnicamente es sencilla y rápida. ¹

INMUNOPROFILAXIS

La vacunación con BCG tiene por objeto proteger a los no infectados, especialmente porque la tuberculosis es endémica y presenta tasas significativas de morbilidad y mortalidad en nuestro país. Su función es reemplazar una infección natural con una cepa de *M. bovis* atenuado (bacilo de Calmette-Güerin o BCG), capaz de despertar las defensas del hospedero frente a nuevas infecciones. Es una vacuna viva, correspondiente a una cepa de *M. bovis* por Calmette y Güerin hace más de 65 años, subcultivada cada tres semanas durante 13 años con un total de 231 pases, hasta que perdió su virulencia. A partir de 1974 la vacunación con BCG fue incluida en el programa ampliado de vacunación de la OMS en la mayoría de los países. ^{6, 21, 22, 68, 69}

Actualmente la vacuna BCG ha sido desarrollada de múltiples subcepas cultivadas en diferentes laboratorios, es conservada por lotes y liofilizada. Se trata de una vacuna bastante frágil, fácilmente afectada por la luz y el calor (la exposición directa al sol es capaz de reducir el número de bacilos viables en un 50% en menos de 5 minutos). En la práctica presenta algunas complicaciones: ^{22, 68, 69}

Locales	Sistémicas
Ulceración local	Osteitis BCG
Adenopatías regionales	Diseminación de la vacuna-becegeitis (sólo en individuos con profundas alteraciones de la inmunidad celular)
Fistulizaciones crónicas	
Cicatrices queloides	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Su eficiencia en la prevención de la tuberculosis pulmonar ha mostrado variaciones considerables en diferentes poblaciones y experimentos, sin embargo ha mostrado una eficacia consistente (aprox. 80%) en la prevención de tuberculosis extrapulmonar (meningitis tuberculosa y tuberculosis miliar), en niños, la cual no dura mucho más allá de 15 años. Para explicar esto se ha propuesto diferencias en la potencia de las distintas cepas, en la dosis de BCG e interferencia en la respuesta inmunológica a la vacuna por contacto previo con otras micobacterias. ^{22, 68,69}

En México se produce la vacuna liofilizada de la subcepa Copenhague 1331, tiene la ventaja sobre la líquida de una mayor estabilidad, se puede mantener a 30° C durante casi un mes y a 4° C durante un año. Se recomienda vacunar a los recién nacidos para prevenir las formas graves de la enfermedad, las cuales tienden a ocurrir a esas edades. También revacunar a los niños cuando comienzan la escuela, porque es la edad en alcanzarse mayor cobertura. Las contraindicaciones son escasas: recién nacidos por debajo de 2 Kg de peso o con lesiones en la piel y a todas las edades, individuos con inmunodeficiencias evidentes, o en tratamiento con drogas inmunosupresoras, aunque la OMS todavía recomienda vacunar a los niños seropositivos a VIH, no presentando síntomas de enfermedad. ^{22, 68, 69,74}

TRATAMIENTO

El tratamiento eficaz exige el uso de al menos dos agentes antimicobacterianos para evitar la selección de gérmenes resistentes durante el tratamiento. Habitualmente, se emplea la combinación de isoniazida (mecanismo de acción Figura 18) y rifampicina o etambutol durante ocho meses. ^{2, 6,13}

En México el programa de acción para la prevención y control de tuberculosis dictamina que el tratamiento debe ser estrictamente supervisado por el personal de salud o personal debidamente capacitado, quien verificará la ingesta y deglución del medicamento como a continuación se describe: ³

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 3. Tratamiento para *M. tuberculosis*.

Fase intensiva:	Diario, de lunes a sábado, hasta completar 60 dosis. Administración en una toma	
Medicamentos	Separados (dosis)	Combinación fija clave 2414
Rifampicina	600 mg	4 grageas 150 mg
Isoniacida	300 mg	75 mg
Pirazinamida	1,500 mg a 2,000mg	400 mg
Etambutol(a)	1,200 mg	Clave 2405, 3 tabletas 400 mg
Fase de sostén	Intermitente, 3 veces por semana, lunes, miércoles y viernes, hasta completar 45 dosis. Administración en una toma.	
Medicamentos	Separados (dosis)	Combinación fija clave 2415
Isoniacida	800 mg	4 cápsulas 200 mg
Rifampicina	600 mg	150 mg

(a) Usar sólo en personas mayores de 8 años, puede ser reemplazado por estreptomicina.

El control del tratamiento se deber hacer mensual y consiste en:³

- Clínico: Evolución del padecimiento sobre todo en niños
- Bacteriológico: Para verificar evolución bacteriológica.
Favorable: negativa desde el tercer mes o antes, persistiendo así hasta terminar el tratamiento.
- Radiológico: En adultos como estudio complementario, en niños se debe realizar a inicio y al final para verificar la evolución de las lesiones.

Al término del tratamiento se debe clasificar al caso como.

- ✓ Curado: Sin signos ni síntomas de tuberculosis y estudio bacteriológico negativo en los últimos meses de tratamiento o cultivo negativo al final del tratamiento.
- ✓ Fracaso: Con baciloscopia y/o cultivo positivo al finalizar el tratamiento supervisado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- ✓ **Tratamiento terminado:** Al que ha sido completado el esquema de tratamiento, han desaparecido los signos clínicos y no se realizó baciloscoopia o cultivo al finalizar el tratamiento.

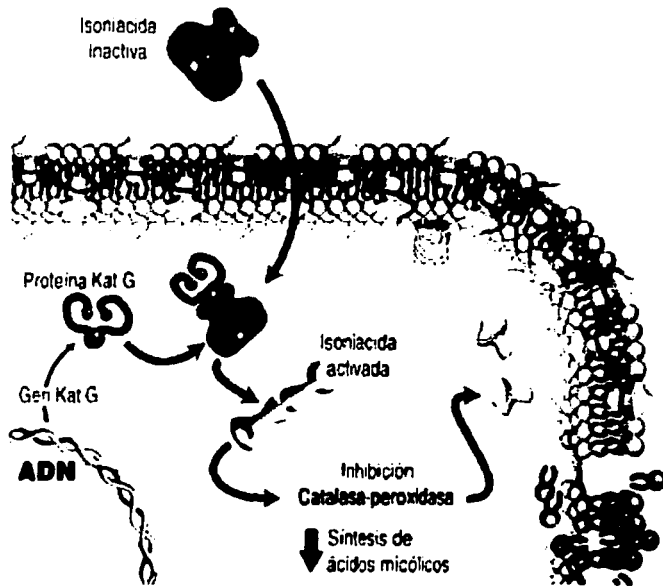


Figura 16. Mecanismo de acción de isoniacida. El medicamento inhibe la actividad del sistema enzimático dependiente de catalasa-peroxidasa, de manera que bloquea la síntesis de ácidos micólicos y la pared de la micobacteria se desintegra (<http://www.novartis.es/docpdf/Tuberculosis.pdf>)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La tuberculosis es un problema de salud en México, las causas que condicionan la enfermedad se encuentran con toda seguridad en las características socioeconómicas, de sanidad y recursos en salud de la población. Confirmar la presencia de la enfermedad por cultivo tradicional es tardado y a veces imposible, además el diagnóstico resulta complicado dependiendo de la edad, sitio primario de la infección, número de órganos o sistemas involucrados, estado de nutrición o condiciones inmunológicas del enfermo, si cursa o no con enfermedades subyacentes, si presenta complicaciones en los órganos afectados o de tipo general. Clínicamente existen una serie de síntomas que no son exclusivos de la enfermedad tuberculosa y pueden ser causa de confusión. Las técnicas para diagnóstico que han surgido hoy en día presentan sus limitantes siendo técnicas que requieren del uso de antígenos de diferente naturaleza bioquímica y pureza. Esto ha proporcionado la búsqueda de un método de diagnóstico rápido, confiable y de bajo costo con alta sensibilidad y especificidad. En la actualidad es importante el desarrollo de una técnica con éstas características para identificar casos tuberculosos en pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar. El uso de la fracción 4MT de naturaleza lipídica como antígeno en la técnica de ELISA y ELISA-liposomal puede proporcionar resultados confiables y apoyar al diagnóstico temprano de la enfermedad para establecer un tratamiento oportuno.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVOS

- Purificar la fracción lipídica 4MT de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra por medio de extracción con solventes y comprobar su reactividad inmunológica por Western-blot usando sueros de pacientes tuberculosos y sanos.
- Identificar la composición bioquímica de la fracción 4MT por cromatografía en capa fina y el revelado con diferentes reactivos.
- Desarrollar técnicas inmunoenzimáticas que utilicen como antígeno la fracción 4MT, presentándolo como fracción independiente o agregada en liposomas.
- Evaluar la eficiencia diagnóstica de los inmunoensayos ELISA-4MT y ELISA-liposomal con 4MT para identificar la población tuberculosa y sana.
- Evaluar la importancia del uso de antígenos no proteicos útiles en el serodiagnóstico de tuberculosis pulmonar.

HIPÓTESIS

Si existen diferencias significativas entre la técnica de ELISA utilizando sólo la fracción lipídica 4MT y la técnica de ELISA usando la misma fracción incluida en liposomas, entonces es importante la presentación de antígenos, si no hay diferencias significativas entre las dos técnicas entonces no importa el tipo de presentación de los antígenos reconocidos por anticuerpos presentes en suero de pacientes con tuberculosis pulmonar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

TIPO DE ESTUDIO

Observacional, transversal, prospectivo.

POBLACIÓN

- 73 sueros de sujetos tuberculosos con la enfermedad comprobada por clínica, RX y/o cultivo.
- 14 sueros de sujetos con lepra comprobada clínica e histológicamente.
- 15 sueros de sujetos con histoplasmosis comprobada clínica y bacteriológicamente.
- 11 sueros de sujetos con otras micosis.
- 18 sueros de sujetos con cisticercosis comprobada por inmunofluorescencia y tomografía axial computarizada (TAC).
- 73 sueros de sujetos clínicamente sanos.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

INCLUSIÓN

Sueros de sujetos tosedores adultos con sospecha de tener algún padecimiento pulmonar preferentemente tuberculosis.

EXCLUSIÓN

Sueros de sujetos inmunodeprimidos por VIH y población infantil.

ELIMINACIÓN

Sueros que presenten características de contaminación, apariencia quillosa y hemólisis.

VARIABLES

- Presentación estructural o conformacional de la fracción 4MT de origen lipídico para ser utilizado en las dos variantes del ELISA.
- Grupos de sueros en estudio.

DISEÑO ESTADÍSTICO

Estadística descriptiva, estadística inferencial y kappa de Cohen.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL DIVERSO Y EQUIPO

- Estufa para medios de cultivo *Blue-electric*
- Centrífuga refrigerada *Damon/IEC*.
- Microcentrífuga refrigerada *Hermle Z252M*.
- Campana de bioseguridad *VWR*
- Agitador mecánico *VWR Scientific*
- Equipo de electrotransferencia *Bio-Rad*
- Equipo de electroforesis *Bio-Rad Protean II*
- Fuente de poder *Bio-Rad*
- Recipientes para incubación de tiras *Bio-Rad*
- Potenciómetro digital *Corning*
- Material de vidrio *Pyrex* (matraces, tubos de ensaye, vasos, probetas, embudos,
- Balanza granataria *Ohaus*
- Balanza analítica *Chyo*
- Refrigerador (4° C) *Mabe*
- Congelador (-20° C) *American*
- Ultracongelador (-70° C) *VWR*
- Micropipetas de 1-10 μL , 10-100 μL y 250-1000 μL marca *Eppendorf*.
- Pipetas graduadas de 5 y 10 mL *Pyrex*
- Tubos *Eppendorf*
- Filtro de poro abierto *Merck*
- Baño María *Fisher Scientific*.
- Papel de nitrocelulosa *BioRad*.
- Microplacas de titulación de 96 pozos *Costar*
- Lector de placas de ELISA *Labsystems*.
- Micropipeta *Hamilton*
- Placas cromatográficas comerciales (Cromatofolios AL TLC 20 x 20 cm, sílica gel 60 F2545 *Merck*)
- Cámara cromatográfica *Merck*
- Agitador Orbital *New Brunswick Scientific*.
- Multipipeta de 8 canales, de volumen variable *Gilbson*
- Lavador semiautomático de placas *Corning*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SOLUCIONES Y REACTIVOS

- Medio Sauton a pH 7.2
- Solución salina al 0.85%
- Solución de acrilamida para el gel separador (37.7% T 0.5% Cbis)
- Solución de acrilamida para el gel concentrador (39.4% T 4.8% Cbis)
- Regulador para el gel separador (Tris 3.0 M, pH 9.3).
- Regulador para el gel concentrador (Tris 0.5M, pH 6.8)
- Dodecil sulfato de sodio al 10% *Bio-Rad*.
- Persulfato de amonio (psa al 10%) *Sigma*.
- Azul de bromofenol (0.5% w/v en etanol al 10%). *Sigma*
- Glicerol al 10% *Sigma*
- Regulador de corrimiento.
- Regulador de muestra
- Colorante de trabajo azul de Coomassie
- Solución decolorante de geles teñidos con azul de Coomassie.
- Regulador de transferencia.
- PBS 0.01 M pH 7.4
- PBS – Tween 0.1%
- PBS – Tween 0.1% - albúmina sérica bovina 1.0%
- Rojo de Ponceau S *Sigma*.
- Anti – IgG humana en cabra- peroxidasa *Bio- Rad*.
- Tetracloruro de diaminobencidina (DAB) *Merck*
- Marcadores de peso molecular *GIBCO* preteñidos (2.9–44 kDa).
- Sudán negro B *Sigma*.
- Etanol al 60% *Merck*
- Albúmina sérica bovina fracción V *Sigma*
- Regulador de TRIS-SALINA pH 7.0 (TS)
- Etanol absoluto *Merck*
- Solución de bloqueo I (albúmina 1% en PBS pH 7.4)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Solución de bloqueo II (leche 2% *Sveltis* en TS pH 7)
- Conjugado antinmuglobulinas humanas obtenida en cabra *Pierce*
- Ortofenilendiamina (OPD) *Sigma*
- Peróxido de hidrógeno al 30% *PQM*
- Ácido sulfúrico 4N. *Merck*
- Cloroformo *Aldrich*
- Metanol Fisher *Scientific*
- Nitrógeno gaseoso *Infra*
- Ácido acético *PQM*
- Yodo *PQM*
- Solución de molibdato *Merck*
- Reactivo de bismuto *Merck*
- Ninhidrina *Merck*

METODOLOGIA

Obtención del extracto lipídico ²⁶

1. La cepa *M. tuberculosis* H37Ra se inoculó en medio Sauton y se incubó por 5 semanas a 37° C.
2. Se cosechó por filtración a través de papel filtro, se recolectó la masa bacilar con ayuda de un abatelenguas y se lavó 3 veces con solución salina al 0.85%. Se separó en alícuotas de 20 mL aproximadamente en tubos con tapa de rosca y se conservó hasta su uso a -70° C.
3. Una alícuota de 20 mL de masa bacilar se vertió en un matraz Erlenmeyer con tapa de baquelita, agregando 75 mL de una mezcla de cloroformo- metanol (1:2).
4. Se incubó en baño maría a 50° C durante 18 horas, centrifugando a 2500/ 20 minutos, separando el sobrenadante, y agregando una mezcla de cloroformo-agua (1:1) v/v, agitando una hora a temperatura ambiente.
5. Se vertió la mezcla en un embudo de separación hasta la obtención de las dos fases.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

6. Se dividió la fase orgánica en alícuotas de 2 mL las cuales se evaporan con atmósfera de nitrógeno, se obtuvo el peso seco de cada alícuota y se conservó a -70°C .

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

1. Los reactivos para preparar geles se usaron a temperatura ambiente
2. Se lavaron los vidrios de las cámaras de electroforesis con detergente neutro líquido (extrán), secando al aire o con lavados de etanol.
3. Se armaron los vidrios formando un "sandwich" con los separadores, se ajustaron y colocaron en sus respectivos soportes, marcando el límite de los geles con ayuda de la tarjeta alineadora.
4. Se aseguró que no existiera fuga agregando agua a cada compartimiento y posteriormente se secaron.
5. Se preparó el persulfato de amonio justo antes de usarse.
6. Se agregaron los reactivos en un matraz limpio en el siguiente orden para formar el gel separador, una vez hecha la mezcla, ésta se vertió en los compartimientos correspondientes:

Componente del gel separador	Cantidad para dos geles chicos
Acrilamida	9.07 mL
Agua destilada	1.75 mL
Glicerol al 10%	1.7 mL
Amortiguador del gel separador	4.24 mL
SDS al 10%	170 μL
Persulfato de amonio al 10%	48 μL
TEMED	24 μL

7. Después se agregaron lentamente unas gotas de isopropanol, lo cual permitió observar la formación del límite superior del gel separador. El tiempo en gelificar para un gel chico fue de aproximadamente 20 minutos.
8. Se lavó con agua para eliminar el exceso de alcohol y se secó con papel filtro.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9. Se agregaron los siguientes reactivos en un matraz limpio para formar el gel concentrador y se vertió la mezcla hasta el borde superior de los vidrios colocando el peine deseado.

Componente del gel concentrador	Cantidad para dos geles chicos
Acrilamida	2.52 mL
Agua destilada	3.82 mL
Glicerol al 10%	1.0 mL
Amortiguador del gel concentrador	2.5 mL
SDS al 10%	100 μ L
Persulfato de amonio al 10%	30 μ L
TEMED	24 μ L

10. Al término de la gelificación se retiraron los peines y se lavaron los geles con agua.
11. Se prepararon las cantidades correspondientes del extracto antigénico en un vial y se agregó un volumen igual de regulador de muestra y de agarosa al 2%.
12. Se colocaron cuidadosamente los extractos en los carriles deseados.
13. Se ensamblaron los "sandwiches" de vidrio en el soporte que contiene los electrodos asegurando de que no haya fuga agregando agua dentro de tanque interior.
14. Se agregó el regulador de corrimiento en los 2 tanques de la cámara, el interior debe ser nuevo en cada corrida y el exterior puede usarse 3 veces.
15. Se colocaron los marcadores de peso molecular.
16. Se conectaron los cables a la fuente de poder y se ajustó la corriente empleada para el gel concentrador a 10 mA y para el gel separador a 20 mA.
17. Se procedió a teñir (con azul de Coomassie y Sudán negro) o bien a transferir en papel de nitrocelulosa (ver anexo 2).

ELECTROTRANSFERENCIA

1. En un recipiente se colocó la cantidad suficiente del regulador de transferencia pH 8.3 para cubrir las esponjas y papel filtro.
2. Se sacaron los geles cuidadosamente de los vidrios y se colocaron en otro recipiente conteniendo el mismo regulador. Se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Se cortó el papel de nitrocelulosa del tamaño del gel hidratándose, primero con agua (5 minutos) y luego en el regulador de transferencia (10 minutos).
4. Se alineó el papel de nitrocelulosa con el gel, marcando con lápiz el papel para reconocer los límites y orientación del gel y revisando perfectamente que entre ellos no existieran burbujas, las cuales provocarían una mala transferencia al papel.
5. Se ensamblaron los cassettes como sigue: la esponja, un pedazo del papel filtro, el papel de nitrocelulosa, el gel, papel filtro y esponja.
6. Cada cassette se incorporó al tanque de la cámara de transferencia lleno con el regulador y su compartimento refrigerante previamente congelado.
7. Se conectaron los electrodos de la tapa de la cámara a la fuente de poder.
8. La transferencia se realizó durante 1 hora a 100 volts o bien toda la noche a 80 mA. La cámara de transferencia debe contener una barra magnética que disperse el calor generado por el voltaje además del refrigerante previamente congelado, y colocarse encima de un agitador magnético.

INMUNODETECCIÓN

1. Una vez transcurrido el tiempo, se sacaron los cassettes y se tomó el papel de nitrocelulosa transferido, se colocó en un recipiente con PBS-Tween 20 0.1% y se realizaron 2 lavados de 5 minutos cada uno.
2. Se bloqueó la membrana con PBS-Tween 20 al 0.1 %-albúmina sérica bovina al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Se lavó 3 veces (10 min c/u) con PBS- Tween 20 0.1%.
3. Se cortaron las tiras de papel de nitrocelulosa según el número de sueros por probar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4. Se adicionó 1 mL de la dilución del suero problema así como de los testigos cuando se tratan tiras individuales, esto es 1:500 en PBS-Tween 20 al 0.1%- albúmina sérica bovina al 0.1%. Incubando 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.
5. Se lavaron 5 veces (6 minutos c/u) con PBS- Tween al 20 0.1%
6. Se agregó el conjugado anti IgG humana-peroxidasa BIO-RAD (1:1000 en PBS- Tween 20 al 0.1%-leche al 5%) incubando 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.
7. Se lavó 5 veces (12 minutos c/u) con PBS- Tween 20 al 0.1%.
8. Se agregó el sustrato que debe ser preparado al momento de usarse y se incubó 20 minutos. Una vez observadas las bandas se lavó con suficiente agua destilada y se secó al aire para el posterior análisis.

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Se marcó el origen del corrimiento en placas cromatográficas comerciales para aplicar 30 μ L de la fracción 4MT previamente disuelta en 200 μ L de cloroformo. Se dejaron secar a temperatura ambiente para evaporar el cloroformo y se colocaron en una cámara de vidrio conteniendo una mezcla de cloroformo-metanol-ácido acético-agua en proporción 65:25:8:4, se tapó para evitar la evaporación del solvente. Se dejó correr la muestra hasta el final de la placa, se retiraron de la cámara y se dejaron secar al aire o a temperatura ambiente para la total evaporación de los solventes; posteriormente se revelaron las placas con los siguientes reactivos: yodo, molibdato, bismuto y ninhidrina (ver anexo 3).

PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS ⁷⁰

1. Se depositaron en un vial 6 μ moles de la fracción 4MT y 2 μ moles de fosfatidilcolina, ambas resuspendidas en cloroformo.
2. La mezcla se colocó en un matraz de dos bocas conectado a una bomba de vacío para evaporar el cloroformo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. Los lípidos se disolvieron en 1.2 mL de éter dietílico con agitación y se agregaron 300 μ L de PBS 0.1% pH 7.4, se agitó un minuto en un vortex a su máxima velocidad.

4. Se evaporó a vacío el éter dietílico y se agregaron 1.7 mL de PBS 0.1% pH 7.4, se filtró por una membrana de 0.45 micras para homogenizar el tamaño de las vesículas y conservarlas en esterilidad.

5. La concentración final fue de 8 mg / mL de liposomas en PBS.

ELISA LIPOSOMAL

1. Se sensibilizó la placa de poliestireno al agregar 100 μ L/pozo del liposoma formado por fosfatidilcolina-fracción 4MT en proporción 1:3 diluidos en PBS e incubando la placa una hora a temperatura ambiente.
2. Se bloqueó la placa al agregar 200 μ L/ pozo de la solución de bloqueo I y se incubó 1 hora a temperatura ambiente.
3. Se depositaron 100 μ L de la dilución (1:500) de suero problema y testigos (por duplicado) en solución de bloqueo I y se incubó 1 hora a 37° C.
4. Se lavó 4 veces con 200 μ L/ pozo de solución de bloqueo I.
5. Se depositaron 100 μ L/ pozo del conjugado anti-inmunoglobulinas humanas marcado con peroxidasa (1:4000) y se incubó 1 hora a 37° C.
6. Se lavó 4 veces con 200 μ L/ pozo con regulador PBS pH 7.4
7. Se colocaron 100 μ L/ pozo de la solución de sustrato y se incubó por 30 minutos a 37° C.

Al término se detuvo la reacción con 50 μ L de la solución de ácido sulfúrico y se leyó a 492 nm.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

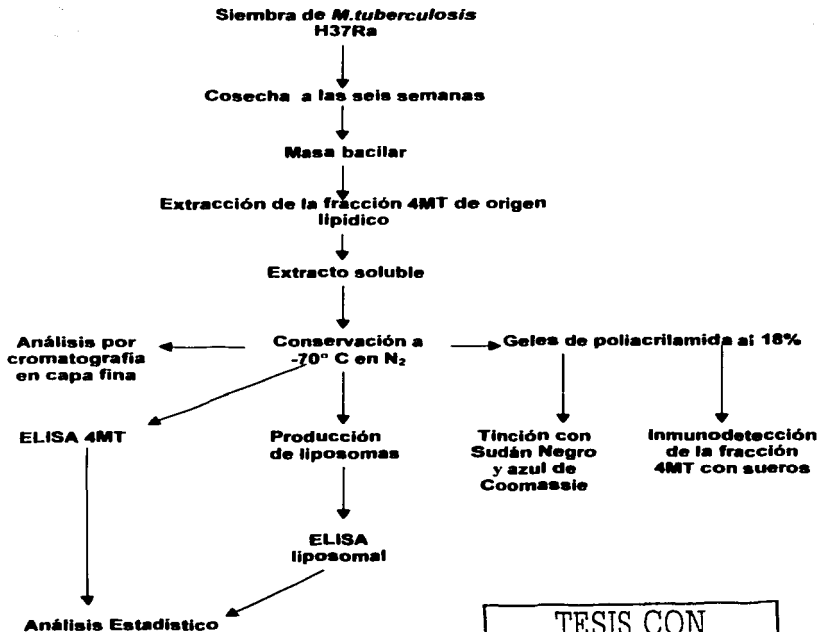
ELISA con fracción 4MT

1. Se sensibilizó la placa al agregar 100 μ L de la solución del antígeno (2.5 μ g fracción 4MT/ mL etanol absoluto) a cada pozo. Dejando secar la placa 2 horas a 37° C.
2. Se bloqueó la placa al agregar 200 μ L/ pozo de la solución de bloqueo II y se incubó 1 hora / 37° C
3. Se depositaron 100 μ L de la dilución (1:500) de suero problema y testigos (por duplicado) en solución de bloqueo II y se incubó 1 hora a 37° C.
4. Se lavó 5 veces con 200 μ L/ pozo con solución de bloqueo II.
5. Se depositaron 100 μ L/ pozo del conjugado anti-inmunoglobulinas humanas marcado con peroxidasa (1:4000) y se incubó 1 hora a 37° C.
6. Se lavó 5 veces con 200 μ L/ pozo de regulador TS pH 7.0
7. Se colocó 100 μ L/ pozo de la solución de sustrato y se incubó por 30 minutos a 37° C.

Al término se detuvo la reacción con 50 μ L de la solución de ácido sulfúrico y se leyó a 492 nm.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PLAN DE TRABAJO



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

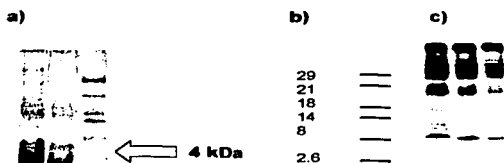


Figura 17. Gel de poliacrilamida al 18% con 1% de glicerol teñido con a) Sudán Negro B y con c) azul de Coomassie, donde se identifica el carácter lipídico de la molécula 4MT al teñirse solamente con sudán negro B, b) marcadores de peso molecular expresados en kDa.

El cálculo del peso molecular se realizó por determinación del R_f como se muestra:

Tabla 4. Marcadores de bajo peso molecular (MPM) preteñidos *GIBCO*

Componente	Peso molecular reportado (Da)
Insulina	2900
Inhibidor de tripsina bovina	5800
Lisozima	14690
β -lactoglobulina	18500
Anhidrasa carbónica	28860
Ovoalbúmina	44000

Tabla 5. Elaboración de la curva estándar de marcadores de bajo peso molecular.

Distancia recorrida por el MPM (cm)	Eje X: R_f de cada MPM (distancia/5.35 cm)	Eje Y (log del peso molecular)
4.1	0.7663	3.4624
3.4	0.6355	3.7634
2.85	0.5327	4.1670
2.6	0.4860	4.2672
1.95	0.3645	4.4603
1.4	0.2617	4.6435

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

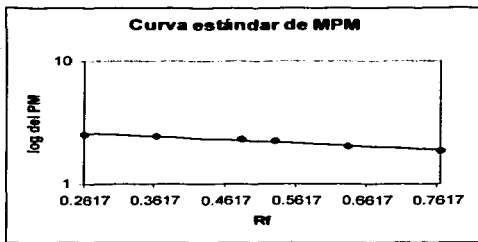


Figura 18. Curva estándar de marcadores de bajo peso molecular.

$$y = mx + b; \quad \log_{10} \text{PM} = m (\text{Rf}) + b$$

$$\text{Donde } b = 5.3410; m = -2.3902; r^2 = 0.9707$$

Interpolando el Rf de la banda de interés ($3.9 / 5.35 = 0.729$) en la curva estándar y calculando el antilog, el peso molecular obtenido es de 3.97 kDa.

WB



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 19. Reconocimiento inmunogénico de la fracción 4MT en sueros de pacientes tuberculosos.

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

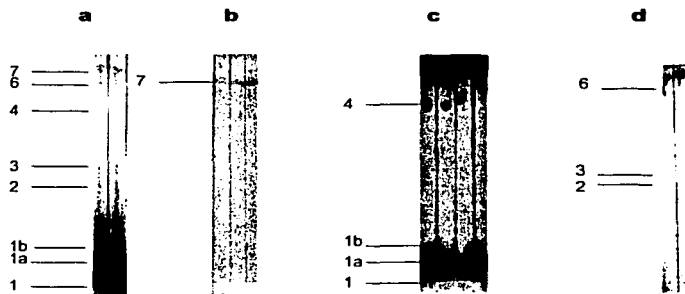
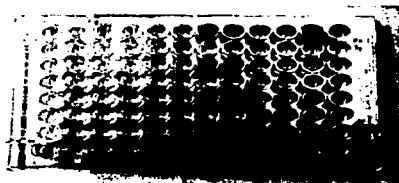


Figura 20. Comatografías en capa fina de la fracción 4 MT teñida con a) yodo que identifica lípidos totales, b) molibdato que revela lípidos con fosfato, c) con bismuto que muestra lípidos neutros y d) con ninhidrina que revela lípidos asociados a grupos amino.

ELISA



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 21. Placa de ELISA empleando sueros problema y sueros control.

VALOR DE CORTE PARA EL ELISA-4MT (D.O =0.205)

El valor de corte para el ELISA-4MT se calculó de la siguiente manera, se registró la densidad óptica de cada uno de los sueros sanos pertenecientes al grupo control negativo (n=73) para obtener el promedio y dos veces la desviación estándar. Una vez calculado se establece que por encima del valor obtenido la muestra problema es clasificada como positiva y por debajo de éste se clasifica como negativa.

ELISA-4MT

Resultados del ELISA-4MT en los grupos de sueros empleados

Tabla 6. GRUPO DE SUEROS SANOS

MUESTRA	DENSIDAD ÓPTICA	RESULTADO	MUESTRA	DENSIDAD ÓPTICA	RESULTADO
1	0.045	-	28	0.047	-
2	0.142	-	29	0.001	-
3	0.052	-	30	0.092	-
4	0.034	-	31	0.057	-
5	0.090	-	32	0.103	-
6	0.232	+	33	0.113	-
7	0.041	-	34	0.056	-
8	0.059	-	35	0.043	-
9	0.047	-	36	0.133	-
10	0.061	-	37	0.234	+
11	0.050	-	38	0.059	-
12	0.062	-	39	0.053	-
13	0.061	-	40	0.059	-
14	0.038	-	41	0.071	-
15	0.034	-	42	0.171	-
16	0.013	-	43	0.112	-
17	0.078	-	44	0.084	-
18	0.049	-	45	0.038	-
19	0.117	-	46	0.083	-
20	0.340	+	47	0.089	-
21	0.081	-	48	0.106	-
22	0.123	-	49	0.138	-
23	0.160	-	50	0.137	-
24	0.035	-	51	0.055	-
25	0.158	-	52	0.234	+
26	0.022	-	53	0.069	-
27	0.085	-	54	0.090	-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MUESTRA	DENSIDAD ÓPTICA	RESULTADO
55	0.132	-
56	0.072	-
57	0.122	-
58	0.069	-
59	0.035	-
60	0.017	-
61	0.016	-
62	0.051	-
63	0.026	-
64	0.048	-
65	0.016	-
66	0.028	-
67	0.124	-
68	0.103	-
69	0.123	-
70	0.126	-
71	0.060	-
72	0.215	+
73	0.074	-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 7. GRUPO DE SUEROS CON TUBERCULOSIS PULMONAR

MUESTRA	DENSIDAD ÓPTICA	RESULTADO	MUESTRA	DENSIDAD ÓPTICA	RESULTADO
1	0.852	+	47	0.867	+
2	0.47	+	48	0.546	+
3	0.122	-	49	0.696	+
4	0.132	-	50	0.460	+
5	0.392	+	51	0.208	+
6	0.326	+	52	1.502	+
7	0.303	+	53	0.172	-
8	0.037	-	54	0.207	+
9	0.279	+	55	0.882	+
10	0.542	+	56	0.357	+
11	0.498	+	57	0.742	+
12	0.094	-	58	0.233	+
13	0.233	+	59	0.425	+
14	0.528	+	60	0.153	-
15	0.258	+	61	0.175	-
16	0.486	+	62	0.325	+
17	0.48	+	63	0.310	+
18	0.502	+	64	0.376	+
19	0.122	-	65	0.555	+
20	0.152	-	66	0.277	+
21	0.52	+	67	0.288	+
22	0.474	+	68	0.542	+
23	0.861	+	69	0.758	+
24	0.879	+	70	0.239	+
25	0.841	+	71	0.756	+
26	0.151	-	72	1.044	+
27	0.269	+	73	1.019	+
28	0.187	-			
29	0.319	+			
30	0.136	-			
31	0.540	+			
32	0.914	+			
33	0.326	+			
34	0.515	+			
35	0.838	+			
36	0.662	+			
37	0.421	+			
38	0.225	+			
39	1.026	+			
40	0.345	+			
41	0.167	-			
42	0.052	-			
43	0.629	+			
44	0.769	+			
45	0.838	+			
46	0.372	+			

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 8. GRUPO DE SUEROS CON LEPROMATOSA

MUESTRA	DENSIDAD ÓPTICA	RESULTADO
1	0.162	-
2	0.171	-
3	0.165	-
4	0.801	+
5	0.207	+
6	0.163	-
7	0.244	+
8	0.390	+
9	0.301	+
10	0.557	+
11	0.330	+
12	0.241	+
13	0.294	+
14	0.297	+

Tabla 9. GRUPO DE SUEROS CON HISTOPLASMOSIS

MUESTRA	DENSIDAD ÓPTICA	RESULTADO
1	0.184	-
2	0.230	+
3	0.075	-
4	0.344	+
5	0.071	-
6	0.256	+
7	0.027	-
8	0.252	+
9	0.621	+
10	0.290	+
11	0.199	-
12	0.236	+
13	0.355	+
14	0.193	-
15	0.198	-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 10. GRUPO DE SUEROS CON NEUROCISTICERCOSIS

MUESTRA	DENSIDAD ÓPTICA	RESULTADO
1	0.124	-
2	0.257	+
3	0.431	+
4	0.141	-
5	0.230	+
6	0.160	-
7	0.195	-
8	0.217	+
9	0.095	-
10	0.188	-
11	0.154	-
12	0.181	-
13	0.114	-
14	0.255	+
15	0.217	+
16	0.149	-
17	0.181	-
18	0.190	-

Tabla 11. GRUPO DE SUEROS CON MICETOMA

MUESTRA	DENSIDAD ÓPTICA	RESULTADO
1	0.323	+
2	0.363	+
3	0.423	+
4	0.692	+
5	1.424	+
6	1.078	+
7	0.867	+
8	0.474	+
9	0.502	+
10	1.046	+
11	0.324	+

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

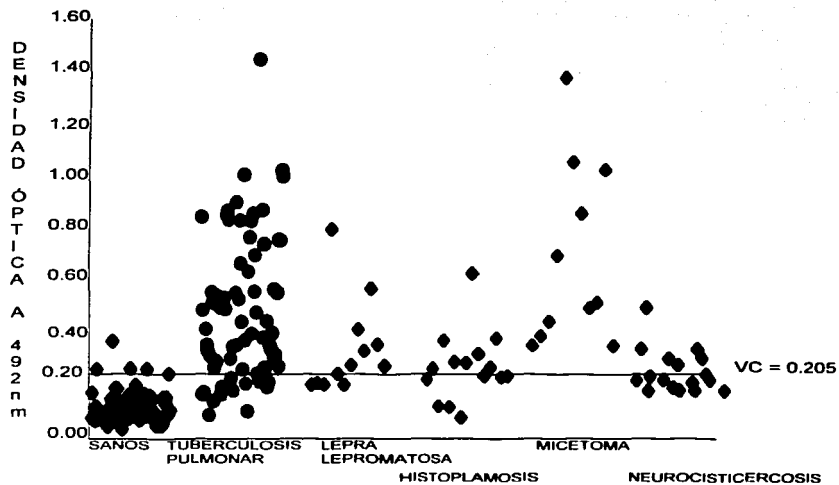


Figura 22. Gráfico de dispersión de puntos para los resultados por ELISA-4MT

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VALOR DE CORTE PARA EL ELISA-LIPOSOMAL (D.0 =0.144)

El valor de corte para el ELISA-liposomal se calculó de la siguiente manera, se registró la densidad óptica de cada uno de los sueros sanos pertenecientes al grupo control negativo (n=73) para obtener el promedio y dos veces la desviación estándar. Una vez calculado se establece que por encima del valor obtenido la muestra problema es clasificada como positiva y por debajo de éste se clasifica como negativa.

ELISA-LIPOSOMAL

Resultados del ELISA-liposomal en los grupos de sueros empleados

Tabla 12. GRUPO DE SUEROS SANOS

MUESTRA	DENSIDAD ÓPTICA	RESULTADO
1	0.048	-
2	0.046	-
3	0.088	-
4	0.047	-
5	0.071	-
6	0.210	+
7	0.162	+
8	0.073	-
9	0.057	-
10	0.065	-
11	0.065	-
12	0.072	-
13	0.064	-
14	0.045	-
15	0.059	-
16	0.050	-
17	0.049	-
18	0.072	-
19	0.061	-
20	0.100	-
21	0.049	-
22	0.131	-
23	0.085	-
24	0.105	-
25	0.091	-
26	0.080	-
27	0.102	-
28	0.055	-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

29	0.077	-
30	0.100	-
31	0.084	-
32	0.146	+
33	0.121	-
34	0.085	-
35	0.092	-
36	0.082	-
37	0.125	-
38	0.079	-
39	0.084	-
40	0.101	-
41	0.076	-
42	0.135	-
43	0.130	-
44	0.106	-
45	0.056	-
46	0.061	-
47	0.082	-
48	0.058	-
49	0.093	-
50	0.083	-
51	0.035	-
52	0.091	-
53	0.062	-
54	0.100	-
55	0.089	-
56	0.061	-
57	0.047	-
58	0.089	-
59	0.077	-
60	0.041	-
61	0.090	-
62	0.124	-
63	0.056	-
64	0.050	-
65	0.045	-
66	0.157	+
67	0.060	-
68	0.085	-
69	0.061	-
70	0.062	-
71	0.038	-
72	0.070	-
73	0.033	-

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 13. GRUPO DE SUEROS CON TUBERCULOSIS PULMONAR

MUESTRA	DENSIDAD ÓPTICA	RESULTADO	MUESTRA	DENSIDAD ÓPTICA	RESULTADO
1	0.557	+	38	0.200	+
2	0.306	+	39	1.026	+
3	0.083	-	40	0.171	+
4	0.122	-	41	0.493	+
5	0.214	+	42	0.030	-
6	0.560	+	43	0.576	+
7	0.111	-	44	0.435	+
8	0.122	-	45	0.675	+
9	0.129	-	46	0.130	-
10	0.228	+	47	0.435	+
11	0.250	+	48	0.231	+
12	0.164	+	49	0.119	-
13	0.126	-	50	0.095	-
14	0.711	+	51	0.826	+
15	0.366	+	52	0.199	+
16	0.492	+	53	0.967	+
17	0.456	+	54	0.154	+
18	0.109	-	55	0.195	+
19	0.363	+	56	0.550	+
20	0.069	-	57	0.342	+
21	0.203	+	58	0.121	-
22	0.717	+	59	0.339	+
23	0.678	+	60	0.195	+
24	0.972	+	61	0.074	-
25	0.153	+	62	0.124	-
26	0.1095	-	63	0.182	+
27	0.1175	-	64	0.471	+
28	0.0735	-	65	0.247	+
29	0.208	+	66	0.260	+
30	0.068	-	67	0.196	+
31	0.769	+	68	0.104	-
32	0.377	+	69	0.446	+
33	0.152	+	70	0.178	+
34	0.283	+	71	0.487	+
35	0.255	+	72	0.709	+
36	0.148	+	73	0.824	+
37	0.081	-			

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 14. GRUPO DE SUEROS CON LEPROA LEPRMATOSA

MUESTRA	DENSIDAD ÓPTICA	RESULTADO
1	0.079	-
2	0.078	-
3	0.075	-
4	0.389	+
5	0.083	-
6	0.090	-
7	0.083	-
8	0.206	+
9	0.205	+
10	0.271	+
11	0.152	+
12	0.089	-
13	0.107	-
14	0.245	+

Tabla 15. GRUPO DE SUEROS CON HISTOPLASMOSIS

MUESTRA	DENSIDAD ÓPTICA	RESULTADO
1	0.032	-
2	0.046	-
3	0.076	-
4	0.103	-
5	0.089	-
6	0.083	-
7	0.056	-
8	0.089	-
9	0.055	-
10	0.263	+
11	0.154	+
12	0.092	-
13	0.079	-
14	0.119	-
15	0.081	-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 16. GRUPO DE SUEROS CON NEUROCISTICERCOSIS

MUESTRA	DENSIDAD ÓPTICA	RESULTADO
1	0.053	-
2	0.062	-
3	0.086	-
4	0.062	-
5	0.069	-
6	0.037	-
7	0.077	-
8	0.069	-
9	0.064	-
10	0.076	-
11	0.049	-
12	0.064	-
13	0.055	-
14	0.084	-
15	0.152	+
16	0.077	-
17	0.094	-
18	0.099	-

Tabla 17. GRUPO DE SUEROS CON MICETOMA

MUESTRA	DENSIDAD ÓPTICA	RESULTADO
1	0.076	-
2	0.131	-
3	0.227	+
4	0.337	+
5	0.453	+
6	0.372	+
7	0.759	+
8	0.352	+
9	0.206	+
10	0.277	+
11	0.079	-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

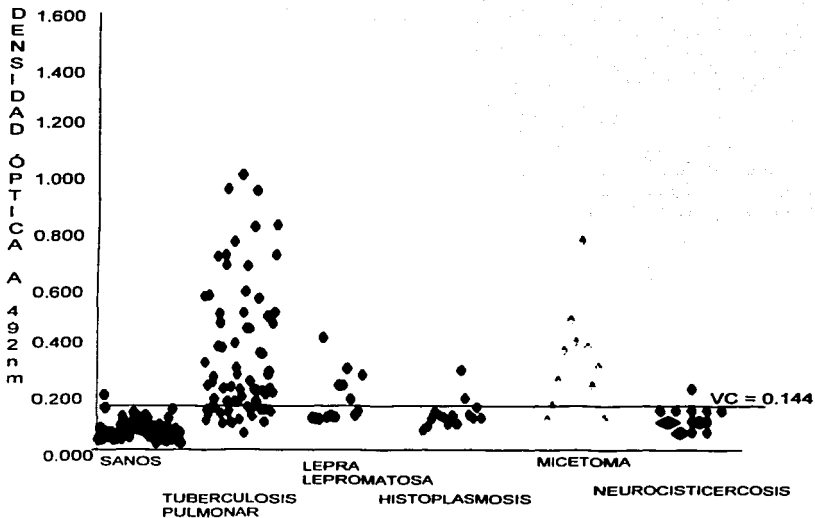


Figura 23. Gráfico de resultados por ELISA-LIPOSOAL

Tabla 18. Resultados de las pruebas aplicadas a la población de sueros sanos.

0 = resultado negativo 1 = resultado positivo

MUESTRA	ELISA-ESBCG	W-B	ELISA 4MT	ELISA LIPOSOMAL
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	1	0	1	1
7	0	0	0	0
8	0	0	0	1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	1	0	0	0
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	1	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	1	0
22	0	0	0	0
23	0	0	0	0
24	0	0	0	0
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	1	0	0	0
29	0	0	0	0
30	0	0	0	0
31	0	0	0	0
32	1	0	0	0
33	1	0	0	1
34	0	0	0	0
35	0	0	0	0
36	0	0	0	0
37	0	0	0	0
38	0	0	1	0
39	0	0	0	0
40	0	0	0	0
41	0	0	0	0
42	0	0	0	0
43	0	0	0	0

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

44	1	0	0	0
45	0	0	0	0
46	0	0	0	0
47	1	0	0	0
48	0	0	0	0
49	1	0	0	0
50	0	0	0	0
51	1	0	0	0
52	0	0	0	0
53	1	0	1	0
54	0	0	0	0
55	0	0	0	0
56	1	0	0	0
57	0	0	0	0
58	0	0	0	0
59	0	0	0	0
60	0	0	0	0
61	0	0	0	0
62	0	0	0	0
63	1	0	1	1
64	0	0	0	0
65	0	0	0	0
66	0	0	0	0
67	0	0	0	0
68	0	0	0	0
69	0	0	0	0
70	1	0	0	0
71	1	0	0	0
72	0	0	0	0
73	0	0	0	0

	ELISA-ESBCG	W-B	ELISA 4MT	ELISA LIPOSOMAL
POSITIVOS	15	0	5	4
NEGATIVOS	58	73	68	69
TOTAL	73	73	73	73

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 19. Resultados de las pruebas aplicadas a la población de sueros con tuberculosis pulmonar.

0 = resultado negativo 1 = resultado positivo

MUESTRA	CULTIVO	BAAR	ELISA-ESBCG	W-B	ELISA-4MT	ELISA-LIPOSOMAL
1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1
3	1	1	0	0	0	0
4	1	0	1	1	0	0
5	1	0	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	0
8	1	1	0	1	0	0
9	1	1	1	0	1	0
10	1	1	1	1	1	1
11	1	1	0	0	1	1
12	1	0	0	0	0	1
13	1	1	1	0	1	0
14	1	1	1	1	1	1
15	1	1	1	0	1	1
16	1	1	1	1	1	1
17	1	1	1	1	1	1
18	1	1	1	1	1	0
19	1	1	1	0	0	1
20	1	1	1	0	0	0
21	1	1	1	0	1	1
22	1	1	1	1	1	1
23	1	1	1	1	1	1
24	1	0	1	1	1	1
25	1	1	1	1	1	1
26	1	0	0	0	0	0
27	1	1	0	0	1	0
28	1	1	1	1	0	0
29	0	1	1	1	1	1
30	0	1	1	1	0	0
31	0	1	1	1	1	1
32	0	1	1	1	1	1
33	0	1	1	1	1	1
34	0	1	1	1	1	1
35	0	1	1	1	1	1
36	0	1	1	1	1	1
37	1	1	1	1	1	0
38	0	1	0	1	1	1
39	0	1	1	1	1	1
40	1	1	1	1	1	1
41	0	1	1	1	0	1
42	0	1	0	1	0	0
43	0	1	1	1	1	1
44	0	1	1	1	1	1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

45	1	1	1	1	1	1
46	0	1	1	1	1	0
47	0	1	1	1	1	1
48	0	1	1	1	1	1
49	0	1	1	1	1	0
50	0	1	1	1	1	0
51	0	1	1	1	1	1
52	0	1	1	1	1	1
53	0	1	0	1	0	1
54	0	1	1	1	1	1
55	0	1	1	1	1	1
56	0	1	1	1	1	1
57	0	1	1	1	1	1
58	0	1	1	1	1	0
59	0	1	1	1	1	1
60	0	1	1	1	0	1
61	1	0	1	1	0	0
62	0	1	1	1	1	0
63	0	1	1	1	1	1
64	1	1	0	1	1	1
65	0	1	1	1	1	1
66	0	1	0	1	1	1
67	0	1	1	1	1	1
68	0	1	1	1	1	0
69	0	1	1	1	1	1
70	0	1	1	1	1	1
71	1	1	1	1	1	1
72	0	1	1	1	1	1
73	0	1	1	1	1	1

	CULTIVO	BAAR	ELISA-ESBCG	W-B	ELISA-4MT	ELISA-LIPOSOMAL
POSITIVOS	34	67	62	62	59	52
NEGATIVOS	39	6	11	11	14	21
TOTAL	73	73	73	73	73	60

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTIMACIÓN DE LA CALIDAD DIAGNÓSTICA DE LAS TÉCNICAS USADAS

Se calcularon 4 parámetros para evaluar la calidad diagnóstica de las técnicas desarrolladas, tomando como "estándar de oro" al cultivo de Lowenstein-Jensen: **sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo de positividad (VPP) y valor predictivo de negatividad (VPN).** (Ver anexo 4)

Tabla 20. Tabla de contingencia para cálculo de los parámetros operativos (sensibilidad, especificidad, VPP y VPN) para el ELISA- 4MT.

		(Dilución de suero 1/500)		
		Tuberculosos	Sanos	Total
ELISA-4MT	+	59	5	64
	-	14	68	82
Total		73	73	146

ESTIMADOR PUNTUAL

S= 80.82% **VPP=** 92.19%

E= 93.15% **VPN=** 82.93%

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 21. Tabla de contingencia para cálculo de los parámetros operativos (sensibilidad, especificidad, VPP y VPN) para el ELISA-LIPOSOMAL.

		(Dilución de suero 1/500)		
		Tuberculosos	Sanos	Total
ELISA-liposomal	+	52	4	56
	-	21	69	90
	Total	73	73	146

ESTIMADOR PUNTUAL

S=	71.23%	VPP=	92.86%
E=	94.52%	VPN=	76.67%

Tabla 22. Índice operativo de las pruebas aplicadas e intervalo de confianza al 95%

MÉTODO	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	VPP	VPN
BARR²	82.8%	93.8%	85.7%	92.4%
	(69.1-96.6)	(88.0-99.6)	(72.7-98.7)	(86.0-98.8)
ELISA-ESBCG²	82.8%	56.9%	46.2%	88.1%
	(69.1-96.6)	(44.9-68.9)	(32.6-59.8)	(78.3-97.9)
W-B²	72.4%	72.3%	53.8%	85.5%
	(56.1-88.7)	(61.4-83.2)	(38.2-69.4)	(75.8-95.2)
ELISA-4MT	80.8%	93.15%	92.1%	82.9%
	(71.7-98.9)	(87.3-98.9)	(85.6-98.7)	(74.8-91.0)
ELISA-LIPOSOMAL	71.2%	94.5%	92.8%	76.6%
	(60.8-81.6)	(89.3-99.7)	(86.1-99.6)	(67.9-85.4)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PRUEBA DE CONCORDANCIA DE LAS TÉCNICAS APLICADAS

Este análisis es de utilidad para saber si los diferentes métodos aplicados tratan de igual manera los casos, es decir para averiguar si los métodos detectan la misma proporción de casos y si dichos casos son los mismos. Se aplica la *K* de Cohen como medida de concordancia; ésta se basa en comparar la concordancia observada en un conjunto de datos con respecto a la que podría ocurrir por simple azar.⁶⁰ Con ayuda del programa estadístico *SPSS versión 11.0* obtenemos los valores de este estimador de concordancia para las distintas técnicas aplicadas, con respecto al cultivo en Lowenstein-Jensen.

Tabla 23. Tabla de concordancia de las pruebas.

METODO	KAPPA	ERROR ESTANDAR	INTERVALO DE CONFIANZA AL 95%
BAAR ²	0.7734	0.0715	0.6333 - 0.9135
ELISA-ESBCG ²	0.3254	0.0843	0.1602 - 0.4906
W-B ²	0.4082	0.0948	0.2224 - 0.5940
ELISA-4MT	0.7397	0.0557	0.6306 - 0.8489
ELISA-LIPOSOMAL	0.6575	0.0624	0.5353 - 0.7797

ANÁLISIS

La tuberculosis sigue siendo un problema prioritario de salud pública en nuestro país; durante mucho tiempo estuvo asociada a pobreza y bajo nivel cultural, sin embargo, hay que considerar más factores de riesgo que la promueven, como el hacinamiento dado por el aumento poblacional en grandes ciudades (como la Ciudad de México) facilitando la infección entre los habitantes y por tanto susceptibilidad a tuberculosis.

Los signos y síntomas clínicos de la enfermedad son inespecíficos en muchos de los casos además obtener una baciloscopia positiva al expulsar más de 10 000 bacilos por mililitro de esputo es una remota posibilidad, por lo que la eficiencia de los procedimientos diagnósticos como el BAAR o cultivo se encuentran limitados. Así que se debe tomar en cuenta que las condiciones óptimas para realizar el diagnóstico no siempre están disponibles.

Las pruebas serológicas son una buena opción por ser rápidos y de bajo costo pero debido a la variabilidad de antígenos utilizada muestran diferentes parámetros en cuanto a especificidad y sensibilidad, por lo que se sigue buscando al antígeno ideal para usarlo como referencia en el diagnóstico de la tuberculosis. El ELISA-ESBCG ya establecido como prueba de rutina con sensibilidad de 91.3% y especificidad de 92.1% (v. Tabla. 22) ha sido empleada con éxito, pero entre sus desventajas está la utilización de un extracto crudo y la no identificación de todos los casos positivos incluso a nivel extrapulmonar.²

Por W-B se identificó una molécula de bajo peso molecular cercana a 4KD denominándose fracción 4MT, la técnica tiene una sensibilidad de 72.4% y una especificidad de 72.3%² (v. tabla. 22), este antecedente da la pauta para estudiar su posible aplicación como antígeno en pruebas de diagnóstico analizando su composición total usando la cromatografía en capa fina. Los resultados muestran una caracterización parcial de la molécula, identificándose, lípidos con fosfato, lípidos neutros con colina y lípidos asociados a grupos amino, pero aun así debe

realizarse un análisis más específico empleando tecnología avanzada como la HPLC (cromatografía de líquidos de alta resolución) o resonancia magnética nuclear , para su caracterización completa.

Los lípidos en general se han considerado como antígenos con baja inmunogenicidad incluso se ha dicho que no desencadenan respuesta inmunológica, pero algunos estudios han demostrado que los lípidos micobacterianos pueden causar hipersensibilidad, formación de granulomas, caseificación y necrosis en tejidos. La mayoría de estos estudios han sido para identificar su naturaleza química y su participación en la patogenia de la enfermedad pero sin resultados concretos.²⁶

La semipurificación de la fracción 4MT con solventes orgánicos a partir de masa bacilar de *M. tuberculosis* H37Ra fue de gran utilidad para usar a esta fracción como fuente de antígeno sólo en un ELISA y para formar liposomas empleando otro ELISA de variedad liposomal para reconocimiento antigénico en casos tuberculosos. El resultado es importante porque sólo hay un antecedente de la relevancia inmunológica de una molécula de naturaleza lipídica y de bajo peso molecular.²

Los resultados de el ELISA-4MT tiene una sensibilidad de 80.82% y una especificidad de 93.15% y para el ELISA-liposomal una sensibilidad de 71.23% y una especificidad de 94.52% (v. tabla. 22). Estudios hechos para reconocimiento antigénico antilípidos muestran que hay reconocimiento para liposomas que no forman bicapa sino otros arreglos moleculares, por lo tanto el estudio de un ELISA-LIPOSOMAL con otros arreglos moleculares distintos a bicapa ayudaría a comprender más cómo se presentan los lípidos in vivo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Después del correspondiente análisis estadístico se estimaron resultados aceptables para la técnica ELISA-4MT indicativos de su capacidad diagnóstica semejante al cultivo en Lowenstein-Jensen, por los resultados obtenidos para $\kappa = 0.77$ (v. tabla. 23) y así identificar con certeza los casos que presentan la tuberculosis pulmonar (sensibilidad = 80.82% y VPP = 92.19%) y a los exentos de ella (especificidad = 93.15% y VPN = 82.93%) en una población con una prevalencia del 30% de la enfermedad. El ELISA-LIPOSOMAL tiene una menor capacidad de identificación de enfermos verdaderos (sensibilidad = 71.23% y VPP = 92.56%) y menor capacidad que el método anterior para identificar los casos que están exentos del padecimiento (especificidad = 94.52% y VPN = 76.67%) (v. tabla. 22).

Comparando el VPP y VPN del BAAR se muestra un VPP = 85.7% y un VPN = 92.4% de ahí su semejanza a los resultados del cultivo, esto la hace una prueba confiable, mientras que el ELISA-ESCBG como ya se sabía su VPP es muy bajo VPP = 46.2% aunque su valor predictivo para casos negativos es de 88.1%. El W-B, clasifica sólo el 53.8% de casos positivos y su VPN = 85.5% considerándola como análisis regular(v. tabla.22).

Las pruebas de concordancia ofrecen la similitud o diferencia de aplicar una u otra prueba para determinado diagnóstico y mientras más cercano sea el valor a 1 las pruebas son muy semejantes. Todos los cálculos de κ se realizaron tomando como estándar de oro al cultivo e identificación del agente infeccioso. El W-B presenta un valor de κ de 0.4082 que es bajo para ser considerada como prueba alterna al diagnóstico de tuberculosis, al igual que el ELISA-ESBCG ($\kappa = 0.3254$), el ELISA-LIPOSOMAL tiene una κ de 0.6575 por lo que su concordancia es alta pero no mejor que el BAAR ($\kappa = 0.7734$) y el ELISA-4MT ($\kappa = 0.7397$) por lo que se sugiere que el ELISA-4MT si puede ser de gran utilidad como una prueba alternativa al diagnóstico de la tuberculosis pulmonar usando un antígeno de origen lipídico(v. tabla. 23)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La reacción cruzada se mostró en sueros con otros padecimientos infecciosos semejantes a tuberculosis como lepra, histoplasmosis y micetoma al utilizar las técnicas desarrolladas (ELISA-4MT y ELISA-LIPOSOMAL) pero debe considerarse que filogenéticamente el género *Mycobacterium* está muy cercano de *Histoplasma* y *Nocardia*, por lo que el antígeno 4MT o fracciones de ésta pueden compartirse entre sí.

Los valores elevados de sensibilidad y especificidad para el ELISA 4MT hacen que dicha técnica se pueda considerar como una herramienta más en el diagnóstico serológico de tuberculosis y muy posiblemente mejorarla si se estudian los componentes específicos que conforman la fracción 4MT. Por lo tanto los estudios serológicos de ELISA y W-B ofrecen ventajas de rapidez y costo; pueden hacerse a partir de suero o LCR pero se piensa que sólo demuestran el antecedente de contacto con la bacteria; de modo que si el título es elevado, es sugerente de enfermedad pero un resultado negativo no descarta la enfermedad, siempre se deben considerar otros parámetros en el estudio de los casos sospechosos como la clínica, estudios de gabinete, antecedentes de contactos similares y sobre todo si existe el aislamiento del agente infeccioso que seguirá siendo el "estándar de oro" para tuberculosis pulmonar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES

- Se logró purificar la fracción 4MT de *Micobacterium tuberculosis* H37Ra con diferentes solventes y se comprobó su reactividad inmunológica por Western-Blot empleando sueros sanos y tuberculosos.
- A partir de la fracción 4MT semipurificada, por medio de la cromatografía en capa fina se identificaron residuos de lípidos con fosfato, lípidos neutros con colina y lípidos asociados a grupos amino.
- Se desarrollaron dos métodos de ELISA usando como antígeno la fracción 4MT. Uno con dicha fracción disuelta en alcohol etílico y mostrando una sensibilidad del 80.82% y una especificidad del 93.15% y el otro con la fracción 4MT agregada en liposomas obteniendo una sensibilidad del 71.23% y una especificidad del 94.52%.
- Se evaluó la eficiencia de las técnicas ELISA-4MT y el ELISA-LIPOSOMAL mostrando la primera una mejor capacidad diagnóstica ofreciendo una alternativa para el diagnóstico serológico de tuberculosis pulmonar.
- Se demostró que si hay reconocimiento antigénico de lípidos en casos pulmonares y tomando en cuenta que la fracción 4MT contiene residuos de aminoácidos, éstos pueden actuar como adyuvantes al reconocimiento de lípidos y desencadenar una respuesta inmunológica contra éstos.
- Estos datos son de relevante importancia para estudios futuros y así poder ofrecer resultados con prontitud al identificar casos enfermos de tuberculosis pulmonar y además de ofrecer alguna alternativa para casos extrapulmonares.
- El estudio de las diferentes presentaciones de un antígeno lipídico, sólo o formando agregaciones moleculares como liposomas ofrece mejores resultados para el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO 1

PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES

CULTIVO

Medio Sauton

L- Asparagina	4.0 g
Ácido cítrico- H ₂ O	2.0 g
Sulfato de magnesio	0.5 g
Fosfato dipotásico	0.5 g
Citrato de amonio férrico	0.05 g
Glicerol	60 mL
H ₂ O destilada	Aforar a 1000 mL

ELECTROFORESIS

1.- Solución de acrilamida para el gel separador (37.7% T 0.5% C _{bs})

Acrilamida	37.5 g
Bisacrilamida	0.1875 g
Agua destilada	100 mL

2.- Solución de acrilamida para el gel concentrador (39.4% T 4.8% C _{bs})

Acrilamida	37.5 g
Bisacrilamida	1.875 g
Agua destilada	100 mL

3.- Solución amortiguadora para el gel separador (Tris 3.0 M, pH 9.3)

Tris-base	16.1 g
Tris-HCl	2.7 g
Agua destilada	50 mL

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.- Solución amortiguadora para el gel concentrador (Tris 0.5 M, pH 6.8)

Tris-base	0.075 g
Tris-HCl	3.85 g
Agua destilada	50 mL

5.- Dodecil sulfato de sodio al 10%

SDS	100 g
Agua destilada	1 litro

6.- Persulfato de amonio (psa) al 10%

PSA	100 mg
Agua destilada	1.0 mL

7.- Azul de bromofenol (0.5% p/v en etanol al 10%)

Azul de bromofenol	50 mg
Etanol al 10%	10 mL

8.- Glicerol al 10%

9.- Regulador de corrimiento

Glicina	142.7 g
Tris-Base	25.66 g
Tris-HCl	6.14 g
SDS al 10%	50 mL
Agua destilada	Aforar a 5 L

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TINCIÓN DE PROTEÍNAS

1.-Solución madre para la tinción de proteínas con azul de Coomassie

Azul de Coomassie R-250	2 g
Agua tridestilada	200 mL

Disolver en agua caliente, filtrar en papel Wathman No.1 y conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

2.-Colorante de trabajo azul de Coomassie

Solución madre de azul de Coomassie	31,3 mL
Metanol	125 mL
Acido acético glacial	25 mL
Agua tridestilada	68,7 mL

Mezclar, llevar a 250 mL, y filtrar por papel Wathman No.1, conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

3.-Solución decolorante de geles teñidos con azul de Coomassie

Metanol	500 mL
Acido acético glacial	100 mL
Agua tridestilada	400 mL

ELECTROTRANSFERENCIA

1.-Regulador de transferencia

Tris-base	3.02 g
Glicina	14.4 g
Metanol	200 mL
Agua tridestilada	800 mL

Se ajusta el pH a 8.3 con hidróxido de sodio 1 M, aforar a 1 litro, conservar en refrigeración, puede ser usado 3 ó 4 veces.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.-PBS 0.01M pH 7.4

NaCl	0.06 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	3.0 g
Na ₂ HPO ₄ anhidro	12.8 g

Se ajusta el pH a 7.4 si es necesario con las mismas sales, aforar a 1 litro.

3.-PBS-Tween 0.1%

PBS 0.01M pH 7.4	1 L
Tween 20	1 mL

4.-Solución de Bloqueo: PBS-Tween 0-1%-albúmina sérica bovina 1%

PBS-Tween 0.01%	50 mL
Albúmina sérica bovina	0.5 g

5.-Colorante rojo de Ponceau S

Acido tricloroacético	3 g
Agua tridestilada	100 mL
Rojo de Ponceu S	20 mg

6.-Sueros problema y testigos

Diluidos 1:100 en solución PBS-Tween 0.1%-albúmina sérica bovina 0.1%

7.-Conjugado Anti-IgG humana en cabra-HRPO (BIO-RAD)

Diluir 1:500 en PBS-Tween 0.1%-leche 5%

8.-Sustrato

Tetracloruro de diamino bencidina (DAB)	5 mg
Tris 0.05 M pH 7.4	10 mL
H ₂ O ₂ al 30%	3 µL

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ELISA

1. Solución amortiguadora de Tris-salina (TS) pH 7.0

Tris-base	1.210 g
Cloruro de sodio	0.058 g

Disolver en 700 mL de agua destilada, ajustar el pH con HCl 1 N y aforar a 1000 mL.

2. Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4

NaCl	0.06 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	3.0 g
Na ₂ HPO ₄ anhidro	12.8 g

Se ajusta el pH a 7.4 si es necesario con las mismas sales, aforar a 1 litro.

3. Solución de bloqueo I (albúmina 1% en PBS pH 7.4)

Albúmina sérica bovina	1.0 g
Amortiguador de PBS pH 7.4 para	100 mL

4. Solución de bloqueo II (leche 2% Sveltis en TS pH 7.0)

Leche	2.0 g
Amortiguador de Tris-salina pH 7.0 para	100 mL

5. Solución de sustrato de la peroxidasa

Ortofenilendiamina	10 mg
Regulador TS ó PBS según el caso	25 mL
Peróxido de hidrógeno al 30%	20 μ L

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO 2

TINCIONES PARA GELES DE POLIACRILAMIDA

TINCION PARA LIPIDOS CON SUDAN NEGRO B ⁷¹

Preparar una solución saturada de Sudán Negro B en etanol al 60 % (v/v) a 37°C. Enfriar la solución a temperatura ambiente y filtrar. Inmediatamente antes de usarse, se filtra otra vez y se agrega 0.1 mL de hidróxido de sodio al 25 % (p/v) por cada 50 mL de colorante. El gel se tiñe por 24 horas y se lava con etanol al 50 % (30 minutos).

TINCION PARA PROTEÍNAS AZUL DE COOMASSIE ^{72,73}

Colocar en un recipiente limpio aproximadamente 200 mL del colorante de trabajo de azul de Coomassie y el gel chico, si se quiere de una tinción rápida, cubrir el recipiente e incubar 1 hora a 37°C, si no es así, incubar a temperatura ambiente 4 horas y en agitación continua. Verter el colorante y agregar la solución decolorante cambiando las veces necesarias hasta observar la nitidez de las bandas. El colorante de trabajo puede usarse hasta 5 veces al igual que la solución decolorante pues ésta se filtra en carbón activado y se vuelve a utilizar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO 3

REVELADO DE PLACAS CROMATOGRÁFICAS

1. Yodo: La placa perfectamente seca se introduce a la cámara que contiene yodo metálico permaneciendo en esa atmósfera hasta la aparición de color.

Los compuestos con insaturaciones se observan de color amarillo intenso y/o café.

2. Reacción con molibdato: La placa se rocía con solución de molibdato, se deja secar y se puede calentar un poco.

Los lípidos con fósforo (fosfolípidos) revelan de color azul contra fondo blanco a azul claro.

3. Reacción con bismuto: La placa se rocía con el reactivo de bismuto que consta de la solución A y solución B (La solución A se prepara disolviendo 1.7 g de nitrato de bismuto en 100 mL de ácido acético al 20% en agua. La solución B consta de 40 g de yoduro de potasio disuelto en 100 mL de agua destilada). Cuando se va a usar el reactivo se mezclan 4 mL de la solución A con 20 mL de ácido acético al 20% y se adiciona 1 mL de la solución B.

Los lípidos con colina presentan un color naranja intenso contra un fondo amarillento.

4. Reacción con ninhidrina: La placa se rocía abundantemente con ninhidrina comercial (Merck 6758) o con ninhidrina al 0.5 % en butanol, secar al aire, el desarrollo de color se da a temperatura ambiente, la placa se puede calentar un poco para acelerar el desarrollo de color. Los aminoácidos, los lípidos con aminoácidos que tengan su grupo amino libre y los lípidos con aminoazúcares se revelan de color violeta en diferentes tonalidades e intensidades.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO 4

CÁLCULO DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALORES PREDICTIVOS

Para determinar estos parámetros se hace un cuadro de correlación:

	Enfermedad presente	Enfermedad ausente	Total
Prueba positiva	A	B	A+B
Prueba negativa	C	D	C+D
Total	A+C	B+D	A+B+C+D

Donde:

A= verdaderos positivos

B= falsos positivos

C= falsos negativos

D= verdaderos negativos

A+C= total de personas enfermas o prevalencia de la enfermedad

B+D= total de personas no enfermas

A+B+C+D=población total

1 Sensibilidad: es la capacidad de la prueba de identificar correctamente en una población, los individuos que presentan la enfermedad estudiada, es decir, los "verdaderos positivos". Se expresa dando la proporción de los sujetos correctamente clasificados como positivos en relación al conjunto de enfermos (A+C).

$$S = A / (A+C) \times 100$$

2. Especificidad: es la capacidad de identificar correctamente aquéllos que no presentan la enfermedad estudiada, es decir, los "verdaderos negativos". Se expresa dando la proporción de los verdaderos negativos (D) en relación al conjunto de no enfermos (B+D).

$$SP = D / (B+D) \times 100$$

3. Valor predictivo de positividad (VPP): probabilidad de identificar los enfermos en un grupo de sujetos considerados como positivos.

$$VPP = A / (A+B) \times 100$$

4. Valor predictivo de negatividad (VPN): Probabilidad de que la enfermedad no exista en un grupo de sujetos considerados como negativos.

$$VPN = D / (C+D) \times 100$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

REFERENCIAS

1. Casal M. Procedimientos en microbiología clínica, En: Diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias. España :Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 1999.
2. Oros A. Evaluación de la respuesta inmune humoral hacia antígenos de bajo peso molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes con tuberculosis activa utilizando la técnica de Western Blot. México: Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, 1999.
3. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993. Para la Prevención y Control de la Tuberculosis en la Atención Primaria a la Salud. México, 2000.
4. Murray P. Microbiología Médica. España: Mosby-Doyma Libros, 1992.
5. Brooks G. Microbiología Médica. 16ª ed. México: El Manual Moderno, 1999.
6. Farga V. Tuberculosis. 2ª ed. Santiago de Chile: Mediterráneo, 1992.
7. Ellner J. The immune response in human tuberculosis- implications for tuberculosis control. J Infect Dis 1997; 176: 1351-1359.
8. Joly V. *Mycobacterium tuberculosis* infections. Curr Opin Infect Dis 1993; 6: 171-178. Finegold S., Baron E. Diagnóstico Microbiológico. 7ª ed. Argentina: Medica Panamericana, 1992.
9. Bautista M. Factores de susceptibilidad genética y genes de respuesta inmunológica ligados al MHC en la tuberculosis. México: Tesis de licenciatura, UNAM, 1993.
10. Kaufmann S. Immunity to intracelular bacteria. Annu Rev Immunol 1993; 11: 129-163.
11. Cabello R. Microbiología y parasitología humana. España: Panamericana, 1993.
12. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Boletín epidemiológico. México; 2001-2002
13. García G. Tuberculosis. En: Enfermedades tropicales en México. Diagnóstico, tratamiento y distribución geográfica. México: INBRE, SSA, 1994.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

14. Barnes P. T-cell responses and cytokines in tuberculosis pathogenesis, protection and control. *American Society for Microbiology* 1994; 1: 417-435
15. Dannenberg J. Delayed type hypersensitivity and cell mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol Today* 1991; 12: 228-233
16. Phadtare J, Belisle J. Human humoral responses to antigens of *Mycobacterium tuberculosis*: immunodominance of high-molecular-mass antigens. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4: 49-56
17. Flynn J, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 93-129
18. Collins HL, Kaufmann SHE. The many faces of host responses to tuberculosis. *Immunology* 2001;103: 1-9
19. Andersen p, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune- based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000; 356:1099-1104
20. Rock G, Hernández R. The pathogenesis of tuberculosis. *Annu Rev Microbiol* 1996; 50: 259-284
21. Gheorghiu M. The role of BCG vaccine in tuberculosis control. *Indian J Pediatr* 1990; 57: 651-655.
22. Pacheco C. Vacuna del bacilo de Calmette y Guerin. En: *Vacunas, Ciencia y Salud*. México: InDRE. SSA. 1994.
23. Brightbill HD, Modlin RL. Toll-like receptors: molecular mechanisms of the mammalian immune response. *Immunology* 2000; 101: 1-10
24. Wigginton J, Kirschner D. A model to predict cell-mediated immune regulatory mechanisms during human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2001; 166: 1951-1967
25. Keane J, Remold H, Kornfeld H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol* 2000; 164: 2016-2020
26. Luna J. Lípidos de *Mycobacterium lepraemurium*. aspectos químicos y biológicos. México: Tesis Doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN, 1991.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

27. Ivanyi J. Serological test for the diagnosis of tuberculosis and leprosy. En: Rapid methods and automation in microbiology and immunology. New York: Springer Verlag, 1991.
28. García E, Giono S. Bacteriología médica diagnóstica. México: IPN, 1993.
29. Ortalo A, Dupont MA, Lemassu A, Andersen A, Gounon P, Daffé M. Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. Microbiology 1995; 141: 1609-1620
30. Makonkawkeyoon S, Makonkawkeyoon L, Songsiri S, Dettrairat S. Evidence for a highly conserved immunoreactive lipid in *Mycobacterium tuberculosis*. Am Rev Respir Dis 1989; 139: 774-778
31. Batoni G, Bottai D, Esin S. Purification, biochemical characterization and immunogenicity of SA5K, a secretion antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. Scand J Immunol 2002; 56: 43-51
32. Maekura R, Okuda Y, Nakagawa M y col. Clinical evaluation of anti-tuberculous glycolipid immunoglobulin G antibody assay for rapid serodiagnosis of pulmonary tuberculosis. J Clin Microbiol 2001; 39:3603-3608
33. Torres M, Herrera T, Villareal H, Rich E, Sada E. Cytokine profiles for peripheral blood lymphocytes from patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts in response to the 30-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immu 1998; 66: 176-180
34. Sorensen AL, Naga S, Houen G, Andersen P, Andersen AB. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 1995; 63: 1710-1717
35. Zhou AT, Ma W, Zhang P, Cole R. Detection of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis patients with the 38-kilodalton antigen from *Mycobacterium tuberculosis* in a rapid membrane- based assay. Clin Diagn Lab Immunol 1996; 3: 337-341
36. Diagbouga S, Fumoux F, Zoubga A, Sanou P, Marchal G. Immunoblot analysis for serodiagnosis of tuberculosis using a 45/47- kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Diagn Lab Immunol 1997; 4:334-338

37. Vera L, Rendon A, Díaz M, Handzel V, Laszlo A. Dot blot assay for detection of anti-diacyltrehalose antibodies in tuberculous patients. Clin Diagn Lab Immunol 1999; 6: 686-689
38. Julian E, Matas L, Ausina V, Luquin M. Detection of lipoarabinomannan antibodies in patients with newly acquired tuberculosis and patients with relapse tuberculosis. J Clin Microbiol 1997; 35:2663-2664
39. Simonney 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
40. Pan J, Fujiwara N, Oka S, Maekura R, Ogura T, Yano I. Anti-cord factor (trehalose 6,6' dimycolate) IgG antibody in tuberculosis patients recognizes mycolic acid subclasses. Microbiol Immunol 1999; 43: 863-869
41. Simonney N, Labrousse H, Ternynck T, Lagrange PH. Recycling of ELISA plates for the serological diagnosis of tuberculosis using a *Mycobacterium*-specific glycolipid antigen. J Immunol Methods 1996; 199: 101-105
42. Garza E, Guerrero M, Tijerina R, Viader JM. Identification of mycobacteria by mycolic acid pattern. Arch Med Res 1998; 29:303-306
43. Maher J, Kronenberg M. The role of CD1 molecules in immune responses to infection. Curr Opin Immunol 1997; 9: 456-461
44. Hunter S, Gaylord H, Brennan P. Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tubercle bacillus. J Biol Chem 1986; 261: 12345-12351
45. Moore V, Myrvick Q, Kato M. Role of cord factor (trehalose-6-6' dimycolate) in allergic granuloma formation in rabbits. Infect Immun 1972; 6: 5-8
46. Ribi E, Anacker R, Barclay W, Brehmer W, Harris L, Leif W, Simmons J. Efficacy of mycobacterial cell walls as a vaccine against airborne tuberculosis in the rhesus monkey. J Infect Dis; 123: 520-527
47. Yarkoni E, Bekierkunst A. Nonspecific resistance against infection with *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium* induced in mice by cord factor (trehalose 6,6'-dymycolate) and its analogues. Infect Immun 1976; 14: 1125-1129

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

48. Draper P. The micoside capsule of *Mycobacterium avium*. J Gen Microbiol 1974; 83: 431-436
49. Goren M, Brennan P. Mycobacterial lipids: chemistry and biologic activities. En: Youmans G. Tuberculosis. Philadelphia and Saunders, U.S.A. 1979
50. Goren M. Lipids of putative relevance to virulence in *Mycobacterium tuberculosis*: correlacion of virulence with elaboration of sulfatides and strongly acidic lipids. Infect Immun 1974; 9: 140-146
51. Escobar Gutiérrez A, Amezcua Chavarria ME, Pastén Sánchez S, Ramírez Casanova E, Cázares JV, Granados G, Loo Méndez E, Cicero R. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) with mycobacterial crude antigens for seroepidemiological diagnosis of active tuberculosis. Int J Lepr 1995; 64: 417-427.
52. Rosat JP, Grant EP, Beckman E y col. CD1-restricted microbial lipid antigen-specific recognition found in the CD8+ alpha beta T-cell pool. J Immunol 1999; 162: 366-371
53. Banchereau J, Steiman M. Dendritic cell and the control of immunity. Nature 1998; 392: 245-252
54. Flores R. In vivo maturation and migration of dendritic cells. Immunology 2001; 102: 255-262
55. Hiromatsu K, Dascher C, LeClair K, Sugita M, Furlung S, Brenner M, Porcelli S. Induction of CD1-restricted immune responses in guinea pigs by immunization with mycobacterial lipid antigens. J Immunology 2002; 169:330-339
56. Park S, Bendelac A. CD1-restricted T-cell responses and microbial infection. Nature 2000; 406: 788-791
57. Zeng Z, Castaño A, Segelke B, Stura E, Peterson P, Wilson I. Crystal structure of mouse CD1: an MHC- like fold with a large hydrophobic binding groove. Science 1997; 277: 339-345
58. Sugita M, Moody DB, Jackman RM y col. CD1- a new paradigm for antigen presentation and T-cell activation. Clin Immunol Immunopathol 1998; 87:8-14.

59. Ernst W, Maher J, Cho S y col. Molecular interaction of CD1b with lipoglycan antigens. *Immunity* 1998; 8: 331-340
60. Kovacs E. Fibrogenic cytokines: The role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunol Today* 1999; 12: 17-23.
61. Singh IG, Mukherjee R, Talwar GP, Kaufmann SH. In vitro characterization of T-cell from *Mycobacterium W*-vaccinated mice. *Infect Immun* 1992; 60: 257-263
62. Lara MM. Detección de anticuerpos contra partículas lipídicas en el suero de pacientes con síndrome de antifosfolípidos. México: Tesis de Maestría. IPN, 1999.
63. Lyashchenko K, Colangeli R, Houde M, Jahdali H, Menzies D, Gennaro ML. Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infect Immun* 1998; 66: 3936-3940.
64. Baeza I, Aguilar L, Ibáñez M, Wong C. Papel estructural y funcional de los lípidos en las membranas biológicas. En: *Mensaje Bioquímico*. México: IPN, 1998: vol. 12
65. Aguilar L. Determinación de asociaciones lipídicas de NO-BICAPA en liposomas y membranas celulares con anticuerpos monoclonales. México: Tesis Doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN, 1997.
66. Finegold S, Baron E. Diagnóstico microbiológico. 7ª.ed. Argentina: Médica Panamericana, 1992
67. López L. Eficacia de la PCR para el diagnóstico de tuberculosis cutánea. México: Especialización en dermatología. UNAM, 2002
68. Escobar-Gutiérrez A. Inmunidad y vacunas. En: *Vacunas ciencia y salud*. México: Secretaría de Salud, 1992
69. Singh IG, Mukherjee R, Talwar GP. Resistance to intravenous inoculation of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv in mice of different inbred strains following immunization with a leprosy vaccine based of *Mycobacterium W*. *Vaccine* 1991; 9: 10-14
70. Szoka F, Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci* 1978; 75: 4194-4198.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

71. Clausen J. Técnicas inmunoenzimáticas para la identificación de macromoléculas. México:El Manual Moderno:1975:111
72. Dzandu JK. Detection of erythrocyts membrane proteins, sialoglycoproteins, and lipids in the same polyacrylamide gel using a double-staining technique. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81: 1733-1737
73. Morrisey JH. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels. Anal Biochem 1981; 117: 307-310
74. Fordham C, Vuola J. New vaccines for the prevention of tuberculosis. Vaccines 2002; 35: 465-474
75. González Mateos S. Evaluación de 2 técnicas inmunoenzimáticas para el diagnóstico temprano de la meningitis tuberculosa en muestras de líquido cefalorraquídeo. México: Tesis de Licenciatura, UNAM, 1996.
76. González S. Infectología clínica pediátrica. 3ª ed. México: Trillas, 1987.
77. Mc Naughton M. Disseminated tuberculosis: a presumptive diagnosis. Hosp Pract 1993; 15: 63-78.
78. Noordhoek G. Sensivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. J Clin Microbiol 1994; 32: 277-284.
79. Marques de Cantu MJ. Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas. México: Mc Graw Hill Interamericana de México, 1991
80. Navarro R. Introducción a la bioestadística. Análisis de variables binarias. México: Mc Graw Hill, 1988
81. Casares J, Casanovas J, Foz A y col. Diccionario terminológico de ciencias médicas. 11ª ed. México: Salvat, 1997
82. Méndez R, Namihira L, Moreno L, Sosa C. El protocolo de Investigación: Lineamientos para su elaboración y análisis. México: Trillas, 1984
83. Schelesselmon J. Case-control studies. Design, conduct, analysis. Nueva York: Oxford Univ Press, 1982
84. Rojas O. Inmunología (de memoria). 2ª ed. México: Panamericana, 2001
85. Meza A, Vázquez R. Técnicas inmunológicas actualizadas. México: INDRE-DGETI, 1997.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

86. Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Manual de prácticas de Inmunología. México:IPN, 1983
87. Laniado R, Enríquez L, Licea A. Diagnóstico de tuberculosis empleando un sistema no comercial de reacción en cadena de la polimerasa. Rev Inst Nat Enf Resp Mex 2001; 14:22-26
88. Olvera R. Farmacorresistencia secundaria en tuberculosis. Tendencia en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Rev Inst Nat Enf Resp Mex 2001; 14:151-159
89. Sepkowitz K. Tuberculosis control in the 21st century. Emerg Infect Dis 2001; 7:259-262
90. Wing S. Preventing nosocomial *Mycobacterium tuberculosis* transmission in international settings. Emerg Infect Dis 2001; 7:245-248

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN