

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**“ESTANDARIZACION DEL METODO DE ELISA INDIRECTO USANDO  
ANTIGENOS GLICOLIPIDICOS DIFERENCIALES COMO AYUDA EN EL  
DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS PULMONAR”**

Informe final de Tesis



Presentado por

Héctor Alfonso Cuevas Meckler

Para optar al Título de  
Químico Biólogo

Guatemala, octubre de 1999

**JUNTA DIRECTIVA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA  
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

<b>DECANA</b>	<b>Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta</b>
<b>SECRETARIO</b>	<b>Lic. Oscar Federico Nave Herrera</b>
<b>VOCAL I</b>	<b>Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto</b>
<b>VOCAL II</b>	<b>Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda</b>
<b>VOCAL III</b>	<b>Lic. Rodrigo Herrera San José</b>
<b>VOCAL IV</b>	<b>Br. David Estuardo Delgado González</b>
<b>VOCAL V</b>	<b>Br. Estuardo Solórzano Lemus</b>

## ACTO QUE DEDICO

**A DIOS**, nuestro Padre celestial, por haberme concedido el don de la vida y por amarme tanto sin yo merecerlo.

**A LA VIRGENCITA MARIA**, por ser mi guía, consuelo y apoyo celestial durante toda mi vida.

**A MI MAMI**, Dora Gladys Meckler, por tu amor, sacrificios, comprensión, apoyo y ayuda incondicionales y por ser madre y padre a la vez ("padre no es quien engendra sino quien educa"). ¡Todo lo que soy y logre ser en la vida, lo debo a tí!

**A MIS ABUELITOS**, mami Rosita y papi Jorge, por todo el amor que siempre me han brindado y por educarme y guiarme en mi camino. Este triunfo es un pequeñísimo reconocimiento al amor que me demuestran.

**A MI HERMANO**, Yuri Erwin, por todo el cariño, ayuda, apoyo, comprensión y amistad que siempre me has tenido. ¡Gracias por ser un hermano excepcional!. Este triunfo también es para vos.

**A MI PROMETIDA**, Licda. Paola Oliva Mérida, por todo tu amor, confianza, apoyo y comprensión. ¡Gracias al cielo por regalarme a una mujer como tú y gracias infinitas a tí por ser mi dulce razón de vivir, mi esperanza y por permitirme compartir contigo el resto de tu vida!. Todos mis triunfos son por y para tí.

**A MIS TIOS**, Horacio y Amarilis, Gustavo y Rosita, Walter Quiñónez. ¡Gracias por todo el cariño y apoyo que me han brindado siempre!

**A MIS PRIMOS**, Karin y Arturo, Jorge Estuardo y Lucky, Leslie y Byron, Nancy, Moniquita, Mirza Mariela y Tito, Omar Alexis, Mildred Michelle, Gustavo Adolfo. ¡Gracias por todo el apoyo incondicional y por todo el cariño que me demuestran!

**A MIS SOBRINOS**, Christian Andrés, Luis Pedro, José Rodrigo, Melanie, Ana Gabriela, Pablo Augusto, María Paula y mi(s) sobrinito(s)(as) que "vienen en camino", por ser cada uno una luz de alegría e ilusión.

**A MI NUEVA FAMILIA**, Guillermo Oliva G., Irmita de Oliva, Silvia Oliva Mérida y Guillermo Oliva Mérida por todo el cariño que me han demostrado. ¡Gracias por abrirme las puertas de su casa y de su corazón!

**A TODOS LOS MIEMBROS DE CADA UNA DE LAS FAMILIAS,** Mérida y Oliva,  
por todo el cariño que me han demostrado. ¡Gracias por hacerme sentir  
siempre como en familia!

**A MIS CONCUÑOS,** Adonái y Magie. ¡Por ser personas super especiales!

**A MIS AMIGOS DE COLEGIO Y UNIVERSIDAD,** muy especialmente a Octavio,  
por ser mi amigo del alma y apoyo en todo momento. A Neto, Francisco,  
Angela, Erick Martínez, Milton Salguero, con quienes compartí angustias,  
fracasos y éxitos.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A MI ASESORA**, Licda. Ingrid V. Tabarini, por toda la ayuda, confianza, sabiduría y valiosos consejos aportados a este trabajo de investigación.

**A LA LICDA. MARIA LUISA GARCIA DE LOPEZ**, por todo su apoyo, ayuda y conocimientos científicos y literarios brindados a esta investigación; muy especialmente por su colaboración invaluable en la obtención del financiamiento económico, de materiales y reactivos otorgados a esta investigación y por la recolección de muestras de pacientes en la Región Occidental.

**AL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUIMICAS Y BIOLÓGICAS (IIQB)**, por confiar en la presente investigación y por el financiamiento económico otorgado.

**AL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**, en especial a la Licda. Heidi Logeman por autorizarme el uso de las instalaciones, material y equipo empleados durante la investigación.

**AL LABORATORIO MICROBIOLÓGICO DE REFERENCIA (LAMIR)**, en especial a la Licda. Karin Herrera, por autorizarme el uso de las instalaciones y equipo empleados durante la investigación.

**AL LABORATORIO DE INVESTIGACIONES DE LA ESCUELA DE BIOLOGIA**, en especial a la Licda. Carlota Monroy, por autorizarme el uso de equipo y el obsequio de reactivos utilizados en el montaje y realización de la prueba de ELISA.

**AL LABORATORIO DE FÍSICOQUÍMICA**, en especial al Lic. Klee, por prestarme el equipo y materiales necesarios utilizados en el montaje de la técnica cromatográfica empleada en la presente investigación.

**AL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA**, en especial al Dr. Rubén Velásquez, por autorizarme el uso de equipo y materiales utilizados durante la investigación y por sus consejos sobre la separación y recuperación de glicolípidos micobacterianos.

**AL LABORATORIO DE ANÁLISIS DE MEDICAMENTOS**, en especial al Lic. Rolando López y Lic. Girón, por autorizarme el préstamo de materiales y reactivos utilizados durante la presente investigación.

**AL DEPARTAMENTO DE CITOLOGIA**, en especial al Lic. Armando Cáceres, Licda. Vivian Matta, Licda. Margarita Paz de Ramírez y Licda. María Eugenia Paredes, por el apoyo brindado en materiales y equipo utilizados durante el montaje de la prueba de ELISA.

**A LA LICDA. BLANCA SAMAYOA**, por sus consejos y conocimientos científicos y literarios sobre la Tuberculosis.

**AL PERSONAL DE SECRETARIA DE LA ESCUELA DE QUIMICA BIOLÓGICA Y DECANATURA**, en especial a María Eugenia Garzaro de Rivas, Delia de Yela y Ana María de Jiménez, por toda la paciencia y ayuda desinteresada que me brindaron durante el transcurso de la presente investigación. ¡Un millón de gracias!. De igual manera, infinitas gracias a Lucy Santis, por su gran desinterés y ayuda durante toda mi carrera.

**AL PERSONAL DE APOYO DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA Y LAMIR**, en especial a Julio César Maas, Olga Escobar, Consuelo de Estrada y Olga Gabriel, por toda la ayuda que me brindaron en la realización de la presente investigación.

**A TODAS Y CADA UNA DE LAS PERSONAS** que desinteresadamente me apoyaron durante la presente investigación, en especial a la Licda. Inf. Dalia Lau Bonilla, por su invaluable colaboración en la recolección de muestras de pacientes en la Región Occidental.

**A LA COMPAÑÍA MERCK C.A.**, en especial al Lic. Rafael Elgueta, por haberme brindado desinteresadamente el kit de PATHOZYME MYCO utilizado como prueba estándar en esta investigación.

## RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa con profundas implicaciones sociales, económicas y de salud que aún en la actualidad no se ha podido erradicar y que continúa en aumento debido a la epidemia del SIDA como factor predisponente para dicha patología.

La alta prevalencia mundial de esta enfermedad es alarmante y en nuestro país se reportan índices de morbi-mortalidad incrementados hasta en un 54 por ciento en los últimos nueve años, mientras que las tasas de micobacterias multirresistentes a los tratamientos nuevos y convencionales también tienden a ir en aumento.

El diagnóstico rápido y temprano de esta patología favorecería el tratamiento y curación del paciente, por lo que el presente trabajo tuvo como objetivo primordial el desarrollo y estandarización de la técnica de ELISA indirecto como una ayuda diagnóstica serológica.

Dicha técnica se basa en la detección de Anticuerpos antimicobacterianos en muestras de suero de pacientes con tuberculosis confirmada por cultivo y microscopía, tratados con agentes disociantes de complejos inmunes para aumentar la sensibilidad de la prueba. Se compararon dos agentes disociantes utilizados en estudios anteriores (de afecciones tuberculosas y no tuberculosas) para determinar el que presenta mayor índice de disociación.

Los resultados mostraron que la prueba de ELISA indirecto con Antígenos micobacterianos diferenciales tiene la capacidad de detectar hasta 40 ng/mL de Anticuerpo y posee una sensibilidad del 88 por ciento y una especificidad del 85 por ciento, lo que indica su utilidad como prueba diagnóstica serológica rápida; además, comparada con la prueba de ELISA control (Pathozyme Myco de MERCK S.A), la prueba montada posee una sensibilidad y especificidad del 98 por ciento.

El tratamiento de las muestras de suero con los agentes disociantes A (cloruro de glicina) y B (SDS diez por ciento) incrementaron la sensibilidad de la

prueba hasta un 35 por ciento; lo que indica su utilidad en el diagnóstico serológico de patologías que se conoce desarrollan complejos inmunes.



## INDICE

	PAGINA
1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	3
3. JUSTIFICACION	30
4. OBJETIVOS	31
5. HIPOTESIS	32
6. MATERIALES Y METODOS	33
7. RECURSOS ECONOMICOS	38
8. RESULTADOS	39
9. DISCUSION DE RESULTADOS	40
10. CONCLUSIONES	42
11. RECOMENDACIONES	43

## 1. INTRODUCCION

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa de larga duración que involucra principalmente al sistema respiratorio, pero que puede afectar a otros órganos y sistemas del cuerpo humano.

Su principal agente causal es *Mycobacterium tuberculosis* y en los últimos años, micobacterias no tuberculosas ligadas al SIDA como *Mycobacterium avium-intracellulare* y *Mycobacterium kansasii*, entre otras.

La alta prevalencia mundial de esta patología es alarmante, según las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que indican que durante la última década del presente siglo habrán 90 millones de nuevos casos que producirán un total de 30 millones de defunciones, el equivalente a un cuarto de todas las causas de defunción prevenibles en adultos.

En Guatemala, los índices de morbi-mortalidad por esta enfermedad reportan 539 defunciones para el año de 1994 y un aumento de más del 54 por ciento de nuevos casos de 1986 a 1995.

Además de las profundas implicaciones sociales y de salud que la tuberculosis conlleva, ésta tiene un gran efecto en la economía de las naciones porque el estrato etareo mayormente afectado es la población activa.

Tales motivos obligan a las diferentes instituciones de salud a proporcionar un mejor y más rápido diagnóstico de la enfermedad, así como la aplicación de esquemas de prevención y tratamiento más eficaces.

El diagnóstico conclusivo de la patología se basa en el aislamiento e identificación del agente causal, procedimiento que tarda de ocho a diez

semanas. Debido a lo prolongado de este método, se han tratado de desarrollar pruebas rápidas lo suficientemente específicas para el diagnóstico, con el fin de administrar el tratamiento adecuado en el menor tiempo posible.

La mayoría de métodos rápidos se basa en reacciones inmunoenzimáticas (ELISA) para la detección de antígenos o anticuerpos, aunque los mayormente utilizados son los que detectan antígeno, debido a la formación de complejos anticuerpo-antígeno que reducen los niveles séricos de los primeros.

La prueba de ELISA que se pretende establecer detectará la presencia de anticuerpos anti-*M. tuberculosis* a partir de muestras de suero ( de pacientes con tuberculosis confirmada por cultivo y BK de esputo) tratadas para disociar los complejos antígeno-anticuerpo, con el fin de obtener una mayor concentración de estos últimos. Este método utilizará la fracción glicolípídica de la pared de la micobacteria para montar una prueba diferencial entre las diversas especies que producen infecciones típicas de tuberculosis. Además, pretenderá diferenciar entre nocardiosis y tuberculosis pulmonares, ya que tanto las especies de *Nocardia* como las de *Mycobacterium* poseen características similares en cuanto a las propiedades de la pared y al cuadro anatómico-clínico-patológico pulmonar que producen.

En el montaje de la prueba también se utilizarán sueros de personas sanas y de pacientes con otras afecciones pulmonares similares a la tuberculosis, entre ellas la histoplasmosis y coccidioidomicosis, para establecer la especificidad y sensibilidad del método.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. TUBERCULOSIS

Es una enfermedad infecto-contagiosa crónica, que actualmente es una de las principales causas de defunción en muchos países en vías de desarrollo (1-4).

Reconocida en esqueletos de hombres de la prehistoria y en huesos de momias egipcias de hace 3,000 años, la tuberculosis ha sido una plaga para la humanidad desde la antigüedad (1,5). Sin embargo, esta enfermedad se hizo epidémica con el advenimiento de la Revolución Industrial al proporcionar las condiciones habitacionales de hacinamiento que favorecieron su diseminación, produciendo la cuarta parte de muertes en adultos en Europa durante la primera mitad del siglo XIX (3).

Hacia 1834 se empleó el término *Tuberculosis* para describir la característica anatómica única de la enfermedad de producir lesiones en forma de tubérculos (3-8).

A pesar de que fue Villemin en 1865 quien demostró la naturaleza de la enfermedad al infectar animales de laboratorio con tejido enfermo, no fue sino hasta 1882 cuando el microbiólogo alemán Robert Koch aisló y describió al agente causal, lo asoció con la enfermedad clínica y produjo infección en animales de experimentación, recuperando posteriormente al microorganismo (1,3,5-7).

La tuberculosis se presenta principalmente a nivel pulmonar, aunque puede involucrar a otros órganos y tejidos (2). El principal agente causal de la tuberculosis humana es *Mycobacterium tuberculosis* y, raramente en Estados Unidos de Norteamérica, *M. bovis*; aunque actualmente por la epidemia del SIDA y otras enfermedades inmunosupresoras, también se han aislado micobacterias no tuberculosas como agentes causales (2,4,8).

La tuberculosis es una enfermedad multicausal, ya que además de la infección por la micobacteria, el desarrollo de la patología está aunada a factores como desnutrición, pobreza, hacinamiento, malos hábitos higiénicos, ignorancia, etc (9).

### 2.1.1 TUBERCULOSIS PULMONAR

Es un proceso infeccioso agudo o crónico del pulmón, con lesiones destructivas y cambios granulomatosos de evolución crónica (9).

La tuberculosis pulmonar se caracteriza clínicamente por un equilibrio durante toda la vida entre el hospedero y su infección, pudiendo reactivarse los focos de infección en cualquier momento (10).

En Guatemala, el principal agente causal es *M. tuberculosis* (99 por ciento de los casos), según un estudio realizado por Ramírez García (5). Las áreas de mayor incidencia de la enfermedad en nuestro país son los departamentos de Escuintla, Sacatepéquez, Chimaltenango, Totonicapán y Quetzaltenango y municipios aledaños a la ciudad capital, mientras que en el resto de la República la incidencia es menor (9).

#### 2.1.1.1. Transmisión y Patogénesis

La enfermedad se transmite directamente por partículas ("gotitas", de diámetro menor de cinco micras - $\mu\text{m}$ -) que se forman cuando el material infeccioso es descargado al ambiente por una persona con lesiones ulcerativas activas en el pulmón al momento de hablar, estornudar, reír, cantar o toser (4,6,8,11).

Aproximadamente la mitad de las gotitas producidas al toser quedan suspendidas en el ambiente después de 30 minutos, mientras que sólo el seis por ciento de aquellas partículas producidas al hablar se mantienen suspendidas durante dicho período (8).

Se sugiere que una persona no infectada tiene el 50 por ciento de probabilidad de adquirir la infección al inhalar diez mil pies cúbicos de aire de una

persona con enfermedad no tratada. Esto representa seis meses de ocho horas de exposición diaria o dos meses de 24 horas de exposición diaria (6).

La puerta de entrada de la infección es usualmente las vías respiratorias altas que posteriormente colonizan las vías bajas, por lo que el pulmón es el principal órgano afectado. Existe evidencia que sugiere que la predilección de ***M. tuberculosis*** por el tejido pulmonar se relaciona directamente a su requerimiento de oxígeno para su crecimiento (4).

#### 2.1.1.2. Patología

Los bacilos tuberculosos que llegan hasta los alveolos o ductos alveolares son fagocitados por macrófagos, dentro de los cuales se multiplican (incluso tan rápido como en un medio de cultivo), gracias a sus mecanismos de evasión (inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma y resistencia a enzimas lisosomales y/o metabolitos oxigenados) (2,4,8,12,14,20,25,30-36). Se produce, entonces, una reacción local primaria caracterizada por vasodilatación de los capilares alveolares y aumento moderado del tamaño de las células que conforman el alveolo (8)

##### 2.1.1.2.1. Inflamación:

Los alveolos se llenan con fibrina, macrófagos descamados, algunos polimorfonucleares (PMN) y relativamente pocos bacilos.

La lesión inflamatoria puede permanecer de tamaño microscópico o aumentar hasta ser visible por Rayos X.

El bacilo tuberculoso llega a los nódulos linfáticos, de los cuales pasa al torrente sanguíneo para implantarse en cualquier parte del cuerpo, desarrollando focos inflamatorios metastásicos en varios órganos, incluyendo a los pulmones (8).

##### 2.1.1.2.2. Formación del tubérculo:

Es la característica primaria que indica infección tuberculosa.

Consiste en tres zonas: una central con células gigantes multinucleadas de Langhans, seguida de una zona media de células epitelioides y una zona

periférica de linfocitos, monocitos y fibroblastos. Estos tubérculos contienen pocos bacilos, los que se encuentran principalmente dentro de las células epitelioides (8).

Histológicamente el tubérculo no es fácilmente distinguible de otras reacciones granulomatosas provocadas por hongos o por cuerpo extraño, sífilis o sarcoidosis (6,8,10).

#### 2.1.1.2.3. Caseificación:

Es la segunda característica de la tuberculosis. Se presenta aproximadamente seis semanas después de la implantación inicial del bacilo.

Se caracteriza por la desintegración de las células del hospedero y del bacilo para convertirse en una masa sólida, homogénea y coagulada que persiste por muchos años (8,10).

#### 2.1.1.3. Manifestaciones clínicas

El inicio es insidioso, con síntomas vagos que pueden permanecer de dos a cuatro semanas. Los síntomas generales son pleuresía y dolores torácicos vagos, con frecuencia acompañados de tos, fiebre vespertina, fatiga, pérdida de peso, astenia y anorexia; después se presenta anemia y en las mujeres en edad reproductiva, amenorrea secundaria (1,6,8,9).

Posteriormente la fiebre se presenta en las tardes sin un patrón específico, mientras que la tos discreta y sin espectoración se hace constante, con esputo purulento que luego se hace hemoptoico de grado variable, que puede terminar con la vida del paciente por ahogamiento y obstrucción de las vías respiratorias(8,9).

Con frecuencia existe hepato y esplenomegalia, aumento del tamaño de los ganglios linfáticos y la presencia de granulomas cicatrizales y queloides en la piel (9).

#### 2.1.1.4. Formas radiológicas

Se utiliza para clasificar las formas que pueden desarrollarse en el pulmón y son:

- cavitaria o cavernosa
- neumónica
- bronconeumónica
- pleural y
- miliar

De éstas, la forma miliar es una de las más graves ya que en ella puede ocurrir diseminación hematológica e implantación del microorganismo en diversos órganos (meninges, sistema nervioso central, hígado, riñones, etc.) (9).

### 2.1.2. TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR

Cualquier órgano del cuerpo puede infectarse de forma secundaria como resultado de la diseminación intraluminal, extensión directa y diseminación linfohematológica. El foco extrapulmonar resultante puede permanecer inactivo por muchos años sin sintomatología alguna, o producir una enfermedad dramática de rápido progreso (8).

La inoculación a través de la piel ocurre ocasionalmente, produciendo el complejo de Ghon cutáneo.

El hígado y el bazo pueden infectarse por vía hematológica, aunque raramente desarrollan la enfermedad, debido quizás a la resistencia innata del sistema retículoendotelial o a la baja tensión de oxígeno, o a ambos factores (8).

#### 2.1.2.1. Manifestaciones clínicas

La tuberculosis del sistema nervioso central produce meningitis y si llega a involucrar canales vasculares, puede producir arteritis congestiva e infarto cerebral.

En la tuberculosis del tracto genitourinario puede ocurrir esterilidad tanto en mujeres como en hombres, ya que al progresar la enfermedad se involucran los ovarios, trompas de Falopio, endometrio, próstata, vesículas seminales y epidídimo.



La tuberculosis del tracto gastrointestinal se produce por la ingestión de alimentos contaminados y de esputo o por vía hematógica. Sus síntomas son vagos y pueden confundirse con neoplasia intestinal o con enfermedad de Crohn (8,13).

En la pericarditis tuberculosa el tamponamiento cardíaco produce usualmente la muerte del paciente.

En la tuberculosis ósea se observa artritis monoarticular insidiosa y posteriormente, la inmovilización de las áreas afectadas (8).

## 2.2. AGENTE CAUSAL

El principal agente causal de la tuberculosis humana es *M. tuberculosis*, aunque en raras ocasiones la enfermedad puede ser causada por *M. bovis* (2,10). Con el advenimiento de la epidemia del SIDA se han aislado micobacterias no tuberculosas como causantes de enfermedad típica de aquélla; entre ellas: *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. africanum*, *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. xenopi* y *M. szulgai* (2,4-6,8,14-20).

Las micobacterias se encuentran en la Sección 16 del Manual de Bergey; pertenecen al Orden *Actinomycetales*, Familia *Mycobacteriaceae* y Género *Mycobacterium* (5).

En 1883, Zoppf le dió el nombre de *Bacterium tuberculosis* al bacilo tuberculoso, el cual fue posteriormente cambiado a *Mycobacterium tuberculosis* en 1886 por Lehmann y Neumann, debido quizás a la naturaleza de lento crecimiento y estructura rugosa que presenta en los medios de cultivo, proporcionándole apariencia de hongo (21).

Las micobacterias, en general, son bacilos delgados, rectos o curvos que miden de 0.3-0.6 por 0.5-4.0  $\mu\text{m}$ . Se encuentran solos o aglomerados y en ocasiones presentan ramificaciones y formas filamentosas. Son aerobias

estrictas y derivan su energía de la oxidación de muchos compuestos sencillos de carbono. El aumento de la tensión de anhídrido carbónico estimula su crecimiento. Tienen elevada resistencia a los desinfectantes o agentes químicos debido a la naturaleza hidrófoba de su superficie celular, aunque son destruidos por la pasteurización y esterilización por calor. Son resistentes a la desecación y pueden sobrevivir durante largos períodos en esputos secos u otros líquidos corporales. No forman esporas, son inmóviles y de crecimiento lento (las más rápidas crecen de dos a tres días, mientras que otras lo hacen de seis a ocho semanas). Por sus características de tinción se les conoce como bacilos alcohol-ácido resistentes ya que soportan la decoloración con alcohol-ácido, debido a su alto contenido de material lipídico (ácidos grasos, ceras y lípidos complejos) en su pared celular (1,3,5).

### 2.2.1. ESTRUCTURA

Tanto en los tejidos animales como en medios de cultivo, se presentan como bacilos sin cilios ni cápsula (2,5,8,21,22).

Su pared se encuentra constituida principalmente por lípidos, proteínas y polisacáridos (2). Su porción externa consiste en glicolípidos fenólicos, ácidos micólicos, arabinogalactán, peptidoglicán, manofosfoinositides y lipoarabinomanán. Este último está unido a la membrana celular por fosfatidilinositol y es una de las piezas claves en la interacción del microorganismo con su célula hospedera (25).

#### 2.2.1.1. Lípidos

Presentes en alta cantidad, corresponden a un 60 por ciento del peso seco de la pared micobacteriana. Está formada por un peptidoglicano y un polímero de arabinosa-galactano, cuyos residuos están esterificados por una molécula de ácido micólico (5).

Se encuentran unidos en gran proporción a proteínas y polisacáridos, formando las lipoproteínas y glicolípidos que se encuentran firmemente unidos a

la parte externa de la pared bacteriana. Las lipoproteínas o glicoproteínas se asocian al complejo micolato-arabinogalactano-peptidoglicano y son el constituyente esencial en la actividad de tuberculina (5).

La localización de los lípidos es la que le confiere las siguientes propiedades:

- ácidosresistencia e impermeabilidad a tinciones,
- resistencia a la destrucción por ácidos y álcalis,
- carácter hidrófobo en medios de cultivo líquido, ya que se adhieren unas a otras y flotan en la superficie,
- lento crecimiento por la dificultad en el paso de nutrientes al interior celular,
- resistencia a la digestión intracelular por los macrófagos y a la actividad bactericida del complemento,
- posiblemente sean los responsables de las reacciones celulares de los tejidos hacia el microorganismo (2).

#### 2.2.1.2. Polisacáridos

Son los componentes más abundantes en los filtrados y extractos de micobacterias. La mayoría (glucán, manán, arabinomanán y arabinogalactán) se encuentran unidos químicamente con los lípidos presentes en la pared celular, mientras que en la Cera D forman el complejo ácido micólico-arabinogalactán (2,23).

#### 2.2.1.3. Fracción proteica

Es la fracción responsable de la respuesta inmune humoral durante la enfermedad. Las proteínas unidas a los lípidos tienen la capacidad de inducir la respuesta de tuberculina (2).

#### 2.2.1.4. Ácidos micólicos

Son ácidos grasos no saturados, de cadena larga que son sintetizados a partir de precursores similares y por mecanismos parecidos para los géneros ***Mycobacterium***, ***Nocardia*** y ***Corynebacterium***.

Se caracterizan por poseer ácidos grasos complejos beta-hidroxilados de alto peso molecular con una cadena larga alquil en posición alfa (24).

Se encuentran principalmente en la Cera D y en los glicolípidos del bacilo.

## 2.2.2. DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA

Entre los principales factores de virulencia y patogenicidad del bacilo tuberculoso se encuentran los siguientes:

### 2.2.2.1. Factor Cordón

Corresponde al ácido 6,6'-dimicoliltrehalosa (3,5,23) y es el responsable de la virulencia del bacilo y del crecimiento en forma de serpentinas (cordones) en el cultivo. Ver figura ANEXO 1

Entre las evidencias que relacionan al factor cordón con la virulencia de las cepas de micobacterias, las más importantes son:

- inhibe la migración de los leucocitos polimorfonucleares normales *in vitro* y mata al ratón tras la inoculación subcutánea de diez microgramos - $\mu\text{g}$ -,
- es más abundante en las cepas virulentas,
- el bacilo obtenido después de pases sucesivos en animales o cultivos jóvenes es más virulento y posee un mayor contenido del ácido micólico que aquellas cepas de cultivos viejos (2).

### 2.2.2.2. Sulfátidos o Sulfolípidos

Son un grupo de glicolípidos que contienen un grupo ácido sulfónico (5,23) situados en la periferia de la pared del bacilo, responsables de la reactividad con rojo neutro asociada a cepas virulentas (22). Evitan la formación del fagolisosoma en los macrófagos que los fagocitan y la consecuente exposición del bacilo a las hidrolasas lisosomales. De igual manera, aumenta la toxicidad del factor cordón (2).

### 2.2.2.3. Cera D

Micósido de alto peso molecular que contiene ácidos micólicos y un glucopéptido formado por polímeros de hexosas y hexosaminas (23). Ver figura ANEXO 2

Algunas de sus propiedades son las siguientes:

- en emulsión estimula la inmunogenicidad de diferentes antígenos añadidos; y
- una mezcla con proteínas del bacilo tuberculoso induce la hipersensibilidad tardía de la tuberculina (2,22,23).

### 2.2.3. CRECIMIENTO

***M. tuberculosis*** es un aerobio estricto que necesita una atmósfera similar a la alveolar, con una presión parcial de oxígeno del 40-50 por ciento y una presión parcial de dióxido de carbono del cinco al diez por ciento (2,8). La humedad es esencial para su crecimiento *in vitro*. La temperatura óptima de crecimiento es 37°C, con un rango de 32 a 39°C. Su período de división celular es de 18-24 hrs (8), por lo que las colonias se hacen visibles en los medios de cultivo a las tres o cuatro semanas.

Básicamente ***M. tuberculosis*** tiene la capacidad de desarrollarse en medios de cultivo con requerimientos nutricionales simples compuestos de sales minerales amónicas como fuente de nitrógeno y glicerol (en una concentración del cinco por ciento) o acetato como fuentes de carbono y donador de electrones (2,7,8). Usualmente a los medios de cultivo se les agrega glucosa y asparagina o una mezcla de aminoácidos para estimular el crecimiento e incrementar su velocidad (2,23).

Existen dos clases de medios de cultivo utilizados comercialmente:

- uno complejo hecho a base de huevo o yemas de huevo (proporcionan lípidos y ácidos grasos, principalmente de cadena larga, que favorecen el crecimiento) (2,7) y extracto de papa, como los medios de Löwenstein-Jensen o el de la Sociedad Americana Trudeau; y

- medios semisintéticos con ácidos oleico y albúmina, como el medio Middlebrook 7H-10 y 7H-11 (8).

Los primeros se utilizan principalmente para el primocultivo o aislamiento de las micobacterias, mientras que los segundos se emplean como medios de resiembra y en las pruebas de susceptibilidad antibiótica y de identificación.

### 2.3. RESPUESTA INMUNE

La función primaria de la respuesta inmune es discriminar entre lo propio y lo ajeno, con el fin de eliminar lo último (26).

La respuesta inmune que se monta contra infecciones bacterianas está mediada por mecanismos celulares (linfocitos T y macrófagos, principalmente) y humorales (linfocitos B). Básicamente, existen tres tipos de inmunidad contra bacterias, dependiendo de las características de éstas, así:

- inmunidad contra bacterias toxigénicas o que producen y liberan toxinas,
- inmunidad contra bacterias encapsuladas, e
- inmunidad contra bacterias intracelulares, como *M. tuberculosis*; en cuyo caso, la forma básica de defensa es la inmunidad celular mediada por macrófagos activados por linfocitos específicos y sus productos.

#### 2.3.1. INMUNOPATOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS

La inmunopatología de la tuberculosis, así como la de otros patógenos intracelulares obligados, aún no se comprende perfectamente. Sin embargo, se sabe que la respuesta inmune que se monta contra *M. tuberculosis* (y contra todas las micobacterias) produce la destrucción del tejido infectado en el hospedero y el surgimiento de resistencia e inmunidad contra el microorganismo (10).

La micobacteria en sí, o sus productos proteicos (principalmente el lipoarabinomano o LAM), estimulan a los macrófagos para liberar IL-1beta y TNFalfa. La estimulación por estas citocinas es, probablemente, un evento

crítico en la atracción de linfocitos a los sitios de inflamación, la diferenciación de los fagocitos en células epiteloides y la formación del granuloma (25).

La interleucina IL-1beta producida por los macrófagos es quimiotáctica para linfocitos y activa a las células T CD4+, haciéndolas proliferar y liberar interferón gamma (IFNgamma). Asimismo, induce la producción de IL-3 e IL-6 por los monocitos, iniciando la siguiente etapa en la infección micobacteriana.

De los dos tipos de inmunidad que se desarrollan durante la infección por ***M. tuberculosis***, la principal es la inmunidad celular, por ser ésta la que permite bloquear la implantación y desarrollo del microorganismo en otras células (25); mientras que la inmunidad humoral indica, básicamente, un marcador de infección y no de inmunidad (26), ya que la micobacteria es un patógeno intracelular que no se ve afectada por la función lítica del complemento ni por los anticuerpos producidos contra ésta.

La secuencia de fenómenos que ocurren durante la infección por ***M. tuberculosis*** es la siguiente:

- presentación del Ag a células T por macrófagos que han fagocitado a los microorganismos,
- sensibilización de las células T,
- liberación de linfocinas como factores quimiotácticos para monocitos y macrófagos, así como factores de inhibición de la migración de éstos (MIF) y
- agregación de macrófagos y linfocitos en el sitio de implantación de la micobacteria, para formar granulomas y la posterior caseificación de éste (10).

#### 2.3.1.1. Función de los macrófagos

La función principal de los macrófagos es eliminar bacterias y otros patógenos al englobarlos por medio del mecanismo de la fagocitosis (26,28,29).

Dentro de los macrófagos, la micobacteria puede sobrevivir evadiendo los mecanismos de la célula hospedera, por medio de alguna de las siguientes formas propuestas para el desarrollo de patógenos intracelulares:

- inhibición de la fusión del lisosoma (14,31),

- resistencia a los contenidos lisosomales (31),
- resistencia a péptidos catiónicos (12,31),
- modificación del fagolisosoma para facilitar la sobrevivencia y multiplicación del patógeno (12,31),
- escape del fagolisosoma hacia el citoplasma (31,33),
- producción de mediadores que suprimen la activación del macrófago (14); y
- la inactivación de otros macrófagos por medio de sus componentes celulares y la producción de citocinas (25).

#### 2.3.1.1.1. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune por ***M. tuberculosis***:

Entre los que se ha demostrado uso por la micobacteria están:

##### 2.3.1.1.1.1 *Resistencia a contenidos lisosomales y péptidos catiónicos*:

Cuando los macrófagos fagocitan bacterias se activa el metabolismo oxidativo (intermediarios reactivos del oxígeno o IRO) con el fin de eliminarlas, gracias a la coestimulación del IFN $\gamma$  liberado por linfocitos T CD4+ activados.

Sin embargo, se ha observado que esta vía metabólica no es efectiva en la eliminación de ***M. tuberculosis*** (12,20,25), ya que se ha demostrado que este patógeno produce tioredoxina, una proteína con actividad de superóxido-dismutasa que inactiva los radicales tóxicos generados (12). También se ha demostrado que ciertas fracciones de bajo peso molecular de la micobacteria (sulfolípidos, lipoarabinomano y glicolípidos fenólicos) inhiben la producción de IRO por los macrófagos (20) y disminuyen la activación de los mismos (25).

A pesar de estas observaciones, también se ha demostrado que la administración de hormona del crecimiento y prolactina aumentan la producción de IRO (32), al igual que lo hace la presencia de IFN $\gamma$  (14,34).

En los últimos años se ha demostrado una vía metabólica más eficaz que la oxidativa en la eliminación de las micobacterias. Se trata de intermediarios reactivos de nitrógeno (IRN) generados a partir de L-arginina por la sintetasa



óxido-nitrosa (30) y liberados por los macrófagos activados por IFN $\gamma$  (25,30).

#### 2.3.1.1.1.2. *Escape hacia el citoplasma a partir del fagolisosoma:*

Algunos patógenos como *L. monocytogenes*, por medio de citolicinas (listeriolicina O) pueden inhibir funciones básicas de la respuesta inmune, tales como el procesamiento y presentación de Ag por las células APC.

Es por eso que se están realizando estudios para establecer la función de ciertas citolicinas solubles de la membrana de la micobacteria para entrar, replicarse y escapar de vacuolas o células del hospedero (33).

#### 2.3.1.1.1.3. *Producción de mediadores que suprimen la activación de macrófagos:*

Se ha observado que *M. avium* al ser fagocitada por los macrófagos, provoca en éstos la producción de Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), la cual suprime la activación de otros macrófagos (14).

#### 2.3.1.2. Sensibilización de las células T CD4+

La sensibilización o activación de los linfocitos CD4+ (Th-Th1) se lleva a cabo por las monocinas de los macrófagos presentadores de antígeno. Las principales monocinas liberadas durante la activación de los macrófagos son la IL-1beta y el TNFalfa.

Al activarse los macrófagos expresan receptores para una forma activa de la vitamina D<sub>3</sub> (1,25-dihidroxi-D<sub>3</sub>R), la cual aumenta la capacidad bactericida de los mismos (25). Este receptor también es expresado en las células T activadas, las cuales al liberar IFN $\gamma$ , coestimulan la producción de TNFalfa por los macrófagos, alimentando el ciclo de activación de T.

La monocina IL-1beta induce la producción de IL-2 y la expresión de receptores para IL-2 (IL-2R) en los linfocitos Th.

Se ha observado que los niveles de IL-1 se mantienen elevados durante las etapas tempranas de la formación del granuloma, mientras que los niveles de TNFalfa aumentan durante la última etapa de formación y mantenimiento del mismo (25,35); además de que ambos son los responsables de los síntomas

sistémicos de fiebre, sudoración nocturna y pérdida de peso característicos de esta patología (25,36).

#### 2.3.1.3. Liberación de linfocinas

Los linfocitos Th activados inician la producción y liberación de linfocinas, las que poseen efecto de retroalimentación positiva sobre ellas mismas y sobre los macrófagos que las activaron.

La principal linfocina liberada por las células Th es el IFN $\gamma$ . Esta puede actuar sola o como coefectora con otras citocinas para la regulación inmunológica del proceso infeccioso.

El IFN $\gamma$  actúa solo en las siguientes funciones:

- incremento en la activación de los macrófagos, fibroblastos y células endoteliales (14,34,35),
- aumento del metabolismo oxidativo (14,34),
- formación de células gigantes de cuerpo extraño (35),
- induce la síntesis del tuberculostático 1,25 dihidroxi-D3 (35); y
- producción de IRN (20).

En las siguientes funciones actúa como citocina coefectora:

- junto a la IL-1 $\beta$  estimula la producción de TNF $\alpha$  por los macrófagos (25)
- junto al 1,25-dihidroxi-D3R estimula la producción de TNF $\alpha$  por los macrófagos (25).

Otra linfocina liberada es la IL-2, la cual funciona como factor quimiotáctico indirecto para leucocitos y promueve su extravasación por cambios en las propiedades adhesivas de las células endoteliales (35).

#### 2.3.1.4. Agregación de macrófagos y linfocitos en el sitio de implantación

Las principales citocinas que poseen función quimiotáctica durante la evolución de la infección por micobacterias son la IL-1 $\beta$  y la IL-2.

Estas interleucinas promueven la formación del tubérculo característico de la infección.

Mientras estas interleucinas continúan atrayendo células hacia el tubérculo, la monocina TNFalfa secretada desde la activación de los macrófagos, actúa como mediador en la producción del daño característico al tejido, conocido como caseificación (36).

### 2.3.2. Función de los linfocitos B

Al mismo tiempo que se activan las células Th, éstas promueven la activación de las células B, las cuales son las mediadoras de la inmunidad humoral (producción de anticuerpos).

Los linfocitos B expresan inmunoglobulinas (Ig) en su membrana. Estas son capaces de unirse directamente y con gran afinidad a los antígenos (Ag) intactos, incluyendo glucoproteínas, glicolípidos, polisacáridos, péptidos y cualquier otra molécula antigénica.

La respuesta humoral montada contra la infección tuberculosa se constituye básicamente, en un marcador de infección y no de inmunidad (26).

## 2.4. EPIDEMIOLOGIA

A más de 110 años del aislamiento del bacilo de Koch, la tuberculosis continúa siendo una de las importantes causas de morbi-mortalidad humanas.

Las estadísticas internacionales disponibles muestran un significativo aumento en la incidencia de la enfermedad, tanto que en países industrializados donde se había logrado controlar, ha vuelto a resurgir como consecuencia de la diseminación de la epidemia del SIDA y porque han surgido cepas multirresistentes a las drogas de uso convencional para el tratamiento de la enfermedad (12,16,31,35,37-39).

La incidencia de la enfermedad es mayor en grupos sociales que viven en condiciones socioeconómicas muy bajas y con escasa atención médica. Otras condiciones como desnutrición, pobreza, hacinamiento, malos hábitos higiénicos, ignorancia, inmunodepresión, padecimientos coexistentes (diabetes mellitus y nefropatías crónicas, entre otras), factores de resistencia individual y,

actualmente, infección por VIH y el uso de drogas (2,3,9,18,40), contribuyen a la infección.

Cada nuevo caso tiene un promedio de siete contactos, cada uno de los cuales conlleva un peligro potencial de convertirse en un nuevo caso (3), lo que favorece el incremento continuo de la enfermedad.

La tuberculosis es por más, la enfermedad infecciosa de mayor prevalencia y una causa importante de morbi-mortalidad a nivel mundial, cuya diseminación ha ido en incremento por la alta incidencia de la enfermedad en pacientes con SIDA (12,31,35). Así lo demuestran las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS):

- el número anual de nuevos casos aumentará de 7.5 millones en 1990 a 10.2 millones en el 2000, lo que producirá casi 90 millones de nuevos casos durante esta década, que equivale a un total de dos mil millones de personas que están o han padecido la enfermedad;
- el número de muertes por esta patología aumentará de 2.5 millones en 1990 a 3.5 millones en el 2000, produciendo un total de 30 millones de defunciones en los años 90 (un cuarto de todas las causas de defunción prevenibles en adultos) (33,41-43).

De igual forma, la tuberculosis infantil ha ido en aumento mundialmente, con un incremento de hasta 36.1 por ciento en niños de cero a cuatro años y del 34.1 por ciento en niños de cinco a catorce años, siendo los niños menores de cinco años el grupo de mayor riesgo (59 por ciento de casos) (40,44).

Aunque la infección por Micobacterias No Tuberculosas (MNT) no tiene la misma importancia clínica de *Mycobacterium tuberculosis*, es una causa importante de morbi-mortalidad en pacientes con VIH/SIDA, debido principalmente a que más del 95 por ciento de los casos son producidos por miembros del complejo MAC (*Mycobacterium avium-intracellulare*) (14,17,38,46,47), micobacterias resistentes a las drogas anti-tuberculosas disponibles, lo que

produce una respuesta pobre al tratamiento de regímenes de hasta cuatro a cinco drogas, e incluso, reactivación de los focos de infección tras el mismo (19).

Si las estadísticas a nivel mundial son alarmantes, también lo son en Guatemala. El Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social ha reportado:

- un incremento de más de 54 por ciento de casos desde 1986 a 1995 (3,45),
- una tasa de morbi-mortalidad de 32.76 por ciento en 1994 (523 defunciones por tuberculosis pulmonar y 16 defunciones por tuberculosis meníngea/sistema nervioso central), mientras que en 1995 la tasa de morbilidad bajó a 17.35 por ciento (84); y
- una tasa de 13.64 por ciento de casos ligados al VIH/SIDA durante el primer trimestre de 1996 (45), mientras que hasta abril de 1997 se confirmaron 15 casos de tuberculosis pulmonar y diez de tuberculosis extrapulmonar en pacientes con dicha inmunodeficiencia (82).

Estos datos poco alentadores muestran una tendencia a incrementarse, favorecidos por las condiciones propicias para el desarrollo de la enfermedad en nuestro país y por el posible aumento de cepas multirresistentes a las drogas usadas en el tratamiento (37), debido al alto índice de abandono del mismo (43.58 por ciento en 1989) (5).

## **2.5. METODOS DE DIAGNOSTICO**

El diagnóstico temprano de la tuberculosis continúa siendo un problema de salud pública y social en Guatemala debido a sus implicaciones económicas, ya que la población más afectada es la económicamente activa (25 a 44 años de edad) (18,38,49).

Los métodos de diagnóstico incluyen el cuadro clínico y radiológico y los métodos bacteriológicos, junto con la prueba de hipersensibilidad tardía o prueba de la tuberculina (test de Mantoux y de las punciones múltiples) (2,9,10,40).

### 2.5.1. DIAGNOSTICO RADIOLOGICO Y CLINICO

El cuadro radiológico debe correlacionarse con el cuadro clínico y con los hallazgos auscultatorios del tórax (9). Sin embargo, no proveen un diagnóstico conclusivo de una infección tuberculosa pulmonar, pues las figuras radiológicas de esta enfermedad se confunden con las desarrolladas por otros microorganismos (*Nocardia* spp.) y hongos (*H. capsulatum* y *C. immitis*) que pueden producir patologías pulmonares similares tanto en signos y síntomas como en el curso y evolución (6). Además se ha observado que *H. capsulatum* puede alojarse en las cavernas desarrolladas en los pacientes con tuberculosis curada, dificultando aún más el diagnóstico al sospecharse de una reactivación de tuberculosis pulmonar.

El cuadro clínico que presentan las diversas patologías pulmonares producidas por los microorganismos arriba mencionados son, de hecho, muy similares entre sí y se necesitan exámenes de laboratorio para realizar alguna discriminación en cuanto a la etiología de la enfermedad.

A pesar de la ayuda diagnóstica en la tuberculosis que proveen tanto el cuadro clínico como el radiológico, todos los métodos tradicionales de diagnóstico son dependientes del aislamiento y crecimiento de las micobacterias que, como se mencionó con anterioridad, es de cuatro a ocho semanas. El largo período de crecimiento, aunado al resurgimiento inesperado de la tuberculosis, al apareamiento de cepas multirresistentes a las drogas tradicionales y al aislamiento de micobacterias no tuberculosas causantes de enfermedades pulmonares típicas de tuberculosis junto a la vulnerabilidad conferida por el VIH/SIDA en los pacientes con esta enfermedad, ha provocado la urgente necesidad de pruebas diagnósticas rápidas (37,39,50,51). Esto con el fin de instaurar la terapéutica adecuada en el menor tiempo posible para lograr el control efectivo de la enfermedad.

### 2.5.2. DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO

El diagnóstico bacteriológico conclusivo se basa en el aislamiento, crecimiento e identificación de la micobacteria causal en medios de cultivo apropiados, en un tiempo aproximado de ocho a diez semanas. Actualmente se han desarrollado medios de cultivo para la siembra de muestras, que proveen un tiempo menor para el diagnóstico. Estos medios de cultivo líquido miden la utilización o producción de analitos por técnicas radiométricas (BACTEC 12B y 13A) (21,55) o colorimétricas (MB REDOX con PACT y MB/Bact) (56-61), proporcionando un crecimiento micobacteriano en 12 a 19 días (55,56) con una sensibilidad de hasta 87 por ciento (56).

Para la instauración del tratamiento, los médicos suelen basarse en el reporte de laboratorio de una baciloscopía positiva. Sin embargo, este examen microscópico sólo detecta los casos que esputan bacilos tuberculosos con más de 5,000 bacilos alcohol-ácidoresistente/mL, mientras los casos contrarios (tuberculosis miliar, principalmente) pasan desapercibidos (52).

El diagnóstico que proporciona la baciloscopía posibilita la conversión de los enfermos en no contagiosos, además evalúa periódicamente la eficacia del tratamiento, brindando orientación en la elección de esquemas terapéuticos estándares (52). No puede tomarse como diagnóstico conclusivo, debido a su baja sensibilidad (22-44 por ciento) en comparación con el cultivo de las muestras (21) y su alto porcentaje de falsos negativos (25 por ciento) (2).

El fundamento de la baciloscopía se basa en la capacidad de las micobacterias de incorporar ciertos colorantes y retenerlos frente a la acción de ácidos y alcohol, propiedad conocida como alcohol-ácidoresistencia (2,5,52,70).

En la tuberculosis pediátrica, la ayuda diagnóstica que presta la baciloscopía es menor y el diagnóstico confirmatorio bacteriológico (cultivo) apenas logra abarcar el 40 por ciento de los casos (44).

Como ocurre con cualquier otro microorganismo, el estándar de oro diagnóstico es el aislamiento por medio de cultivo e identificación por pruebas

bioquímicas del agente causal; por lo que la baciloscopía es, únicamente, una de las mejores ayudas diagnósticas.

### 2.5.3. DIAGNOSTICO SEROLOGICO

Para el diagnóstico serológico existe actualmente gran diversidad de pruebas, entre las cuales encontramos: ensayos enzimáticos (ELISA) directos (detección de antígeno) o indirectos (detección de anticuerpos), radioinmunoensayos directos o indirectos (RIA), contra inmuno electrophoresis (CIE) e hibridación de ácidos nucleicos. Además, se emplea la prueba de tuberculina o de hipersensibilidad tardía como otra ayuda diagnóstica.

#### 2.5.3.1. Prueba de hipersensibilidad tardía

La prueba de la tuberculina es una ayuda diagnóstica importante, e incluso se usa como prueba estándar frente a nuevas técnicas disponibles (6).

Permite descubrir infecciones activas o pasivas (con o sin enfermedad) (5), por medio del desarrollo de sensibilidad cutánea a la tuberculoproteína empleada o PPD (derivado proteico purificado) dos a cuatro semanas de iniciada la infección (10) y en niños, después de tres a seis semanas e incluso tres meses post-infección (40).

La prueba se basa en que individuos infectados con bacilos tuberculosos desarrollan hipersensibilidad de tipo tardío frente a ciertas proteínas de bajo peso molecular o polipéptidos del microorganismo (5).

Epidemiológicamente da información cuantitativa de la respuesta, evalúa el riesgo de infección y las fuentes de contagio de una comunidad (5). Sin embargo, su interpretación presenta varios problemas si no se cuenta con la historia clínica completa, pues la prueba requiere de agrupar al paciente dentro de ciertos patrones (40). *Ver Tabla ANEXO 3*

Actualmente, por su poca sensibilidad y especificidad ha perdido valor diagnóstico (5), ya que puede dar reacciones positivas falsas por infección con micobacterias no tuberculosas, en la tuberculosis miliar y en la vacunación con



BCG; y reacciones negativas falsas en infecciones virales, sarcoidosis, desnutrición, enfermedad de Hodgkin, inmunosupresión, VIH/SIDA, en individuos sin enfermedad tuberculosa presente pero que están en un período temprano de incubación y en enfermedades tuberculosas activas devastadoras (2,5-7,9,10,40).

El hecho que pacientes infectados con otras micobacterias diferentes a *M. tuberculosis* den reacción positiva al test de tuberculina ha planteado la necesidad de buscar nuevas proteínas del bacilo que sean más específicas y provean un mejor diagnóstico, aún después de inmunización previa con BCG. Se han identificado algunas moléculas con estas características, entre ellas el MPT64 (42,50,54) y MPT40 (53), las cuales se han propuesto como candidatos para reemplazar a la vacuna BCG.

#### 2.5.3.2. Test serológicos

Las técnicas de inmunodiagnóstico rápido se basan en la detección de antígenos (Ag) micobacterianos o de anticuerpos (Ac) contra dichos Ag.

Entre las principales técnicas de inmunodiagnóstico serológico de la tuberculosis se encuentran ELISA, RIA, Western Blot, CIE e inmunofluorescencia. De igual manera existen técnicas con principios inmunológicos para la identificación de cepas de micobacterias, entre las que están la electroforesis en gel de poliacrilamida o SDS-PAGE y aglutinación de partículas de látex (2,3,16,18,37,39,49,51,55,62-69).

Las pruebas de ELISA se han usado más ampliamente, debido a su sensibilidad, especificidad y al equipo de lectura de fácil uso y simplicidad, en comparación con las técnicas de RIA.

Se han desarrollado diferentes sistemas de ELISA para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar (principalmente en la tuberculosis meníngea pediátrica) (2,3,49,63,65,66,68-70), tanto para la detección de antígeno (63) como de anticuerpo (49,65,66,68); con porcentajes de sensibilidad que varían desde 60 al 90 por ciento (49,63,65,66,68).

Los principales sistemas de ELISA para el diagnóstico de tuberculosis son aquellos que detectan Ag (prueba directa), ya que han observado que la respuesta inmune humoral no es muy adecuada debido a la presencia de complejos inmunes Ag-Ac y porque las diferentes especies de micobacterias patógenas al hombre comparten fracciones inmunogénicas; lo que produce reacciones cruzadas y no permite diferenciar infecciones por una especie determinada, reduciendo así la especificidad de la prueba (2,3,51,65,68,69).

Gracias a que la respuesta inmune humoral montada inicialmente contra el bacilo tuberculoso se basa en la producción de Ac dirigidos contra los componentes citoplásmicos de la micobacteria (67), es posible diferenciar la infección por cepas específicas mediante la separación fisicoquímica de dichos componentes y el montaje de una prueba de diagnóstico serológico utilizando tal fracción. Además, el uso de agentes conocidos con acción disociante de complejos inmunes (51,71), favorecería la separación química de los complejos Ag-Ac formados por el efecto de prozona (exceso de Ag) durante la infección tuberculosa, permitiendo medir mayor cantidad de Ag y/o Ac (51,71).

Estas dos características en una prueba de diagnóstico inmune, aumentarían tanto su sensibilidad como especificidad, asegurando un diagnóstico más acertado de la patología.

#### 2.5.4 OTRAS PRUEBAS DIAGNOSTICAS

Además de las pruebas de diagnóstico clínico-radiológicas, bacteriológicas y serológicas de la tuberculosis, existen otras técnicas de ayuda diagnóstica que utilizan a los ácidos nucleicos micobacterianos, como la hibridización y amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (16,18,39,65,76); y otras que utilizan las propiedades fisicoquímicas de separación de los componentes de la pared de dichos agentes causales, como la cromatografía de capa fina, la de gases y la líquida de alta resolución (24,37,46,47,55,69,72-75,77,78).

El primer grupo de pruebas resulta de difícil montaje en la mayoría de laboratorios, porque requieren de materiales y equipos especializados de alto

costo y de personal entrenado. Su máxima ventaja es que proporcionan un diagnóstico después de las primeras semanas de presentarse el cuadro clínico típico de la enfermedad.

El segundo grupo de pruebas requiere del aislamiento previo de la micobacteria para posterior análisis fisicoquímico de sus componentes celulares; por lo que el tiempo necesario para el diagnóstico es comparable a las técnicas bacteriológicas. Además, este tipo de pruebas se utilizan principalmente para la investigación epidemiológica de la enfermedad.

## 2.6. TRATAMIENTO

Debido a que la tuberculosis es una enfermedad multicausal, es importante iniciar la terapéutica modificando algunos de los factores de riesgo; por lo que aún tiene vigencia el reposo en cama, una dieta adecuada, clima templado y el aseo ambiental (9).

A pesar de cumplir con estos aspectos, esta enfermedad requiere de una adecuada quimioterapia antimicobacteriana para lograr la total recuperación del paciente (4,70).

La quimioterapia moderna contra la tuberculosis se inició en 1944 con el descubrimiento de la Estreptomicina por Schatz y Waksman (4,70,79) y la demostración de su efectividad en humanos y animales inferiores por Feldman y Hinshaw, un año más tarde (70). A partir de entonces se han desarrollado nuevos medicamentos que cumplen con los dos objetivos fundamentales de la quimioterapia antituberculosa: la eliminación total del agente causal y del estado de paciente portador, reduciendo así la diseminación de la enfermedad en la comunidad (70).

Mitchison y Dickinson en 1978 dividieron a los medicamentos antituberculosos según su capacidad para destruir a *M. tuberculosis* en los órganos afectados: siendo la Rifampicina, Pirazinamida, Isoniacida y

Estreptomina agentes bactericidas, mientras que otros como el Etambutol y la Tiacetazona son bacteriostáticos (9,70,79).

Es importante planear un régimen terapéutico que incluya medicamentos de los dos grupos con el fin de eliminar todas las micobacterias, incluyendo a las cepas capaces de adquirir resistencia al tratamiento. De aquí que las drogas de primera línea incluyan a la Isoniacida, Rifampicina, Estreptomina y Etambutol (4,5,70); mientras que la Pirazinamida, Cicloserina, Etionamida, Acido para-aminosalicílico, Viomicina y Capreomicina constituyen las drogas de segunda línea (5,79).

El tratamiento de la tuberculosis depende principalmente del tipo de infección (primaria o secundaria), del sitio de afección (pulmonar o extrapulmonar), de la edad del paciente y del tipo de micobacteria (tuberculosa o no-tuberculosa).

Existen dos tipos de tratamiento antituberculoso:

- el tratamiento estándar de Isoniacida y Rifampicina por doce meses con Etambutol o Estreptomina en los dos o tres meses iniciales, que equivale a un total de 270 dosis; y
- el tratamiento corto que incluye Rifampicina, Isoniacida, Pirazinamida, Etambutol y/o Estreptomina por aproximadamente siete meses, que equivale a un total de 90 dosis (4,5,9,70,80). *Ver Tabla ANEXO 4*

Debido a la resistencia antibiótica de las micobacterias, tanto del complejo tuberculosis como de las no-tuberculosas, se han realizado estudios experimentales con aminoglucósidos (Amikacina y Gentamicina) liposoma-encapsulados (19) para mejorar la terapéutica contra la enfermedad, así como para reducir el número de cepas resistentes a aquellos.

## **2.7. INMUNIZACION Y PREVENCIÓN**

El principio básico para la prevención de la tuberculosis consiste en evitar el contacto entre las personas sanas y los portadores sintomáticos o

asintomáticos. Sin embargo, ya que esta enfermedad es de lento desarrollo y de diagnóstico tardío, el éxito de la prevención radica en la detección temprana de la enfermedad, así como en el aislamiento y tratamiento efectivo del paciente (4).

Para elevar el nivel de resistencia contra la tuberculosis en las personas sanas, las instituciones de salud a nivel mundial recomiendan la vacunación con BCG durante el primer año de vida. La vacuna contra la tuberculosis, o vacuna BCG como popularmente se le conoce, consiste en cepas mutantes vivas atenuadas de la cepa virulenta del *Mycobacterium bovis* desarrollada por los científicos franceses Calmette y Guérin (bacilo de Calmette Guérin o BCG) a principios del siglo veinte (4,70).

Esta vacuna, al ser inyectada intradérmicamente en muy baja concentración, induce un alto grado de resistencia a la infección contra el bacilo tuberculoso, disminuyendo hasta en un 80 por ciento el índice de la enfermedad (4). Asimismo, el nivel de protección que proporciona la vacuna BCG permanece por varios años, a pesar que se ha demostrado que su efecto disminuye de forma variable a partir del décimo año post-vacunación (4,70).

Mucho se discute sobre las consideraciones económicas y epidemiológicas de las campañas de vacunación en masa con la BCG, principalmente en países cuya prevalencia es muy baja (menos del cinco por ciento), ya que el uso de ésta produce hipersensibilidad a la prueba de la tuberculina, lo que le resta el valor diagnóstico que aporta dicha prueba (4,70).

Por tal motivo se han realizado intentos para prevenir la tuberculosis a través de la vía profiláctica usando agentes quimioterapéuticos -quimioprofilaxis-. Con tal fin se ha utilizado la Isoniacida administrada en dosis diarias a personas con riesgo de infección (médicos, enfermeras y personal hospitalario) o a aquellas

cuya prueba de tuberculina se haya positivizado de forma reciente. Sin embargo, la quimioprofilaxis ha resultado ser un método insatisfactorio en la prevención de la tuberculosis, principalmente por la dificultad económica que conlleva la administración diaria del medicamento por períodos de meses o años (4).

Por lo tanto, en países en vías de desarrollo como el nuestro, la vacunación masiva con BCG continúa siendo la única forma de prevención contra esta enfermedad. De dicha cuenta que los índices de vacunación en niños menores de un año en nuestro país han aumentado del 57.10 por ciento en 1992 hasta un 76.50 por ciento en 1996 (81), mientras que hasta julio de 1997 el porcentaje de cobertura por vacunación con la BCG fue del 51.24, lo que equivale a 184,469 niños vacunados (82,83).

### 3. JUSTIFICACION

La tuberculosis en Guatemala continúa siendo una enfermedad con profundas implicaciones socio-económicas y de salud, que tiende a ir en aumento gracias a la diversidad de factores predisponentes que existen en nuestro país, entre ellos la epidemia del SIDA.

El diagnóstico clásico de esta enfermedad requiere un tiempo prolongado, por lo que se buscan nuevos métodos que proporcionen un diagnóstico más rápido.

Existen diversas patologías pulmonares similares a la tuberculosis en el cuadro clínico y radiológico, entre ellas la nocardiosis, histoplasmosis y coccidioidomicosis. De estas tres patologías, los principales agentes causales de la nocardiosis pulmonar, *Nocardia asteroides* y *Nocardia brasiliensis*, poseen características de la pared bacteriana muy similares a las de las especies de *Mycobacterium*.

Con el fin de lograr un diagnóstico diferencial entre estas patologías, e incluso para discriminar entre infecciones causadas por *M. tuberculosis* y por micobacterias no tuberculosas, la presente investigación utilizará la fracción glicolípida diferencial entre especies del género *Mycobacterium* y entre los géneros *Mycobacterium* y *Nocardia* para montar la prueba diagnóstica de ELISA indirecto (detección de anticuerpos); por medio del análisis de muestras de suero de pacientes sometidas a un tratamiento con agentes disociantes que rompen los complejos antígeno-anticuerpo formados en el curso de la infección tuberculosa, con el fin de aumentar, así mismo la sensibilidad de la prueba.

#### 4. OBJETIVOS

##### GENERAL

Proporcionar una ayuda diagnóstica rápida para la tuberculosis, que se correlacione bien con las técnicas clásicas de diagnóstico de la enfermedad.

##### ESPECIFICOS

- Diferenciar entre infecciones típicas de tuberculosis causadas por *Mycobacterium tuberculosis* y por micobacterias no tuberculosas.

- Diferenciar infecciones pulmonares similares a la tuberculosis, causadas por los géneros *Nocardia*, *Histoplasma* y *Coccidioides*.

- Establecer la especificidad y sensibilidad de la técnica de ELISA por medio del análisis de muestras de suero de personas sanas y de pacientes con otras patologías pulmonares (histoplasmosis, coccidioidomicosis y nocardiosis), tratadas con agentes disociantes de complejos inmunes.

-Establecer el patrón cromatográfico diferencial de la fracción glicolipídica de diversas especies del género *Mycobacterium* y del género *Nocardia*.

- Determinar si los conocidos agentes disociantes de complejos inmunes actúan de manera eficaz en la prueba de ELISA indirecto, al romper el complejo Ag-Ac formado durante la infección tuberculosa y aumentando los niveles de detección de los Ac anti-micobacteria.



## 5. HIPOTESIS

La prueba de ELISA indirecto utilizando antígenos glicolipídicos diferenciales, proporciona un diagnóstico rápido, específico y sensible de la tuberculosis.

## 6. MATERIALES Y METODOS

### 6.1 UNIVERSO Y MUESTRA

#### *Universo:*

Cepas de ***Mycobacterium*** y de ***Nocardia*** aisladas de pacientes con afección pulmonar.

Muestras de suero de personas sanas, de pacientes con afección pulmonar tuberculosa y de pacientes con afección pulmonar no tuberculosa con cuadro anatomo-clínico-radiológico similar.

#### *Muestra:*

Diferentes especies de micobacterias que producen afección típica de tuberculosis, así como cepas de ***Nocardia asteroides*** y ***Nocardia brasiliensis***.

### 6.2 RECURSOS HUMANOS E INSTITUCIONALES

#### *Humanos:*

Br. Héctor Alfonso Cuevas Meckler, Investigador.

Licda. Ingrid Verónica Tabarini, Asesora.

#### *Institucionales:*

Laboratorios de Micología y LAMIR de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Escuela de Química Biológica.

Laboratorio de Investigación Biológica de la Escuela de Biología.

### 6.3 MATERIALES

#### *Equipo:*

- jeringas descartables de 10 cc. de 21x1 1/2"
- micropipetas automáticas de 10-50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200-1000  $\mu$ l
- placas de polivinilo de 96 pozos (para ELISA)
- algodón
- pipetas Pasteur tallo corto o largo

- puntas amarillas tamaño universal
- tubos de ensayo de tamaño variable
- tubos Eppendorf de 2.0 cc
- centrífuga
- campana de flujo laminar
- incubadora a 36° C y baño de maría con temperatura ajustable
- desecadora con atmósfera de nitrógeno
- placas para cromatografía de capa fina
- lector y lavador de placas de ELISA

*Reactivos:*

-medios de cultivo líquido y agar para micobacterias y nocardias  
(Middlebrook 7H9 y 7H10)

- éter
- etanol
- cloroformo
- NaOH 0.2 M en metanol
- ácido acético glacial
- alfa naftol
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- NaOH 2%
- HCl 1.25 N con púrpura de bromocresol
- NaNO<sub>3</sub>
- Tween 80
- amortiguador de fosfatos
- anilina o bencidina
- bromuro de cianógeno
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%
- conjugado anti-IgG, anti-IgM y anti-IgA humana marcada con peroxidasa
- orto-fenilendiamina

- reactivo de Folin-Ciocalteu
- Albúmina Sérica Bovina
- Sílica gel 60
- Cloro al 3%
- Fenol al 5%
- Alcohol 75°
- Cloruro de glicina 0.1M
- SDS al 10%

Otros:

Cepas *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*, *Nocardia asteroides* y *N. brasiliensis* obtenidas de pacientes con afección pulmonar.

#### 6.4 METODOS

*Recolección de sueros:*

★ Elaborar una hoja de identificación personal y anotar los siguientes aspectos: nombre (iniciales), edad, sexo, sala médica en la que se encuentran, No. de registro (en el Hospital y para la investigación), historia clínica, tiempo de evolución, diagnóstico diferencial, radiografía, BK (positivo o negativo), cultivo (realizado o no) e identificación de la cepa aislada (el nombre de la cepa identificada), tratamiento anti-tuberculoso (tiene o no y desde cuándo)

★ Obtener de 6 a 12 cc. de sangre coagulada a partir de punción venosa

★ Separar los sueros por centrifugación

★ Alicuotar los sueros y agregar thimerosal como preservante, identificando cada uno de los viales Eppendorf

★ Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso

*Obtención de cepas:*

★ Preparar medios de cultivo de Lowenstein Jensen y Middlebrook 7H9 y 7H10 (agar y caldo, respectivamente)

★ Sembrar esputos y secreciones de pacientes en los medios de cultivo

- \* Incubar las cepas a 36° C por varias semanas.

*Identificación de cepas:*

- \* Realizar las pruebas bioquímicas de identificación para cada una de las cepas de micobacterias y de nocardias.

*Extracción/separación de glicolípidos:*

- \* La masa bacteriana tanto de las cepas de ***Mycobacterium*** como las de ***Nocardia***, se desecan en desecadora con atmósfera de nitrógeno u oxígeno con vacío por 72 hrs.

- \* Pretratar la masa desecada con mezcla de etanol-éter durante 12 hrs.

- \* Centrifugar a 2500 rpm por 10 min.

- \* Separar la biomasa de la capa de solvente.

- \* Evaporar los restos de etanol-éter con atmósfera de nitrógeno a 40° C.

- \* Disolver las fracciones evaporadas con cloroformo-metanol.

- \* Adicionar NaOH 0.2M en metanol por 30 min. a 37° C.

- \* Neutralizar con ácido acético glacial

- \* Agregar cloroformo-metanol

- \* Adicionar agua

- \* Agitar y centrifugar por 2500 rpm por 5 min.

- \* Descartar la fase acuosa.

- \* Agregar metanol-agua.

- \* Remover y separar la fase acuosa.

- \* Secar la biomasa o sedimento a 40° C con corriente de nitrógeno.

- \* Disolver en cloroformo-metanol.

- \* Aplicar a las 2 placas de TLC (una con fase móvil compuesta por cloroformo-metanol 9:1 y otra con una fase móvil compuesta por cloroformo-metanol-agua 65:25:4)

- \* Revelar con alfa-naftol 0.5% en metanol-agua y Spray con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

- \* Calentar a 110° C por 8 min. y luego a 150° C por 5 min.

- \* Los glicolípidos se observan color púrpura.

*Montaje de la prueba de ELISA indirecto:*

- ★ Cuantificación de proteínas por el método de Lowry de la fracción glicolípídica diferencial de *M. tuberculosis* (y del extracto de PPD)
- ★ Sensibilización de las placas de polivinilo con el antígeno glicolípídico diferencial micobacteriano (y con el extracto de PPD)
- ★ Realización de la técnica de ELISA indirecto utilizando sueros negativos, sueros positivos, sueros positivos mezclados con agentes disociantes (para observar el grado de disociación de los complejos inmunes Ag-Ac y, consecuentemente determinar mayor cantidad de Ac), sueros positivos mezclados con sueros de pacientes con afección pulmonar similar a la tuberculosis (para determinar si existe reacción cruzada con la afección tuberculosa) y sueros de pacientes con afección pulmonar similar en sintomatología a la tuberculosis
- ★ Lectura de las placas a 490 nm en lector de ELISA (Minireader II, Dynatech)

## 6.5 DISEÑO DE LA INVESTIGACION

### 6.5.1. Número de muestras:

Para el análisis estadístico se utilizaron por conveniencia 30 sueros de pacientes con cultivo/BK positivo y 30 sueros de pacientes con cultivo negativo; además, se utilizaron sueros de pacientes con otros tipos de afecciones pulmonares similares a la tuberculosis. Para la prueba de ELISA se corrieron controles negativos para determinar el punto de corte.

### 6.5.2. Análisis de resultados:

Fue un estudio ciego unidireccional, en el cual se mezclaron los sueros de pacientes con tuberculosis y/o coccidioidomicosis y/o histoplasmosis, para determinar además, la especificidad de la prueba.

Se efectuó el cálculo de especificidad y sensibilidad utilizando una tabla de contingencia de dos por dos.

## 7. RECURSOS ECONOMICOS

La investigación fue patrocinada por el Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas (IIQB) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, conjuntamente a la Licda. María Luisa García de López, con quien se trabajó la Investigación sobre "Inmunodiagnóstico de tuberculosis y micosis pulmonares por medio de la prueba de ELISA, utilizando antígenos locales".

El IIQB dio el aporte económico de los reactivos y materiales necesarios para la prueba de ELISA, proporcionando la cantidad de Q. 9,981.80. *Ver tabla ANEXO 5.*

El investigador proporcionó la cantidad de Q. 2,890.20 por la compra de los materiales y reactivos necesarios para el montaje de la cromatografía de capa fina. *Ver tabla ANEXO 6.*

## 8. RESULTADOS

En el *anexo 7* del sistema de ELISA para la placa *Pathozyme Myco*, se puede observar la alta sensibilidad y especificidad de la prueba para la detección inmunológica de los pacientes que presentan sintomatología y/o pruebas microbiológicas de infección por *Mycobacterium spp.*, ya que al compararla con la tabla-resumen de los casos de tuberculosis del *anexo 13* correlacionan en casi un 70 por ciento.

De igual manera, como se puede observar en los anexos 7,9 y 11 la prueba de ELISA indirecto montada con antígenos glicolipídicos micobacterianos diferenciales, posee una sensibilidad del 88 y una especificidad del 85 por ciento, de forma global respectivamente, que la hacen útil para el diagnóstico de infección pulmonar por *Mycobacterium tuberculosis*; siendo capaz de detectar hasta 40 ng de Anticuerpos ( *anexo 7, placa 200 µg Ag<sub>1</sub>* ), aún cuando los mejores resultados se observan en las placas con Antígeno micobacteriano en concentración de 100 µg/mL ( *anexo 7, placa 100 µg Ag<sub>1</sub>* ).

En los *anexos 7 a 11* se observa que la prueba de ELISA indirecto montada no presenta interacción diagnóstica inmunológica contra los sueros de pacientes de histoplasmosis, coccidioidomicosis y otras infecciones pulmonares similares en sintomatología a la tuberculosis.

Asimismo, en los *anexos 7 a 11* se demuestra que las soluciones disociantes de complejos Antígeno-Anticuerpo formados en el transcurso de la infección tuberculosa, incrementan de forma conjunta el diagnóstico inmunológico hasta en un 35 por ciento ( *anexo 7, placas 100 µg Ag<sub>1</sub> y 100 µg Ag<sub>2</sub>* ); siendo el agente A (solución de cloruro de glicina) el de mayor capacidad de disociación de dichos complejos.



## 9. DISCUSION DE RESULTADOS

El sistema de ELISA indirecto utilizando Antígenos glicolipídicos micobacterianos diferenciales mostró la capacidad de detectar pequeñas concentraciones de Anticuerpos antimicobacterianos (40 ng/mL), aún cuando los mejores resultados se observan para concentraciones de 100 µg/mL. *Ver tablas ANEXOS 7 y 8.*

Como se ha mencionado anteriormente, la respuesta inmunitaria humoral en los pacientes con infección tuberculosa desarrolla complejos inmunes con Antígenos micobacterianos (principalmente protéicos) asociados a Anticuerpos IgG, IgA e IgM; lo que hace aún más difícil el diagnóstico serológico rápido.

Según lo anterior, las muestras de suero de los pacientes analizados fueron tratados con dos agentes disociantes de complejos inmunes con la finalidad de aumentar la capacidad de la prueba para detectar Anticuerpos antimicobacterianos presentes en dichos complejos. Asimismo, las muestras también se analizaron sin el tratamiento con los dichos agentes para determinar la capacidad de la prueba de detectar Anticuerpos anti- micobacterianos libres.

Como se puede observar en las gráficas de los Anexos 9 y 10, todos los valores, al igual que el valor de corte para la prueba de ELISA, se incrementaron después del tratamiento con los agentes disociantes. Asimismo, en los Anexos 9 y 10 se observa que después del tratamiento con el agente disociante A (solución SDA: solución de cloruro de glicina) se positivizan algunas de las muestras de suero, no así con el agente disociante B (solución SDB: solución de SDS); lo que indica una mayor capacidad de dicho agente de disociar los complejos inmunes. *Ver gráficas ANEXOS 9 y 10.*

También es importante mencionar que el tratamiento con los agentes disociantes A (SDA) y B (SDB) no genera diferencia en cuanto al número de falsos positivos y negativos del grupo control.

Otra de las características importantes del tratamiento con los agentes disociantes es que repercute en la sensibilidad de la prueba de ELISA indirecto, aumentándola un 10 por ciento para el agente SDB y hasta un 25 por ciento para el agente SDA.

Como se puede observar en los Anexos 7 y 8, la prueba de ELISA indirecto montada con los Antígenos micobacterianos diferenciales proporciona una sensibilidad del 88 por ciento y una especificidad del 85 por ciento. Ver ANEXOS 7 y 8.

Es importante utilizar cepas nativas para la preparación de los antígenos micobacterianos, ya que las características inmunitarias montadas contra éstas resultan ser más específicas para las regiones de donde se aislaron; por lo que la especificidad y la sensibilidad se ven afectadas.

## 10. CONCLUSIONES

1. La prueba de ELISA indirecto con Antígenos micobacterianos diferenciales tiene la capacidad de detectar hasta 40 ng/mL de Anticuerpo y posee una sensibilidad del 88 por ciento y una especificidad del 85 por ciento; lo que indica su utilidad como prueba diagnóstica serológica rápida.
2. Comparada con la prueba de ELISA control (Pathozyme Myco de MERCK S.A), la prueba de ELISA indirecto montada posee una sensibilidad y especificidad del 98 por ciento.
3. El tratamiento de las muestras de suero con los agentes disociantes A (cloruro de glicina) y B (SDS diez por ciento) incrementan la sensibilidad de la prueba para detectar Anticuerpos anti-micobacteria hasta en 35 por ciento; mientras que no afecta los valores de especificidad de la misma. Esto indica su utilidad en el diagnóstico serológico de patologías que se conoce desarrollan complejos inmunes.
4. Las reacciones falso-positivas en los sueros del grupo control se calcularon en un tres por ciento; sin embargo, para dicho suero control se determinó su contacto frecuente con cepas micobacterianas aún cuando no presentara sintomatología de infección pulmonar.

## 11. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios con antígenos micobacterianos purificados por otras técnicas (cromatografía de afinidad, cromatografía líquida, por ejemplo) con el fin de comparar la sensibilidad y especificidad de dichos antígenos versus una prueba ya estandarizada como las que distribuyen las casas comerciales.
2. Realizar pruebas de ELISA directo con antígenos micobacterianos purificados por la técnica cromatográfica utilizada en este estudio o por medio de otras técnicas de separación de glicolípidos e inoculadas en conejo, para determinar y comparar la sensibilidad y especificidad entre una prueba de ELISA indirecto y una de ELISA directo.
3. Utilizar agentes disociantes en las pruebas serológicas diagnósticas de enfermedades que se sabe producen la formación de complejos inmunes antígeno-anticuerpo, con el fin de aumentar la sensibilidad de la misma.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Pelczar, et. al. Microbiología. 4a. ed. México: Interamericana, 1989. 825p.
2. Herrera Barrios, María Teresa. Desarrollo y Estandarización de la Técnica de ELISA y Coaglutinación para el diagnóstico de Tuberculosis. México: Universidad Nacional Autónoma de México (Tesis de Graduación, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán), 1989. 80p.
3. Guirola Tenas, Silvia Patricia. Estandarización de la técnica de Ensayo Inmunoenzimático de fase sólida ELISA para la determinación del antígeno de *Mycobacterium tuberculosis*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1991. 49p.
4. Youmans, Guy P., Philip Paterson y Herbert Sommers. The Biologic and Clinical Basis of Infectious Diseases. USA: W.B. Saunders Company, 1975. 813p.
5. Ramírez García de Pérez, Marina J. Identificación de especies de micobacterias aisladas de muestras clínicas de pacientes que acudieron al Hospital General San Juan de Dios de 1988 a 1989. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1992. 85p.
6. Pennington, James E. Respiratory Infections: Diagnosis and Management. 2nd. ed. USA: Raven Press, 1989. 672p.
7. Brock, Thomas D. y Michael T. Madigan. Biology of Microorganisms. 5th. ed. USA: Prentice Hall, 1988. 833p.
8. Lennet, D. et. al. Microbiology. 2nd. ed. USA: Harper & Row, 1985. 920p.
9. Acevedo, Marco Antonio. Elementos de Patología Clínica, vol. II. Guatemala: Imprenta Universitaria, 1993. 401p.
10. Robbins, Stanley L. y Vinay Kumar. Patología Humana. 4a. ed. México: Interamericana McGraw-Hill, 1990. 798p.

11. McDonough, Kathleen A. and Yvonne Kress. Cytotoxicity for Lung Epithelial Cells is a Virulence-associated Phenotype of ***Mycobacterium tuberculosis***. *Infection and Immunity* 1995; 63:4802-4811
12. Wieles, Brigitte, et. al. Identification and Functional Characterization of Thioredoxin of ***Mycobacterium tuberculosis***. *Infection and Immunity* 1995; 63: 4946-4948
13. Mattia, Anthony R. Mycobacteria and Crohn's Disease. *Clinical Microbiology Newsletter* 1993; 15:129-131
14. Shiratsuchi, Hiroe, et. al. Strain- and Donor-Related Differences in the Interaction of ***Mycobacterium avium*** with Human Monocytes and its Modulation by Interferon-gamma. *The Journal of Infectious Diseases* 1990;162:932-938
15. Nolan, Charles M., Peter A. Hashisaki, and Denis F. Dundas. An Outbreak of Soft-Tissue Infections Due to ***Mycobacterium fortuitum*** Associated with Electromyography. *The Journal of Infectious diseases* 1991;163:1150-1153
16. Colombrita, D., et. al. Rapid detection and identification of mycobacteria from blood of patients with acquired immune deficiency syndrome. *J. Med. Microbiol.* 1990;32:271-273
17. Piersimoni, Claudio, et. al. ***Mycobacterium avium*** and Multidrug-Resistant ***Mycobacterium tuberculosis*** Disseminated Mixed Infection in a Patient with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Clinical Microbiology Newsletter* 1995;17:6-8
18. Davis, Thomas E. ***Mycobacterium tuberculosis*** : A Renewed Challenge for the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Newsletter* 1992; 14: 97-99
19. Bermudez, Luis Eduardo, et. al. Treatment of Disseminated ***Mycobacterium avium*** Complex Infection of Beige Mice with Liposome-

- Encapsulated Aminoglycosides. *The Journal of Infectious Diseases* 1990;161:1262-1268
20. Flesch, Inge E.A. and Stefan H. E. Kaufmann. Mechanisms Involved in Mycobacterial Growth Inhibition by Gamma Interferon-Activated Bone Marrow Macrophages: Role of Reactive Nitrogen Intermediates. *Infection and Immunity* 1991;59:3213-3218
  21. Balows, Albert , et. al. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th. ed. USA: American Society for Microbiology, 1991. 1364p.
  22. Cáceres, Armando, et. al. Tamizaje de la Inhibición de *Mycobacterium tuberculosis* por maceraciones vegetales. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (Informe final de Investigación Proyecto 91-10). 1992. 39p.
  23. Wolinsky, E. *Microbiology*. 3rd. ed. USA: Harper & Row Publishers, 1980. 932p.
  24. Butler, W. Ray, et. al. Identification of Mycobacteria by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Clinical Microbiology* 1991;29:2468-2472
  25. Rom, William N. and Yihong Zhang. The rising tide of tuberculosis and the human host response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Lab Clin Med* 1993;121:737-341
  26. Stites, Daniel P. y Abba I. Terr. *Inmunología Básica y Clínica*. 7a. ed. México: El Manual Moderno, 1993. 1055p.
  27. Hoffbrand, A. V. and J. E. Pettit. *Essential Haematology*. 2nd. ed. USA: Blackwell Scientific Publications, 1984. 274.
  28. *Diccionario Enciclopédico Quillet*, tomo V. Argentina: Editoriales Quillet, 1981. pp 557.
  29. *Diccionario Terminológico de Ciencias Médicas*. 11ava. ed. México: Salvat Editores, 1977. pp596.

30. Scorpio, Angelo, et. al. Characterization of *pncA* Mutations in Pyrazinamide-Resistant ***Mycobacterium tuberculosis***. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997;41:540-543
31. Leao, Sylvia Cardoso, et. al. A Species-Specific Nucleotide Sequence of ***Mycobacterium tuberculosis*** Encodes a Protein That Exhibits Hemolytic Activity when Expressed in ***Escherichia coli***. *Infection and Immunity* 1995; 63:4301-4306
32. Warwick-Davies, Jan, et. al. Growth Hormone Activation of Human Monocytes for superoxide Production but not Tumor Necrosis Factor Production, Cell Adherence, or Action against ***Mycobacterium tuberculosis***. *Infection and Immunity* 1995; 63:4312-4316
33. King, C. Harold, et. al. Expression of contact-Dependent Cytolytic Activity by ***Mycobacterium tuberculosis*** and Isolation of the Genomic Locus that Encodes the Activity. *Infection and Immunity* 1993; 61:2708-2712
34. Douvas, George S., et. al. Gamma Interferon Activates Human Macrophages to Become Tumoricidal and Leishmanicidal but Enhances Replication of Macrophage-Associated Mycobacteria. *Infection and Immunity* 1985;50:1-8
35. Johnson, Barbara J. and David N. McMurray. Cytokine Gene Expression by Cultures of Human Lymphocytes with Autologous ***Mycobacterium tuberculosis***-Infected Monocytes. *Infection and Immunity* 1994;62:1444-1450
36. Filley, Elaine A. and Graham A. W. Rook. Effect of Mycobacteria on Sensitivity to the Cytotoxic Effects of Tumor Necrosis Factor. *Infection and Immunity* 1991;59:2567-2572
37. Tasaka, H. et. al. Secretion of MPB64 Antigen by a Recombinant Clone of ***Mycobacterium smegmatis***: Characterization and Application for the Diagnosis of Tuberculosis. *Scand. J. Immunol* 1995;42:487-492



38. Streeton, Jonathan A. The acquired immunodeficiency syndrome and the threat of tuberculosis. *The Medical Journal of Australia* 1988;148:607-608
39. Pfyffer, Gaby E., et. al. Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens by a target-amplified test system. *Journal of clinical Microbiology* 1994;32:918-923
40. Hall, Caroline B., et. al. Screening for Tuberculosis in Infants and Children. *Pediatrics* 1994;93:131-134
41. The Global challenge of tuberculosis. *The Lancet* 1994;344:277-278
42. Oettinger, Thomas, et. al. Mapping of the Delayed-type Hypersensitivity-inducing epitope of secreted protein MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* 1995;63:4613-4618.
43. Pascopella, Lisa, et. al. Use of *in vivo* complementation in *Mycobacterium tuberculosis* to identify a genomic fragment associated with virulence. *Infection and Immunity* 1994;62:1313-1319
44. Vallejo, Jesús G., et. al. Clinical Features, diagnosis, and treatment of tuberculosis in Infants. *Pediatrics* 1994;94:1-7
45. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Boletín Epidemiológico Nacional, No.13 Guatemala: Bell Gráfica,1996. 63p
46. Tsang, Ana Y., et. al. Clinical and Epidemiological Importance of typing of *Mycobacterium avium* complex Isolates. *Journal of clinical Microbiology* 1992;30:479-484
47. Alugupalli, Srinivas, et. al. Detection of 2-icosanol by gas chromatography-mass spectrometry in sputa from patients with pulmonary mycobacterial infections. *Journal of Clinical Microbiology* 1993;31:1575-1578
48. Reimer, Larry G. Laboratory Detection of mycobacteremia. *Clinics in Laboratory Medicine* 1994;14:99-105
49. Massó, Felipe, et. al. Eficacia de un ELISA con extracto proteico compeltto y deslipidizado de *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv como prueba

- serológica para descartar tuberculosis pulmonar. Rev.Lat.-Amer.Microbiol. 1993;35:177-184
50. Haslov, K., et. al. Guinea Pig Cellular Immune responses to proteins secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. Infection and Immunity 1995;63:804-810
  51. Ashtekar, M.D., et. al. A study of tubercular antigen and antibody in childhood tuberculosis. Journal of Tropical Pediatrics 1992;38:22-25
  52. Bacteriología de la Tuberculosis. Centro Panamericano de Zoonosis, Organización Panamericana de la Salud. 1988. 30p
  53. Leao, S.C. et. al. Tuberculosis: new strategies for the development of diagnostic tests and vaccines. Braz J Med Biol Res 1993;26:827-833
  54. Roche, P.W., et. al. Expression of *Mycobacterium tuberculosis* MPT64 in recombinant *Mycobacterium smegmatis*: purification, immunogenicity and application to skin tests for tuberculosis. Clin Exp Immunol 1996;103:226-232
  55. Cage, Gary D. Direct Identification of *Mycobacterium* species in BACTEC 7H12B medium by high-performance liquid chromatography. Journal of Clinical Microbiology 1994;32:521-524
  56. Harris, G. et. al. A Scottish evaluation of the MB/BacT Mycobacteria detection system. Scottish Mycobacteria Reference Laboratory 1996;1-4
  57. Magee, J.G., et. al. Experience with the MB/BacT automated culture system for Mycobacteria. Regional Centre for Mycobacteriology 1996;19-23
  58. Hanna, B.A., et. al. Evaluation of the MB/BacT Mycobacteria detection system. NYU 1996;10-16
  59. Lindholm, P., et. al. Evaluation of recovery and time to detection of Mycobacterial growth in the MB/BacT system compared with three other media. NJC 1996;39-43
  60. Yamane, N., et. al. Evaluation of MB/BacT, a Novel Fully automated Mycobacteria culture system. KUM 1996;12-19

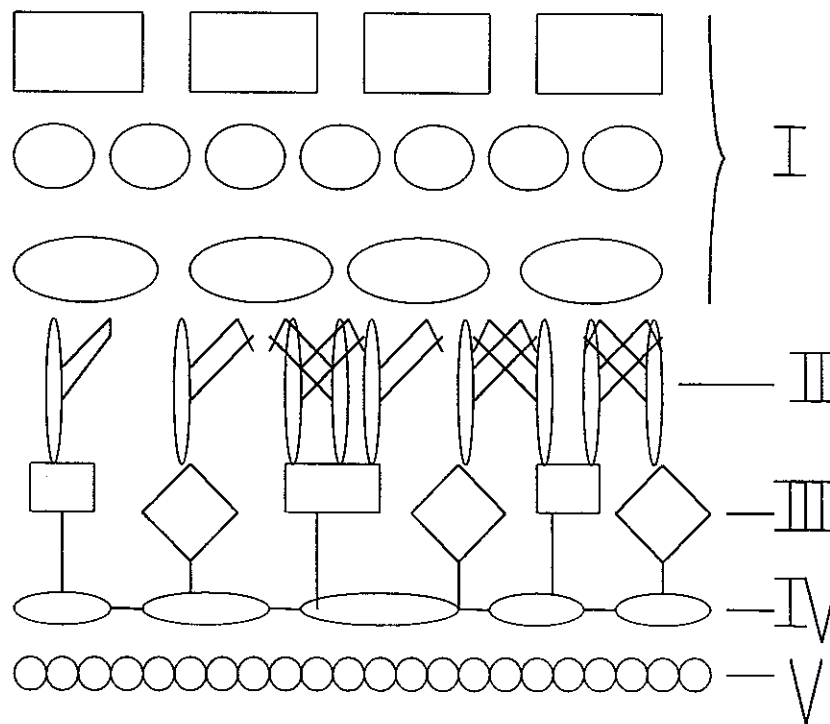
61. Panfleto publicitario MB REDOX con PACT para aislamiento de micobacterias. Merck, S.A. Guatemala, 1996
62. Jong, A. de, et. al. A rapid method for identification of *Mycobacterium* species by polyacrylamide gel electrophoresis of soluble cell proteins. J. Med. Microbiol. 1991;34:1-5
63. Radhakrishnan, V.V., et. al. Correlation between culture of *Mycobacterium tuberculosis* and detection of mycobacterial antigens in cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis. J. Med. Microbiol. 1990;33:223-226
64. Rovatti, E., et. al. Evaluation of a Western Blot serum test for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Eur Respir J 1996;9:288-292
65. Amicosante, M., et. al. Evaluation of a novel tuberculosis complex-specific 34 kDa protein in the serological diagnosis of tuberculosis. Eur Respir J 1995;8:2008-2014
66. Simonney, N., et. al. Analysis of the immunological humoral response to *Mycobacterium tuberculosis* glycolipid antigens (DAT, PGLTb1) for diagnosis of tuberculosis in HIV-seropositive and -seronegative patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995;14:883-891
67. Bothamley, G.H. Serological diagnosis of tuberculosis. Eur Respir J Suppl 1995;20:676-688
68. López de Archila, C., et. al. Antibody response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens in children with pulmonary tuberculosis and in BCG vaccinated non tuberculous pediatric patients. Rev Latinoam Microbiol 1995;37:161-169
69. Miorner, H., et. al. Diagnosis of tuberculous meningitis: a comparative analysis of three immunoassays, an immune complex assay and the polymerase chain reaction. Tuber Lung Dis 1995;76:381-386
70. Grange, John M. Enfermedades Micobacterianas. México: Editorial Científica PLM, 1980. 152p

71. Miles, Steven A., et. al. Rapid Serologic testing with immune-complex-dissociated HIV p24 antigen for early detection of HIV infection in neonates. *The New England Journal of Medicine* 1993;328:297-302
72. Bosne, Suzane and Veronique Vincent Levy-Frebault. Mycobactin analysis as an aid for the identification of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae* subspecies. *Journal of Clinical Microbiology* 1992;30:1225-1231
73. Denner, James C., et. al. Comprehensive approach to identification of serovars of *Mycobacterium avium* Complex. *Journal of Clinical Microbiology* 1992;30:473-478
74. Luquin, M., et. al. Evaluation of Practical Chromatographic procedures for identification of clinical isolates of mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 1991;29:120-130
75. Butler, W. Ray, et. al. Identification of *Mycobacterium avium* complex strains and some similar species by high-performance Liquid Chromatography. *Journal of Clinical Microbiology* 1992;30:2698-1704
76. Kirschner, P., et. al. Genetic Heterogeneity within *Mycobacterium fortuitum* Complex species: genotypic criteria for Identification. *Journal of Clinical Microbiology* 1992;30:2772-2775
77. Thibert, Louise and Stephen Lapierre. Routine application of high-performance Liquid Chromatography for identification of mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 1993;31:1759-1763
78. Butler, W. Ray and James O. Kilburn. High-performance Liquid Chromatography patterns of mycolic acids as criteria for identification of *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, and *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Clinical Microbiology* 1990;28:2094-2098
79. Farga, V. Tuberculosis. Chile: Publicaciones Técnicas Mediterráneo, 1989. 205p

80. Tratamientos antituberculosos. Esquemas de Tratamiento Acortado (T.A.). Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Poster ilustrativo.
81. Boletín Epidemiológico Nacional No. 14. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social/Dirección General de Servicios de Salud, división de vigilancia y control de enfermedades, febrero 1997; 31p.
82. Boletín Epidemiológico Nacional No. 15. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social/Dirección General de Servicios de Salud, división de vigilancia y control de enfermedades, junio 1997; 62p.
83. Boletín Epidemiológico Mensual No. 3. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social/Dirección General de Servicios de Salud, septiembre 1997; 4p.
84. Boletín Informativo "Situación de Salud en Guatemala, indicadores básicos 1995", Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social/Dirección General de Servicios de Salud.

## ANEXO 1

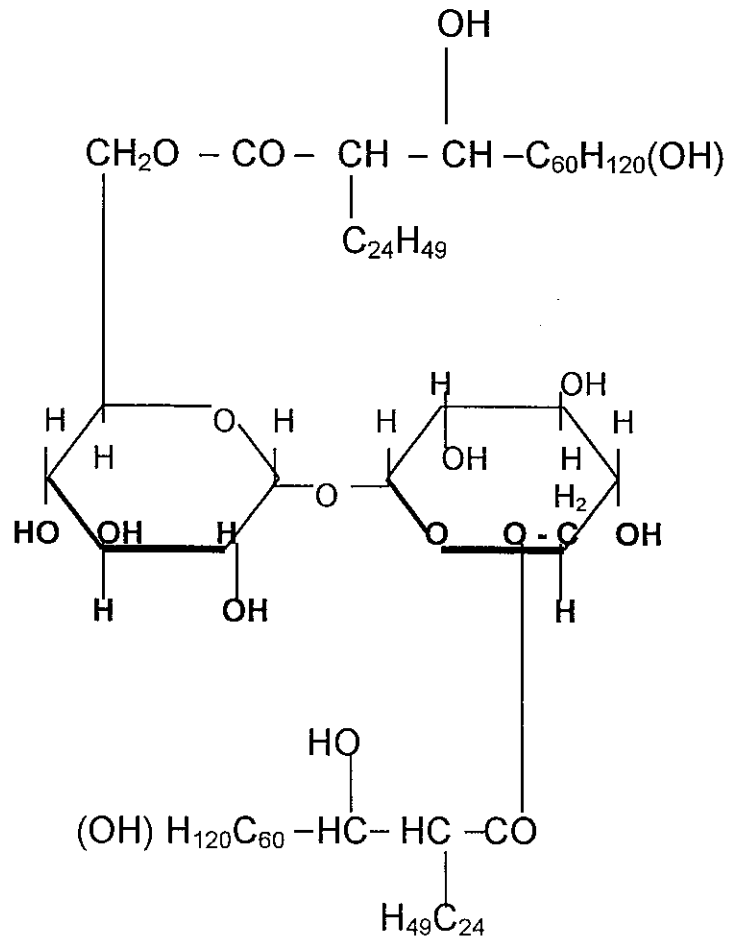
### PARED DE LAS BACTERIAS ALCOHOL-ACIDO RESISTENTES



- I: Cord factor
- II: Acidos micólicos
- III: Arabino-galactano
- IV: Peptidoglicano
- V: Membrana citoplásmica

## ANEXO 2

### Estructuras de algunos lípidos característicos de las micobacterias



6,6<sup>l</sup> dimicoliltrehalosa (*Cord factor*)

## ANEXO 3

### Interpretación de la Prueba de Mantoux Definición de una prueba cutánea positiva en niños\* (5 TU-PPD)

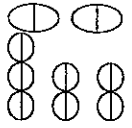
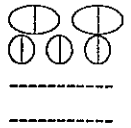
REACCION $\geq$ 5 mm	REACCION $\geq$ 10 mm	REACCION $\geq$ 15 mm
Niños en contacto próximo con casos confirmados o sospechosos de infección por tuberculosis. Niños con sospecha de tuberculosis: evidencia radiográfica de tuberculosis activa o previamente activa y evidencia clínica de tuberculosis. Niños en estado inmunosuprimido <sup>†</sup> o con infección por VIH.	Niños con alto riesgo de diseminación por: edad: < 4 años, otros riesgos médicos: enfermedad de Hodgkin, linfoma, enfermedad renal crónica, malnutrición y diabetes mellitus. Niños con alto grado de exposición ambiental: nacidos o cuyos padres nacieron en regiones con alta prevalencia, con exposición frecuente de adultos infectados con VIH, drogadictos, residentes de casas-hogar, encarcelados o personas residentes en instituciones mentales.	Cualquier persona o niño mayor de 4 años sin ningún factor de riesgo.

\* Las recomendaciones deberán ser consideradas incluyendo la administración previa de la BCG.

<sup>†</sup> Incluyen dosis inmunosupresoras de corticosteroides.

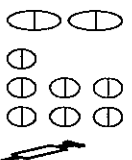
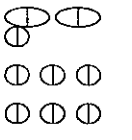
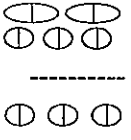


## ANEXO 4

<b>A</b> MEDICAMENTOS Tx primario (Enfermos vírgenes de Tx) T.A. 50-40	FASE INICIAL 50 dosis, duración 8.5 semanas Diariamente de lunes a sábado	FASE DE CONTINUACION 40 dosis, duración 20 semanas 2 veces por semana, lunes y jueves. Se iniciará 3 días después de la fase inicial
RMP = Rifampicina INH = Isonia cida Z = Pirazinamida E = Etambutol	 <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: flex-end; margin-left: 10px;"> <div>600 mg</div> <div>300 mg</div> <div>1,500 mg</div> <div>1,200 mg</div> </div>	 <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: flex-end; margin-left: 10px;"> <div>600 mg</div> <div>900 mg</div> <div>-----</div> <div>-----</div> </div>

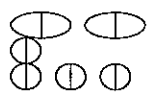

A: T.A. 50-40

Enfermos pulmonares confirmados por 2 BK (+) o sólo por cultivos o casos con BK(-) con lesiones diseminadas progresivas; TB extrapulmonar localizada en el SNC, renal, osteoarticular o en casos de empiemas pleurales. Este mismo Tx deberá administrárseles a los pacientes tuberculosos con VIH (+) o a los pacientes con SIDA que se les compruebe tuberculosis.

<b>B</b> MEDICAMENTOS Tx. secundario (Enfermos antes tratados) T.A. 30-30-50	FASE INICIAL 30 dosis, duración 5 semanas; diariamente de lunes a sábado	FASE INICIAL 30 dosis, duración 5 semanas; diariamente de lunes a sábado	FASE DE CONTINUACION 50 dosis, duración 25 semanas, 2 veces por semana; lunes y jueves. Se inicia 3 días después de la fase inicial
RMP = Rifampicina INH = Isoniacida Z = Pirazinamida E = Etambutol S = Estreptomicina	 <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: flex-end; margin-left: 10px;"> <div>600 mg</div> <div>300 mg</div> <div>1500mg</div> <div>1200mg</div> <div>1 g.</div> </div>	 <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: flex-end; margin-left: 10px;"> <div>600 mg</div> <div>300 mg</div> <div>1500mg</div> <div>1200mg</div> <div>-----</div> </div>	 <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: flex-end; margin-left: 10px;"> <div>600 mg</div> <div>900 mg</div> <div>-----</div> <div>1200mg</div> <div>-----</div> </div>

B: T.A. 30-30-50

Para enfermos pulmonares que vuelven a tratamiento por recaída o después de un primer o segundo abandono. Por definición estos enfermos tienen 2 BK (+) actuales al momento de confirmar la condición de recaída o abandono que requiere el tratamiento secundario.

<b>C</b> MEDICAMENTOS Tx primario (Casos especiales) T.A. 30-40	FASE INICIAL 30 dosis, duración 5 semanas Diariamente de lunes a sábado	FASE DE CONTINUACION 40 dosis, duración 20 semanas 2 veces por semana, lunes y jueves. Se iniciará 3 días después de la fase inicial
RMP = Rifampicina INH = Isonia cida Z = Pirazinamida	 <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: flex-end; margin-left: 10px;"> <div>600 mg</div> <div>300 mg</div> <div>1,500 mg</div> </div>	 <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: flex-end; margin-left: 10px;"> <div>600 mg</div> <div>900 mg</div> <div>-----</div> </div>

C: T.A. 30-40

En casos pulmonares con BK y cultivos negativos y lesiones mínimas con lenta y limitada progresión; complejos primarios evolutivos; casos extrapulmonares sin confirmación bacteriológica y de evolución habitualmente autolimitada y de mínima gravedad.

NOTA:

1. Enfermos crónicos multibacilares, seguramente polirresistentes: retratamiento de acuerdo al estudio de susceptibilidad y disponibilidad de medicamentos. Mientras tanto no administrar ningún medicamento.
2. El tratamiento infantil deberá ser ordenado de acuerdo a la norma nacional del programa utilizando la combinación HR o HRZ, según el caso.

ANEXO No. 5

**PRESUPUESTO PROPORCIONADO POR IIQB**

DESCRIPCION	PRECIO (Q)
<i>Elementos químicos y compuestos</i>	
1 gramo Pronasa	800.00
50 gramos Bromuro de cianógeno	534.00
100 gramos Borato de sodio	210.00
500 gramos Bicarbonato de sodio	120.80
500 gramos Acido cítrico	230.00
500 gramos Acido bórico	240.00
100 gramos OPD	1024.00
1 vial peroxidasa anti-IgG humana	1400.00
1 litro Etanol absoluto	92.40
1 litro Cloroformo	130.20
1 litro Butanol	550.60
500 ml Glicerol	295.60
500 ml Tween 80	422.00
5 litros Extrán neutro	463.00
<b>TOTAL</b>	<b>6511.80</b>
<i>Artículos de caucho</i>	
2 cajas guantes pequeños	180.00
<i>Productos plásticos, nylon, vinil y PVC</i>	
2 bolsas puntas amarillas (500 U c/u)	260.00
1 bolsa tubos Ependorf (500 U)	130.00
100 placas de polivinilo de 96 pozos	1750.00
<i>Utiles menores médico-quirúrgicos y de laboratorio</i>	
1 caja jeringas de 10cc. 21x1 1/2" (100 U)	170.00
<b>TOTAL</b>	<b>2490.00</b>
<i>Productos de vidrio</i>	
6 erlenmeyer de 1000 cc./tapón de rosca	980.00
<b>TOTAL</b>	<b>9981.80</b>

ANEXO No. 6

**PRESUPUESTO PROPORCIONADO POR EL TESISTA**

<b>DESCRIPCION</b>	<b>PRECIO (Q)</b>
50 placas de Sílica gel 60 para TLC	2055.00
2 litros Etanol absoluto	184.80
2 litros Cloroformo	260.40
1 bolsa tubos Ependorf de 1.5 ml (500 U)	130.00
2 bolsas puntas amarillas (500 U c/u)	260.00
<b>TOTAL</b>	<b>2890.20</b>

## ANEXO 7

### ESPECIFICACION DE PLACAS DE ELISA vrs. SUEROS

#### PLACA No. Pathozyme Myco

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	B	C (-)	C (-)	C (-)	C (+) bajo	C (+) bajo	C (+) bajo	C (+) bajo	C (+) alto	C (+) alto	C (+) alto	C (+) alto
	0.105	0.135	0.140	0.130	0.420	0.450	0.400	0.440	0.600	0.650	0.640	0.680
<b>B</b>	13x	25xM	37x	20xM	10x	8xM	30	12M	2	18M	37	11M
	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)
<b>C</b>	13x	25xM	37x	20xM	10x	8xM	30	12M	2	18M	37	11M
	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)
<b>D</b>	N1	N1	N1	C3	C3	C3	Y1	Y1	Y1	Y2	Y2	Y2
	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)
<b>E</b>	N1	N1	N1	C3	C3	C3	Y1	Y1	Y1	Y2	Y2	Y2
	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)
<b>F</b>	13x	13x	25xM	25xM	18M	18M	10x	10x	37x	37x	37	37
	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)
<b>G</b>	13x	13x	25xM	25xM	18M	18M	10x	10x	37x	37x	37	37
	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)
<b>H</b>	Mx	Mx	20xM	20xM	20M	20M	18M	18M	Mx	Mx	37x	37x
	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)	(1:100)
	0.330	0.280	0.290	0.240	0.220	0.205	0.370	0.355	0.230	0.250	0.360	0.380

**sensibilidad**

(posi\*100)/(posi+falsos nega)

**97.92**

media C(-)

0.143

desvest C(-)

0.0001

**especificidad**

(nega\*100)/(nega+falsos nega)

**97.96**

media C(+)bajo

0.428

desvest C(+)bajo

0.001

punto de corte

**0.285**

**eficiencia**

(po+ne)\*100/(po+falso+falne+ne)

**91.35**

media C(+)alto

0.643

desvest C(+)alto

0.003

## ANEXO 7

### ESPECIFICACION DE PLACAS DE ELISA vs. SUEROS

PLACA No. 1

50 ug Ag1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	N2	C1	C2	C3	T1	T2	O1	O2	O3	R1	R2
	0.150	(1:20) 0.220	(1:20) 0.250	(1:20) 0.270	(1:20) 0.255	(1:20) 0.200	(1:20) 0.230	(1:20) 0.260	(1:20) 0.250	(1:20) 0.250	(1:20) 0.300	(1:20) 0.275
B	B	N2	C1	C2	C3	T1	T2	O1	O2	O3	R1	R2
	0.150	(1:20) 0.230	(1:20) 0.240	(1:20) 0.270	(1:20) 0.255	(1:20) 0.220	(1:20) 0.220	(1:20) 0.285	(1:20) 0.270	(1:20) 0.285	(1:20) 0.300	(1:20) 0.290
C	G1	G2	G3	K1	K2	Y1	Y2	Y1	Y1	Y1	Y1	Y1
	(1:20) 0.240	(1:20) 0.235	(1:20) 0.250	(1:20) 0.200	(1:20) 0.225	(1:20) 0.650	(1:20) 0.635	(1:200) 0.350	(1:400) 0.190	(1:800) 0.130	(1:1600) 0.050	(1:3200) 0.005
D	G1	G2	G3	K1	K2	Y1	Y2	Y1	Y1	Y1	Y1	Y1
	(1:20) 0.250	(1:20) 0.240	(1:20) 0.250	(1:20) 0.230	(1:20) 0.210	(1:20) 0.660	(1:20) 0.640	(1:200) 0.345	(1:400) 0.200	(1:800) 0.150	(1:1600) 0.050	(1:3200) 0.005
E	N1	N1	C1	C1	T1	T1	O1	O1	R1	R1	Y1	Y1
	sda 0.150	sdb 0.150	sda 0.150	sdb 0.100	sda 0.100	sdb 0.100	sda 0.150	sdb 0.150	sda 0.200	sdb 0.200	sda 0.480	sdb 0.465
F	8	8	8	8	8	8	12M	12M	12M	12M	12M	12M
	1.150	(1:20) 0.940	(1:60) 0.620	(1:180) 0.440	(1:540) 0.215	(1:1620) 0.095	1.230	(1:20) 0.960	(1:40) 0.720	(1:80) 0.585	(1:160) 0.410	(1:320) 0.305
G	38	38	38	38	38	38	10M	10M	10M	10M	10M	10M
	1.280	(1:20) 1.005	(1:40) 0.860	(1:80) 0.635	(1:160) 0.510	(1:320) 0.420	1.330	(1:20) 1.005	(1:40) 0.910	(1:80) 0.785	(1:160) 0.500	(1:320) 0.415
H	23	23	10x	10x	26x	26x	4x	4x	26xhist	Suero	L.pleu.	Suero
	sda 0.405	sdb 0.385	sda 0.420	sdb 0.410	histo 0.415	cocci 0.410	histo 0.395	cocci 0.370	26xcoc 0.450	nocar- diosis 0.230	S.pneu 0.250	H.inf. 0.200

sensibilidad

(posi\*100/(posi+falsos nega))

**100.00**

promedio C(-)

0.249

especificidad

(nega\*100/(nega+falsos nega))

**100.00**

desvest

0.032

eficiencia

(po+ne)\*100/(po+falso+ne)

**87.64**

positivo a partir

0.345

## ANEXO 7

### ESPECIFICACION DE PLACAS DE ELISA vrs. SUEROS

PLACA No. 2

100 ug Ag1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	N2	C2	C2	T2	T2	O2	O2	R2	R2	Y2	Y2
	0.150	(1:200) 0.215	(1:100) 0.325	(1:200) 0.215	(1:100) 0.300	(1:200) 0.205	(1:100) 0.315	(1:200) 0.230	(1:100) 0.330	(1:200) 0.195	(1:100) 0.365	(1:200) 0.280
B	B	N2	C2	C2	T2	T2	O2	O2	R2	R2	Y2	Y2
	0.145	sdb 0.210	sda 0.310	sdb 0.280	sda 0.270	sdb 0.250	sda 0.290	sdb 0.280	sda 0.240	sdb 0.210	sda 0.420	sdb 0.405
C	C3	C3	O3	O3	G3	G3	Y1	Y1	Y1	Y1	Y1	Y1
	0.300	sdb 0.285	sda 0.310	sdb 0.270	sda 0.240	sdb 0.205	(1:20) 0.715	(1:40) 0.595	(1:80) 0.460	(1:160) 0.385	(1:320) 0.250	(1:640) 0.150
D	4x	4x	4x	26x	26x	26x	24x	24x	24x	17x	17x	17x
	1.350	(1:30) 0.870	(1:60) 0.590	(1:30) 1.210	(1:60) 0.760	(1:60) 0.470	(1:30) 1.380	(1:60) 0.880	(1:60) 0.610	(1:30) 1.050	(1:60) 0.750	(1:60) 0.485
E	38	38	38	11	11	11	7	7	7	19	19	19
	0.960	(1:30) 0.620	(1:60) 0.480	(1:30) 0.940	(1:60) 0.595	(1:60) 0.415	(1:30) 1.050	(1:60) 0.815	(1:60) 0.640	(1:30) 0.990	(1:60) 0.705	(1:60) 0.485
F	24M	24M	24M	11M	11M	11M	30xM	30xM	30xM	20xM	20xM	20xM
	0.600	(1:30) 0.405	(1:60) 0.210	(1:30) 1.015	(1:60) 0.820	(1:60) 0.590	(1:30) 0.755	(1:60) 0.580	(1:60) 0.410	(1:30) 0.640	(1:60) 0.380	(1:60) 0.205
G	23	23	23	23	10x	10x	10x	10x	11xM	29	7x	Suero
	0.705	sda (1:100) 0.460	sdb 0.680	sdb (1:100) 0.405	sda 0.815	sda (1:100) 0.510	sdb 0.655	sdb (1:100) 0.410	sda (1:20) 0.520	sda (1:20) 0.490	sda (1:20) 0.505	nocar- diosis 0.240
H	Mx	Mx	30	30	8xM	8xM	23	23	11xM	29	7x	Suero
	0.310	histo cocci 0.300	histo 0.360	cocci 0.335	histo 0.345	cocci 0.340	histo 0.360	cocci 0.355	sdb (1:20) 0.470	sdb (1:20) 0.405	sdb (1:20) 0.440	H.inf. 0.200

sensibilidad

(posi\*100/(posi+falsos nega))

**93.22**

promedio C(-)

0.270

especificidad

(nega\*100/(nega+falsos nega))

**90.70**

desvest

0.036

eficiencia

(po+ne)\*100/(po+falso+falne+ne)

**95.92**

positivo a partir

0.379

## ANEXO 7

### ESPECIFICACION DE PLACAS DE ELISA vrs. SUEROS

PLACA No. 3

200 ug Ag1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>B</b>	C3	C3	C3	O3	O3	O3	O3	G3	G3	G3	G3
	0.165	(1:100) 0.250	(1:200) 0.180	(1:400) 0.050	(1:50) 0.350	(1:100) 0.245	(1:200) 0.170	(1:400) 0.095	(1:50) 0.225	(1:100) 0.190	(1:200) 0.105	(1:400) 0.095
<b>B</b>	<b>G1</b>	G1	K1	K1	K2	K2	O2	O2	R2	R2	Y2	Y2
	sda 0.215	sdb 0.200	sda 0.185	sdb 0.150	sda 0.200	sdb 0.175	sda 0.205	sdb 0.190	sda 0.240	sdb 0.210	sda 0.405	sdb 0.390
<b>C</b>	<b>6x</b>	6x	6x	6x	35x	35x	35x	35x	40x	40x	40x	40x
	1.350	(1:50) 0.950	(1:100) 0.630	(1:200) 0.425	1.430	(1:50) 0.900	(1:100) 0.685	(1:200) 0.410	0.935	(1:50) 0.760	(1:100) 0.535	(1:200) 0.420
<b>D</b>	<b>15</b>	15	15	15	4	4	4	4	28	28	28	28
	0.960	(1:50) 0.705	(1:100) 0.580	(1:200) 0.415	0.890	(1:50) 0.725	(1:100) 0.530	(1:200) 0.405	1.005	(1:50) 0.840	(1:100) 0.605	(1:200) 0.430
<b>E</b>	<b>25xM</b>	25xM	25xM	19xM	19xM	19xM	3M	3M	3M	18M	18M	18M
	0.905	(1:100) 0.510	(1:200) 0.435	0.430	(1:100) 0.205	(1:200) 0.095	0.870	(1:100) 0.540	(1:200) 0.430	0.965	(1:100) 0.550	(1:200) 0.460
<b>F</b>	<b>23</b>	23	23	23	10x	10x	10x	10x	4x	4x	28	28
	sda 0.580	sda (1:100) 0.410	sdb 0.470	sdb (1:100) 0.345	sda 0.585	sda (1:100) 0.435	sdb 0.520	sdb (1:100) 0.410	sda (1:20) 0.580	sdb (1:20) 0.545	sda (1:20) 0.485	sdb (1:20) 0.430
<b>G</b>	<b>24</b>	24	15x	15x	16	16	25xM	25xM	17x	17x	10M	10M
	sda (1:20) 0.465	sdb (1:20) 0.420	sda (1:20) 0.415	sdb (1:20) 0.380	sda (1:20) 0.405	sdb (1:20) 0.365	sda (1:20) 0.460	sdb (1:20) 0.390	sda (1:20) 0.430	sdb (1:20) 0.375	sda (1:20) 0.435	sdb (1:20) 0.410
<b>H</b>	<b>27x</b>	27x	Mx	Mx	30xM	30xM	30x	30x	16hist	Suero	L.pneu.	Suero
	histo 0.340	cocci 0.305	histo 0.290	cocci 0.270	histo 0.315	cocci 0.300	histo 0.290	cocci 0.270	16cocci +	16cocci Suero nocar- diosis	S.pneu	H.inf.

sensibilidad

(posi\*100/(posi+falsos nega))

**100.00**

promedio C(-)

0.197

especificidad

(nega\*100/(nega+falsos nega))

**100.00**

desvest

0.005

eficiencia

(po+ne)\*100/(po+falpo+falne+ne)

**98.96**

positivo a partir

0.213

## ANEXO 7

### ESPECIFICACION DE PLACAS DE ELISA vrs. SUEROS

PLACA No. 5

100 ug Ag2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>B</b>	K1	K2	K2	R1	R1	R2	R2	G1	G1	G2	G2
	0.170	(1:200) 0.280	(1:100) 0.305	(1:200) 0.270	(1:100) 0.315	(1:200) 0.250	(1:100) 0.300	(1:200) 0.230	(1:100) 0.330	(1:200) 0.270	(1:100) 0.315	(1:200) 0.280
<b>B</b>	<b>K1</b>	K1	K2	K2	R1	R1	N2	N2	Y1	Y1	C1	C1
	sda 0.305	sdb 0.300	sda 0.320	sdb 0.305	sda 0.280	sdb 0.265	sda 0.265	sdb 0.240	sda 0.420	sdb 0.405	sda 0.295	sdb 0.260
<b>C</b>	<b>22x</b>	22x	22x	22x	42x	42x	42x	42x	32x	32x	32x	32x
	1.350	(1:50) 0.625	(1:100) 0.510	(1:200) 0.430	0.380	(1:50) 0.435	(1:100) 0.310	(1:200) 0.240	0.395	(1:50) 0.675	(1:100) 0.485	(1:200) 0.420
<b>D</b>	<b>23</b>	23	23	23	37	37	37	37	15	15	15	15
	0.790	(1:50) 0.540	(1:100) 0.425	(1:200) 0.370	0.605	(1:50) 0.445	(1:100) 0.310	(1:200) 0.260	0.370	(1:50) 0.580	(1:100) 0.460	(1:200) 0.405
<b>E</b>	<b>13xM</b>	13xM	13xM	24xM	24xM	24xM	11M	11M	11M	24M	24M	24M
	0.780	(1:100) 0.550	(1:200) 0.435	0.335	(1:100) 0.280	(1:200) 0.150	0.860	(1:100) 0.545	(1:200) 0.405	0.575	(1:100) 0.490	(1:200) 0.425
<b>F</b>	<b>23 sda</b>	23 sda	23 sdb	23 sdb	10x sda	10x sda	10x sdb	10x sdb	3M sda	3M sdb	18M sda	18M sdb
	0.525	(1:100) 0.410	0.465	(1:100) 0.370	0.590	(1:100) 0.495	0.555	(1:100) 0.470	(1:20) 0.420	(1:20) 0.375	(1:20) 0.465	(1:20) 0.415
<b>G</b>	<b>4 sda</b>	4 sdb	18x sda	18x sdb	2 sda	2 sdb	37x sda	37x sdb	2M sda	2M sdb	24xM sda	24xM sdb
	(1:20) 0.435	(1:20) 0.410	(1:20) 0.450	(1:20) 0.420	(1:20) 0.410	(1:20) 0.400	(1:20) 0.495	(1:20) 0.480	(1:20) 0.445	(1:20) 0.415	(1:20) 0.415	(1:20) 0.400
<b>H</b>	<b>24x histo</b>	24x cocci	Mx histo	Mx cocci	25xM histo	25xM cocci	2x histo	2x cocci	7xhist + 7xcocci	Suero nocardiosis	L.pleu. S.pneu	Suero H.inf.
	0.325	0.315	0.300	0.300	0.320	0.310	0.335	0.320	0.300	0.265	0.250	0.230

sensibilidad

(posi\*100/(posi+falsos nega))

**88.71**

promedio C(-)

0.313

especificidad

(nega\*100/(nega+falsos nega))

**85.11**

desvest

0.012

eficiencia

(po+ne)\*100/(po+falpo+falne+ne)

**91.35**

positivo a partir

0.348



## ANEXO 8

### ESPECIFICACION DE PLACAS DE ELISA vrs. SUEROS PLACA No. 8A 50 ug AgPPD

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>B</b>	N1	C1	C1	T1	T1	O1	O1	Y1	Y1	Y2	Y2
	0.225	(1:100) 0.280	(1:50) 0.350	(1:100) 0.260	(1:50) 0.310	(1:100) 0.240	(1:50) 0.305	(1:100) 0.225	(1:50) 0.425	(1:100) 0.355	(1:50) 0.435	(1:100) 0.340
<b>B</b>	<b>G1</b>	G1	G2	G2	G3	G3	C2	C2	C3	C3	N2	N2
	(1:50) 0.290	(1:100) 0.265	(1:50) 0.305	(1:100) 0.270	(1:50) 0.305	(1:100) 0.285	(1:50) 0.240	(1:100) 0.195	(1:50) 0.255	(1:100) 0.200	(1:50) 0.270	(1:100) 0.205
<b>C</b>	<b>R1</b>	R1	G1	G1	G3	G3	Y1	Y1	C2	C2	C3	C3
	sda 0.300	sdb 0.280	sda 0.330	sdb 0.305	sda 0.305	sdb 0.270	sda 0.405	sdb 0.370	sda 0.250	sdb 0.235	sda 0.260	sdb 0.240
<b>D</b>	<b>73x</b>	73x	73x	15x	15x	15x	37x	37x	37x	3x	3x	3x
	0.645	(1:100) 0.480	(1:200) 0.405	0.660	(1:100) 0.450	(1:200) 0.415	0.315	(1:100) 0.285	(1:200) 0.210	0.560	(1:100) 0.450	(1:200) 0.405
<b>E</b>	<b>19</b>	19	19	7	7	7	18	18	18	10	10	10
	0.650	(1:100) 0.510	(1:200) 0.435	0.620	(1:100) 0.490	(1:200) 0.415	0.280	(1:100) 0.200	(1:200) 0.150	0.575	(1:100) 0.505	(1:200) 0.455
<b>F</b>	<b>23</b>	23	23	23	10x	10x	10x	10x	10	10	2x	2x
	sda 0.305	sda (1:100) 0.270	sdb 0.290	sdb (1:100) 0.250	sda 0.295	sda (1:100) 0.200	sdb 0.270	sdb (1:100) 0.205	sda (1:20) 0.280	sdb (1:20) 0.255	sda (1:20) 0.415	sdb (1:20) 0.400
<b>G</b>	<b>42x</b>	42x	21	21	40x	40x	38x	38x	35	35	7	7
	sda (1:20) 0.315	sdb (1:20) 0.305	sda (1:20) 0.265	sdb (1:20) 0.240	sda (1:20) 0.295	sdb (1:20) 0.280	sda (1:20) 0.270	sdb (1:20) 0.250	sda (1:20) 0.285	sdb (1:20) 0.260	sda (1:20) 0.420	sdb (1:20) 0.400
<b>H</b>	<b>Mx</b>	Mx	38x	38x	7	7	21xM	21xM	25xMhi	Suero	L.pneu.	Suero
	histo 0.265	cocci 0.250	histo 0.305	cocci 0.295	histo 0.375	cocci 0.365	histo 0.305	cocci 0.285	25xMco 0.335	nocar- diosis 0.290	S.pneu. 0.285	H.inf. 0.250

sensibilidad  
(posi\*100/(posi+falsos nega))

**88.89**

promedio C(-)  
0.292

especificidad  
(nega\*100/(nega+falsos nega))

**95.95**

desvest  
0.033

eficiencia  
(po+ne)\*100/(po+falpo+falne+ne)

**95.00**

positivo a partir  
0.391

## ANEXO 8

### ESPECIFICACION DE PLACAS DE ELISA vrs. SUEROS

PLACA No. 8B

100 ug AgPPD

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>B</b>	N1	T1	T1	T2	T2	Y1	Y1	Y2	Y2	R1	R1
	0.160	(1:100) 0.225	(1:50) 0.285	(1:100) 0.260	(1:50) 0.290	(1:100) 0.270	(1:50) 0.405	(1:100) 0.290	(1:50) 0.415	(1:100) 0.280	(1:50) 0.305	(1:100) 0.255
<b>B</b>	<b>O1</b>	O1	O2	O2	O3	O3	C1	C1	K1	K1	K2	K2
	(1:50) 0.305	(1:100) 0.250	(1:50) 0.300	(1:50) 0.235	(1:50) 0.310	(1:100) 0.240	(1:50) 0.295	(1:100) 0.220	(1:50) 0.305	(1:100) 0.265	(1:50) 0.295	(1:100) 0.240
<b>C</b>	<b>R1</b>	R1	C2	C2	C3	C3	T1	T1	T2	T2	O1	O1
	sda 0.285	sdb 0.270	sda 0.295	sdb 0.280	sda 0.266	sdb 0.245	sda 0.240	sdb 0.225	sda 0.230	sdb 0.215	sda 0.265	sdb 0.235
<b>D</b>	<b>25xM</b>	25xM	25xM	12xM	12xM	12xM	30xM	30xM	30xM	26xM	26xM	26xM
	0.520	(1:100) 0.435	(1:200) 0.260	0.305	(1:100) 0.250	(1:200) 0.200	0.385	(1:100) 0.525	(1:200) 0.405	0.665	(1:100) 0.505	(1:200) 0.465
<b>E</b>	<b>10M</b>	10M	10M	12M	12M	12M	11M	11M	11M	24M	24M	24M
	0.335	(1:100) 0.270	(1:200) 0.230	0.325	(1:100) 0.245	(1:200) 0.205	0.385	(1:100) 0.405	(1:200) 0.295	0.665	(1:100) 0.470	(1:200) 0.415
<b>F</b>	<b>23</b>	23	23	23	10x	10x	10x	10x	5	5	12xM	12xM
	sda 0.495	sda (1:100) 0.405	sdb 0.480	sdb (1:100) 0.400	sda 0.510	sda (1:100) 0.435	sdb 0.370	sdb (1:100) 0.405	sda (1:20) 0.255	sdb (1:20) 0.230	sda (1:20) 0.285	sdb (1:20) 0.255
<b>G</b>	<b>11M</b>	11M	35x	35x	21x	21x	19	19	24x	24x	15	15
	sda (1:20) 0.425	sdb (1:20) 0.410	sda (1:20) 0.295	sdb (1:20) 0.270	sda (1:20) 0.260	sdb (1:20) 0.245	sda (1:20) 0.270	sdb (1:20) 0.240	sda (1:20) 0.305	sdb (1:20) 0.265	sda (1:20) 0.280	sdb (1:20) 0.255
<b>H</b>	<b>Mx</b>	Mx	12x	12x	24xM	24xM	26xM	26xM	12xMhi	Suero	L.pneu.	Suero
	histo 0.305	cocci 0.290	histo 0.335	cocci 0.285	histo 0.305	cocci 0.275	histo 0.340	cocci 0.290	12xMco +	nocar- diosis	S.pneu	H.inf.

sensibilidad

$(\text{posi} \times 100) / (\text{posi} + \text{falsos nega})$

**80.65**

promedio C(-)

0.293

especificidad

$(\text{nega} \times 100) / (\text{nega} + \text{falsos nega})$

**92.11**

desvest

0.022

eficiencia

$(\text{po} + \text{ne}) \times 100 / (\text{po} + \text{falpo} + \text{falne} + \text{ne})$

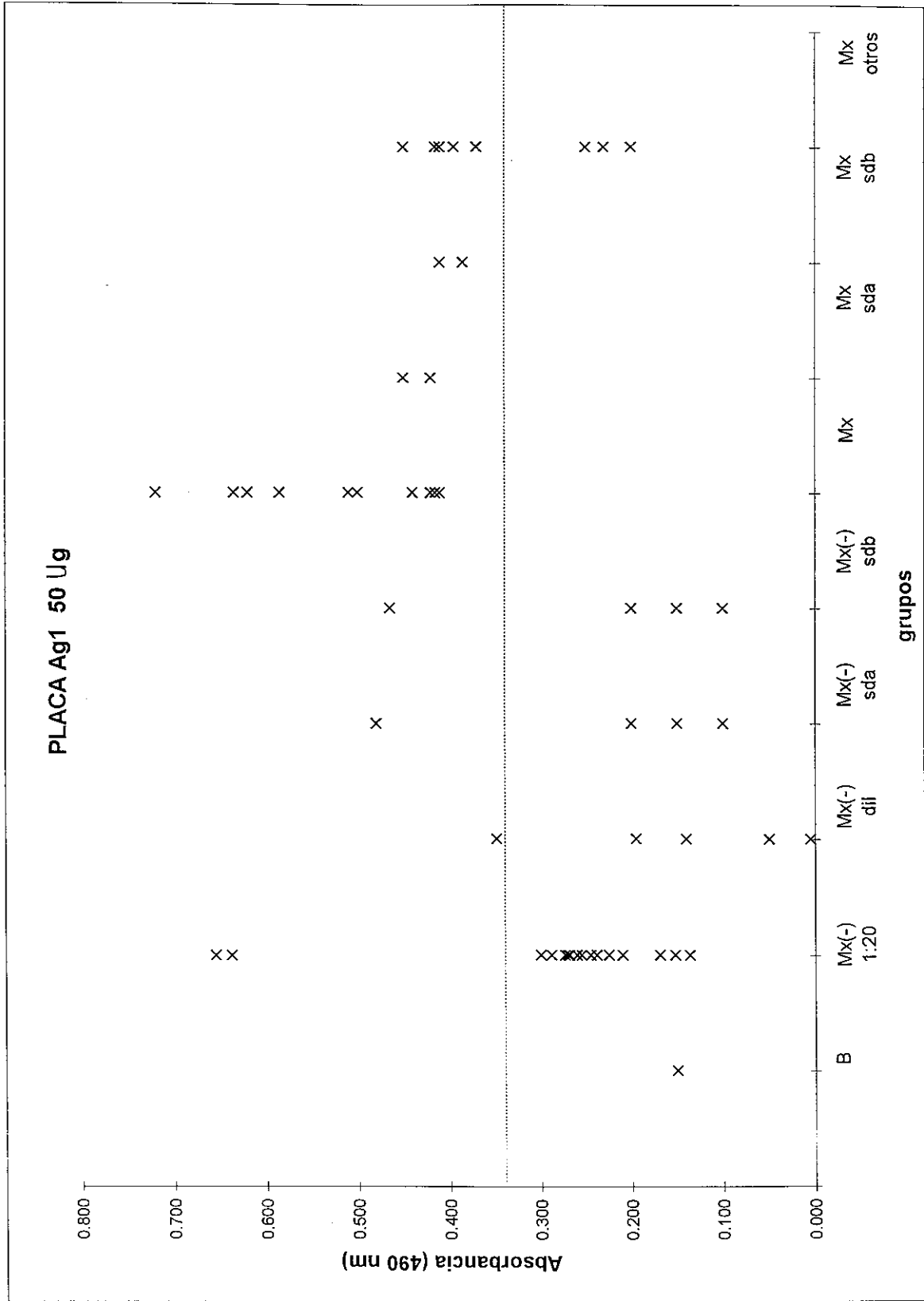
**92.23**

positivo a partir

0.357

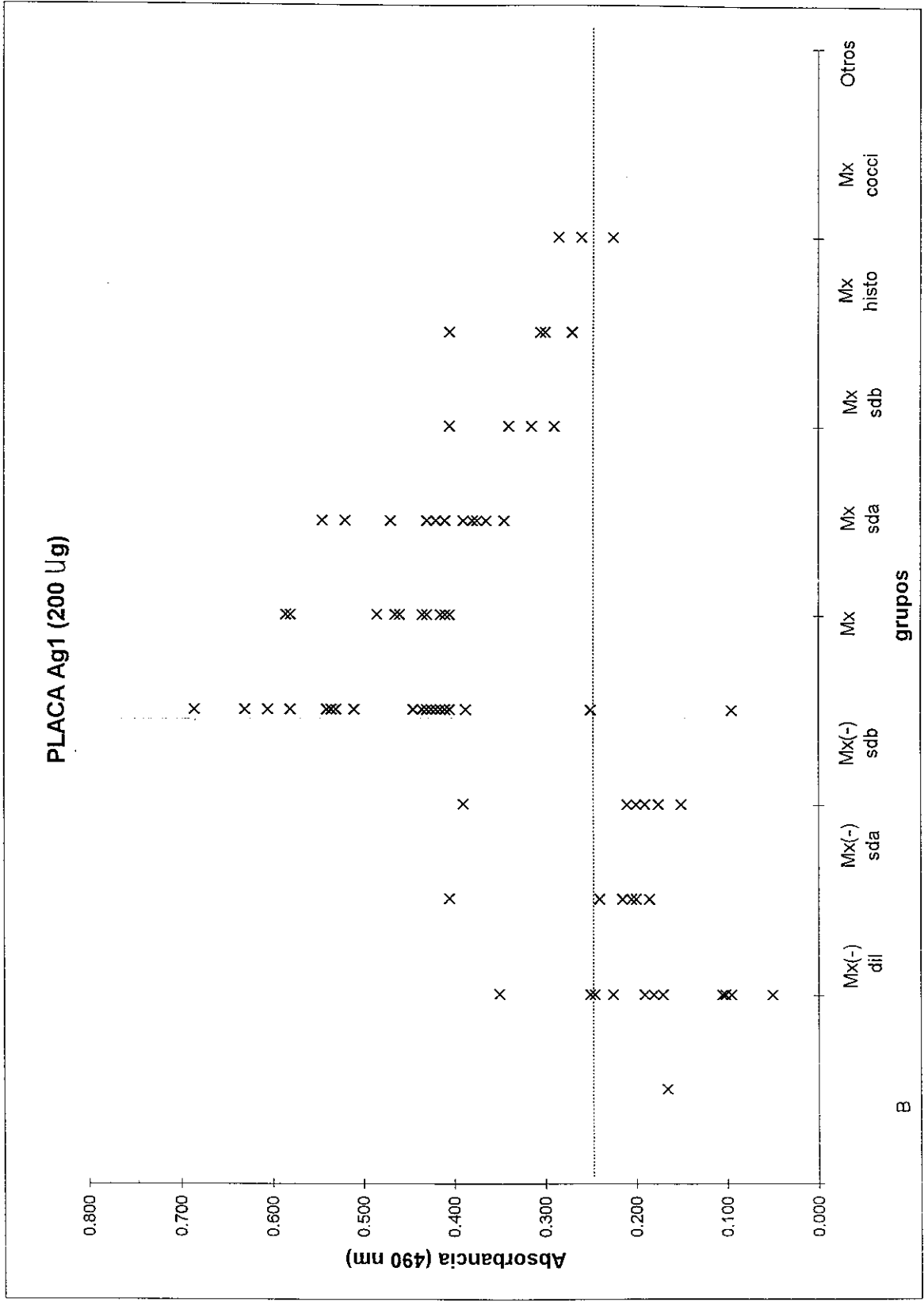


# ANEXO 9



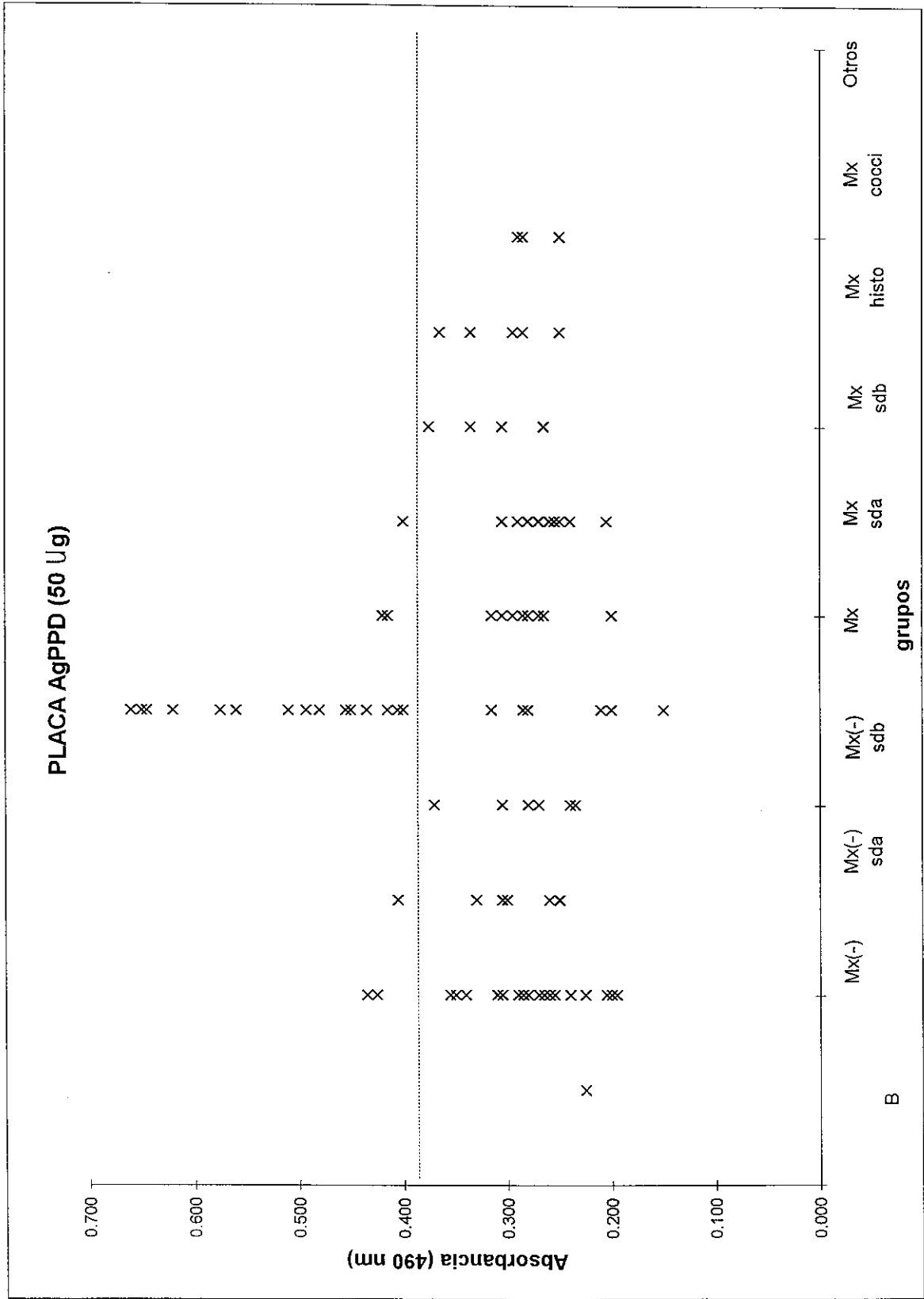


# ANEXO 9



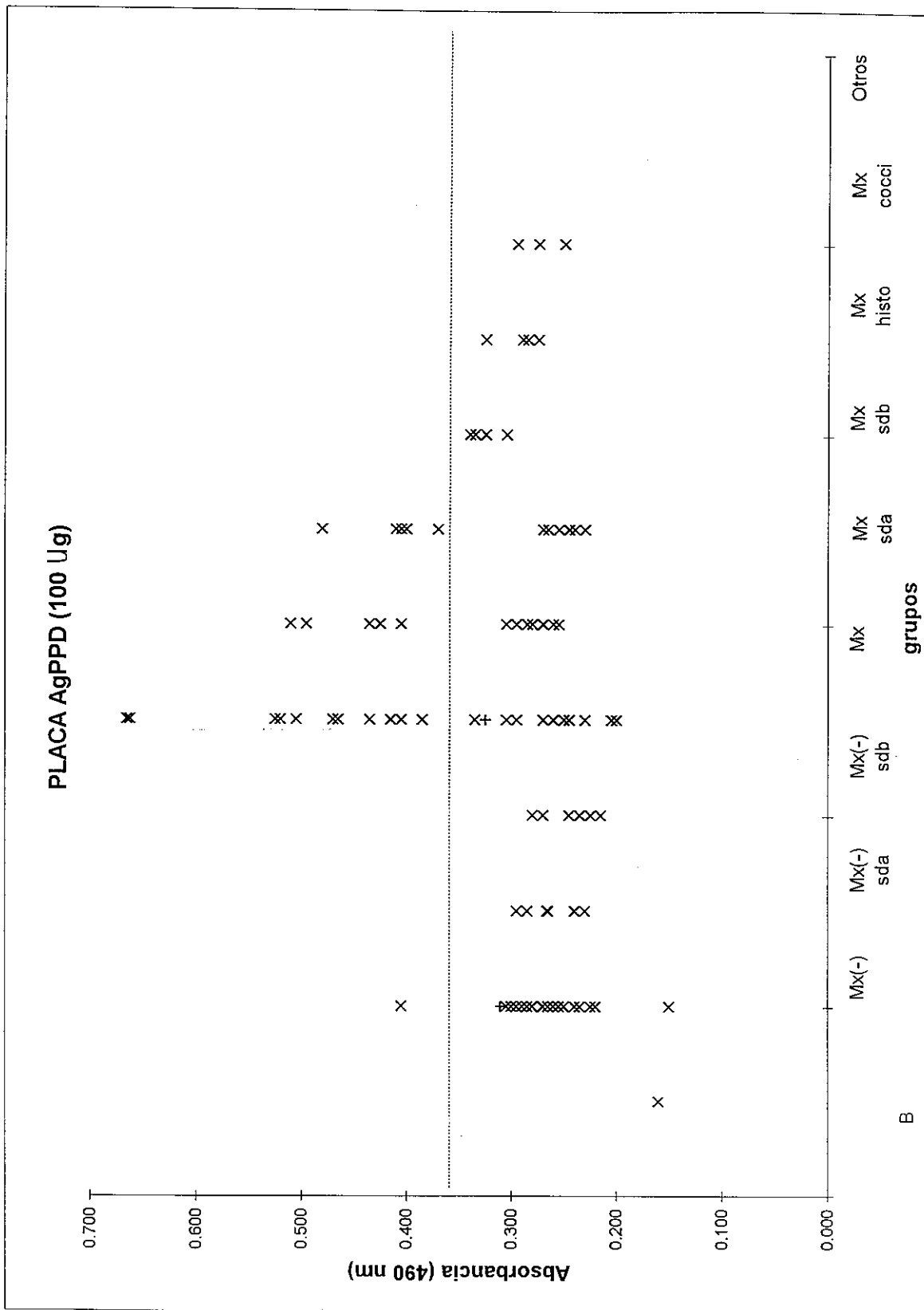


# ANEXO 10



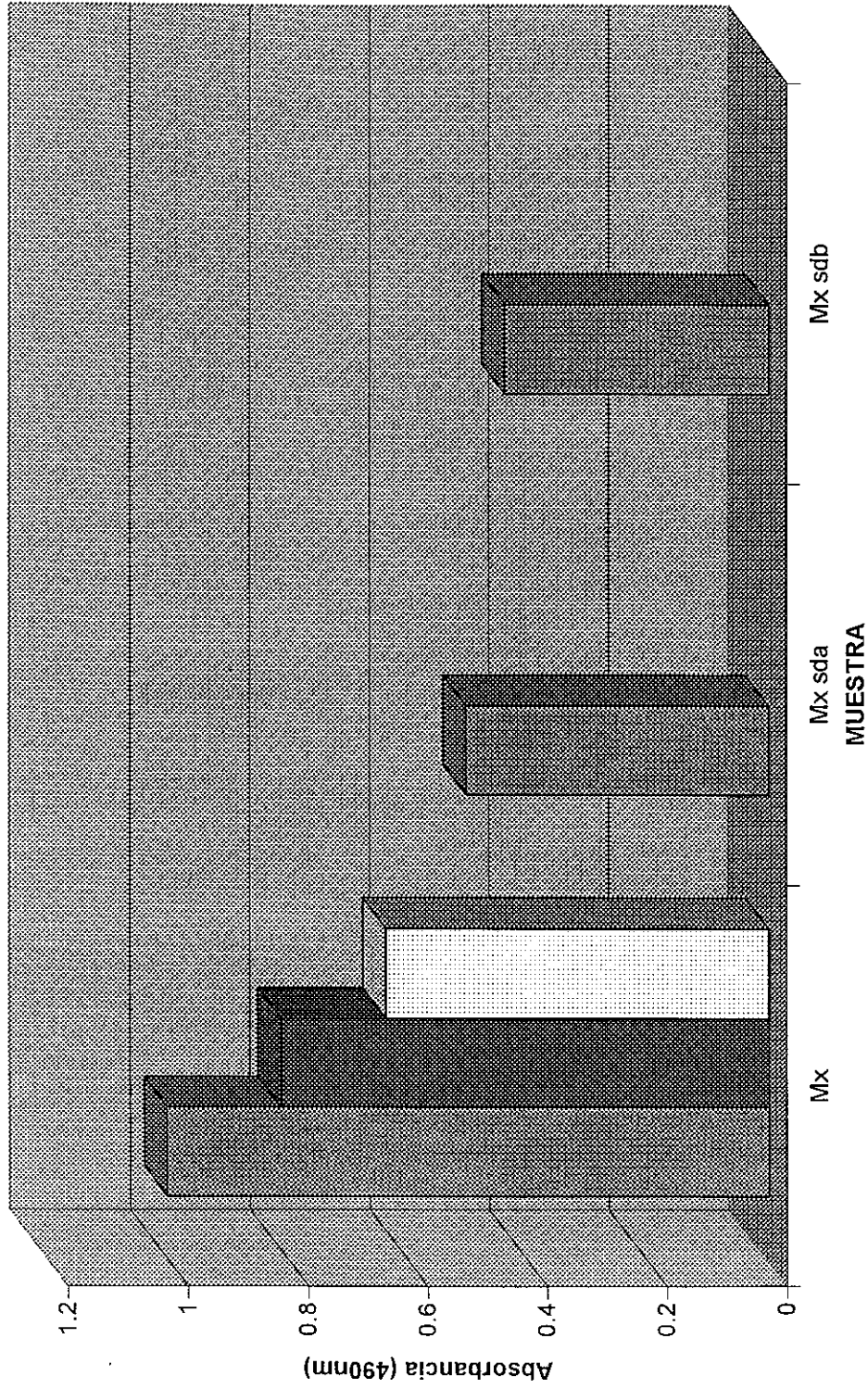


# ANEXO 10



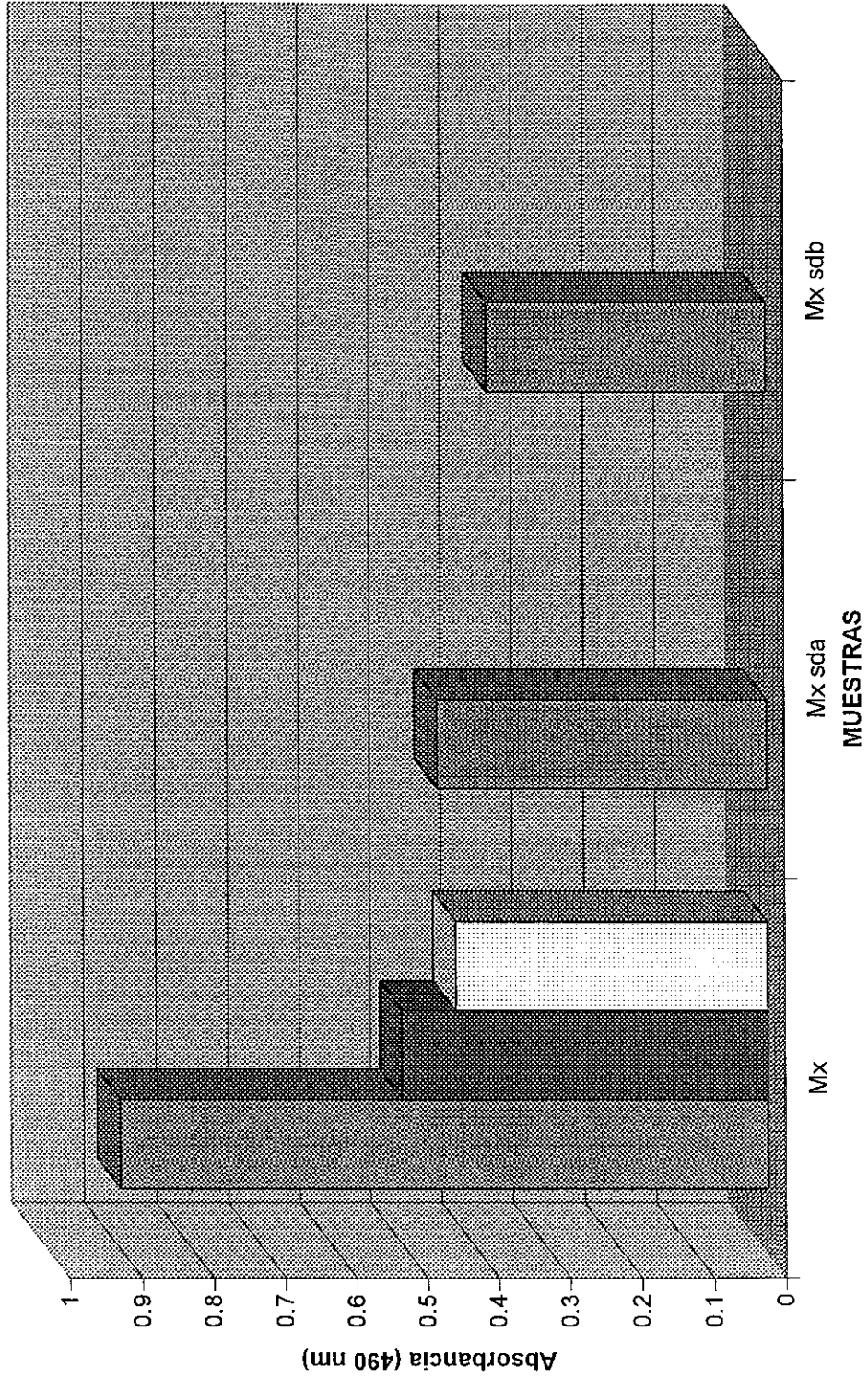
# ANEXO 11

PLACA Ag1 (100  $\mu$ g)  
(comparación mx vs. sda/sdb)



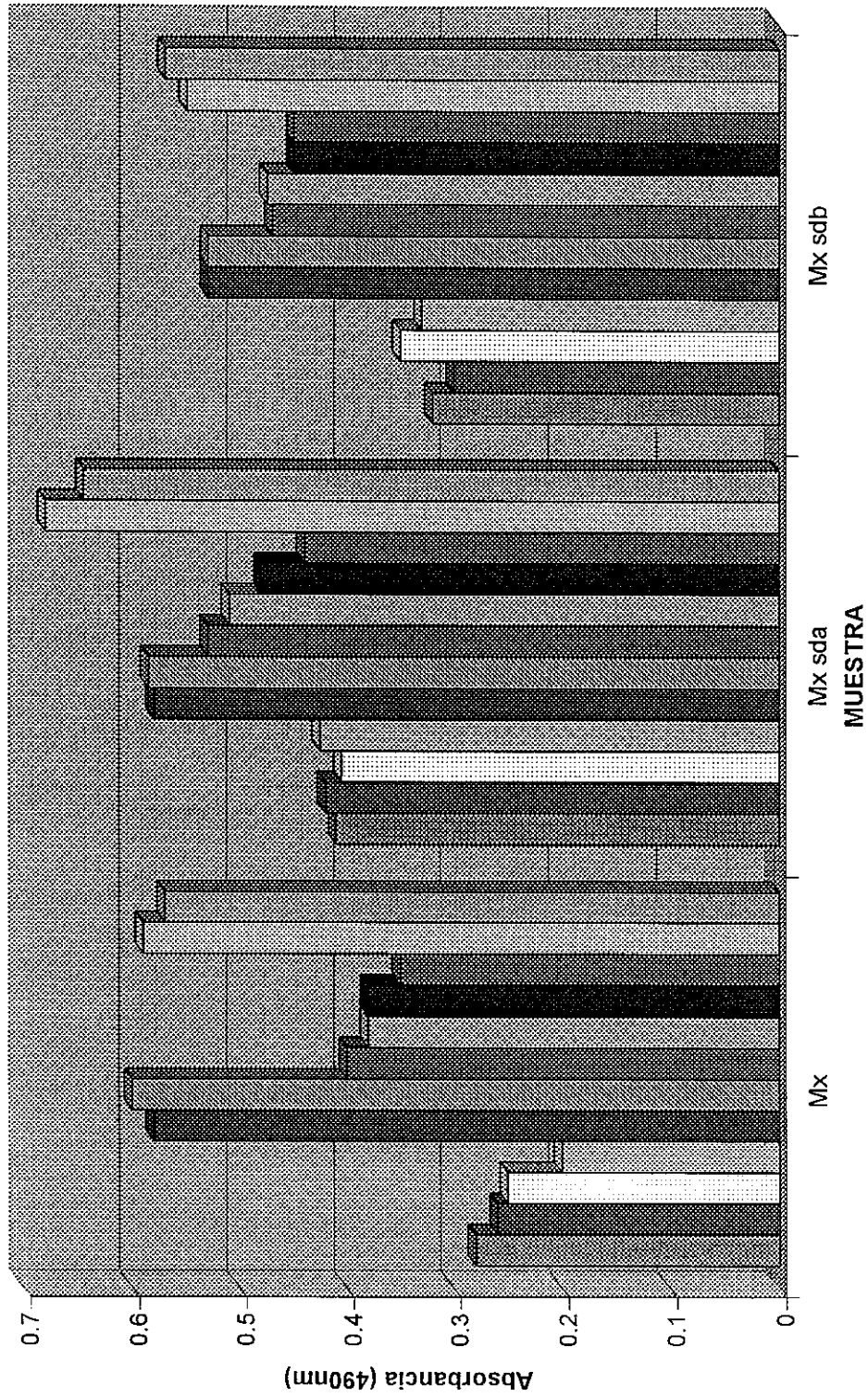
# ANEXO 11

PLACA Ag1 (200 ug)  
(comparación mx vs. sda/sdb)



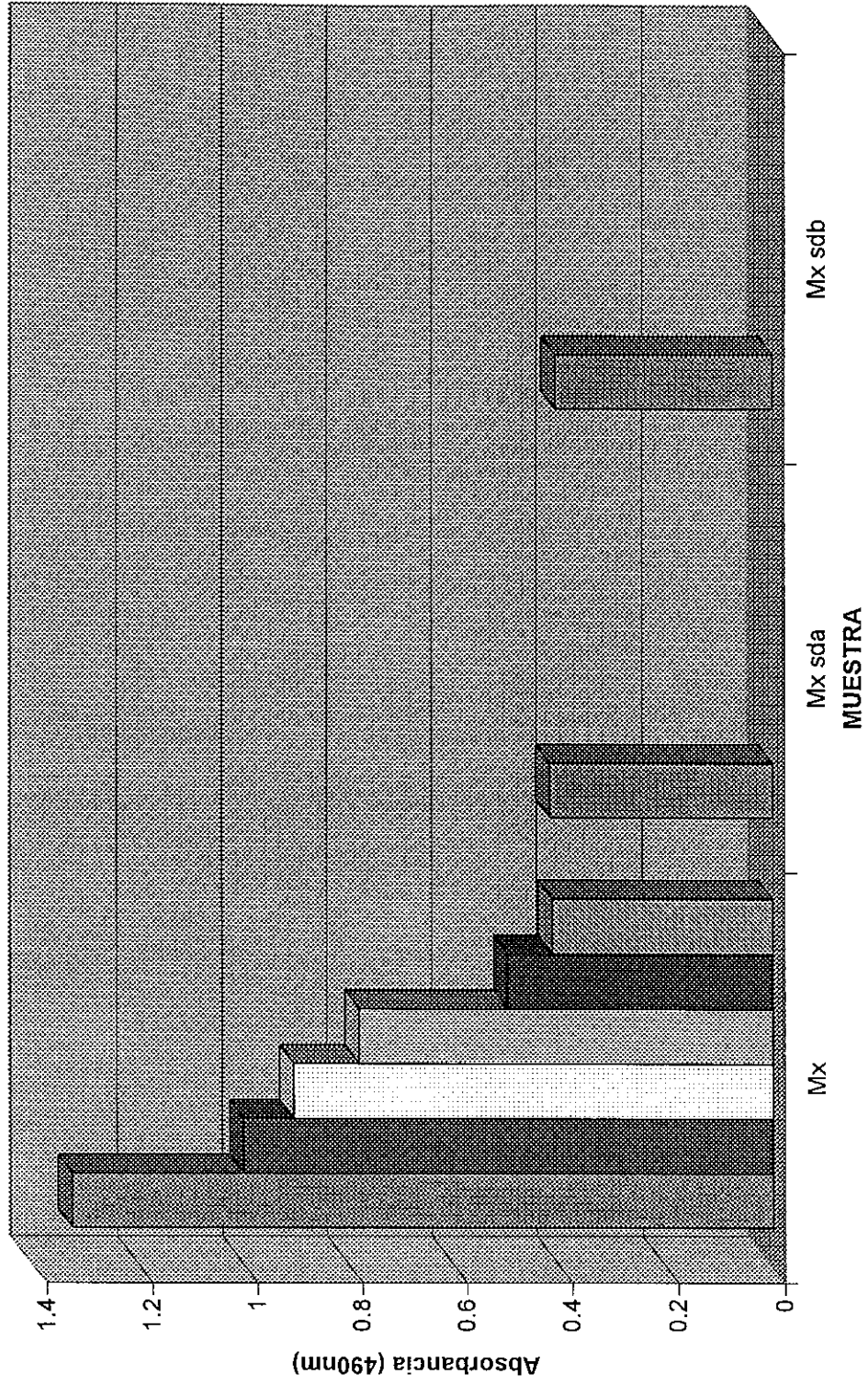
# ANEXO 11

## PLACA PATHOZYME (comparación mx vs. sda/sdb)



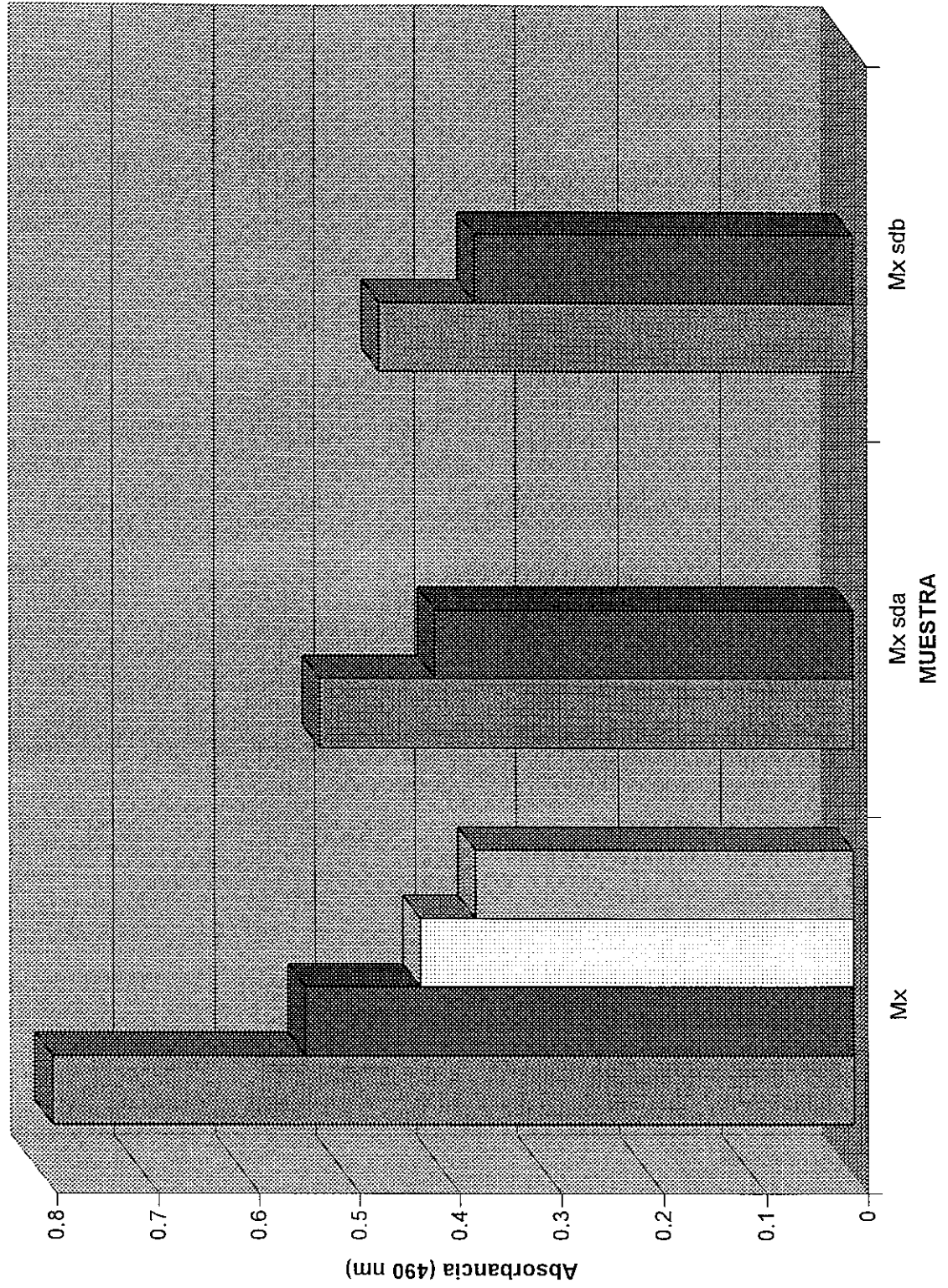
# ANEXO 11

PLACA Ag1 (50 ug)  
(comparación mx vs. sda/sdb)



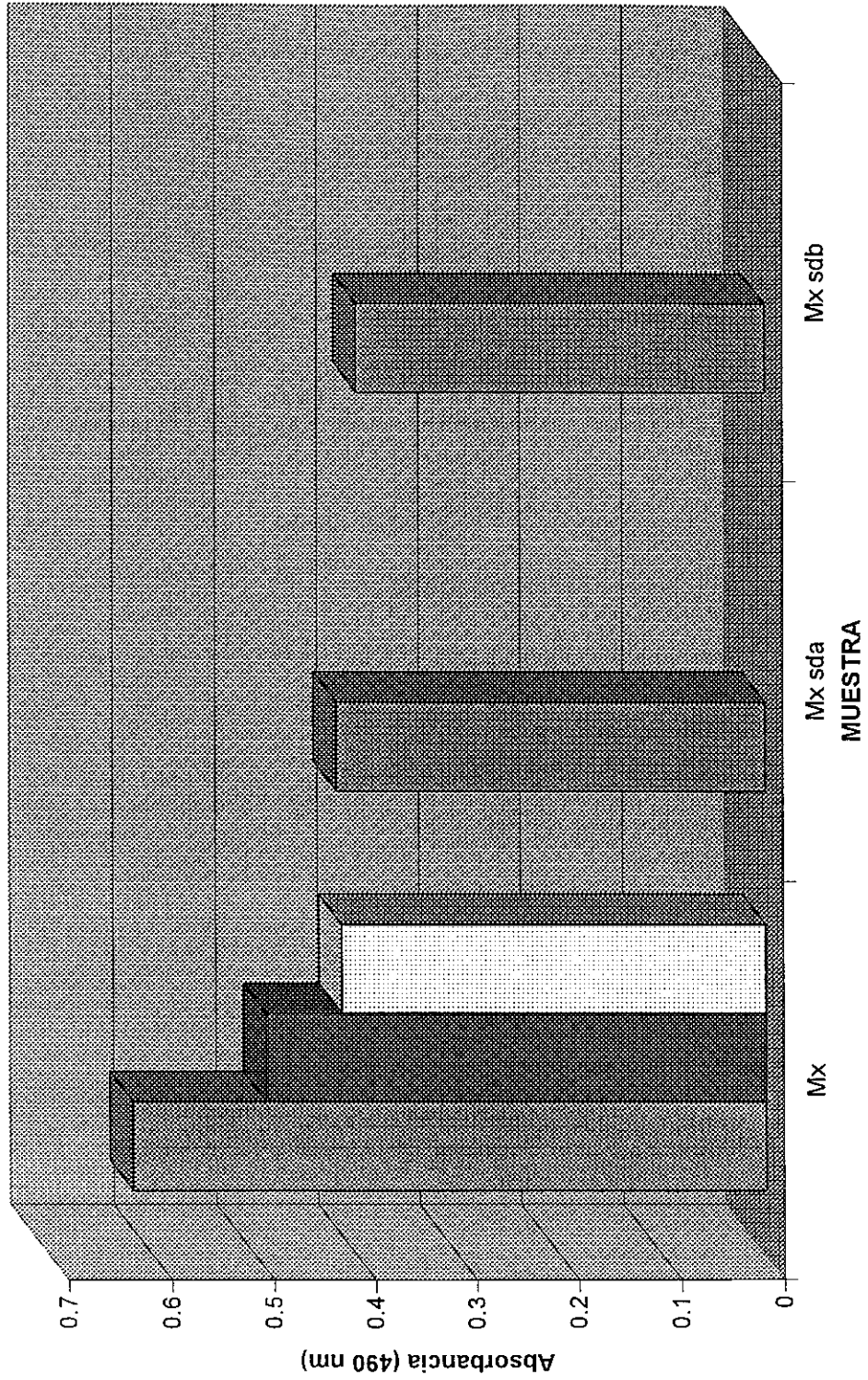
# ANEXO 11

PLACA Ag2 (50  $\mu$ g)  
(comparación mx vs. sda/sdb)



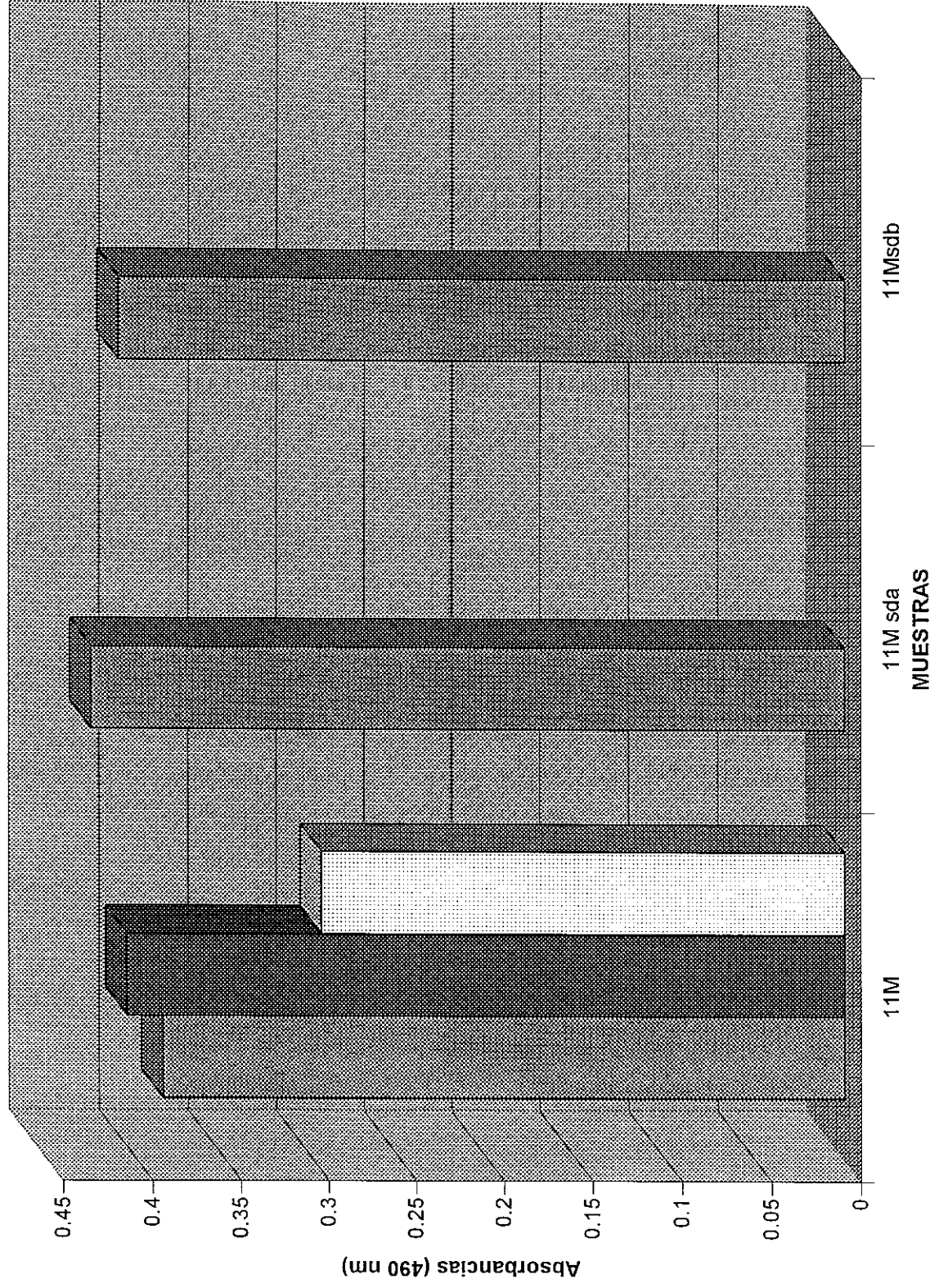
# ANEXO 11

PLACA AgPPD(50  $\mu$ g)  
(comparación mx vs. sda/sdb)



# ANEXO 11

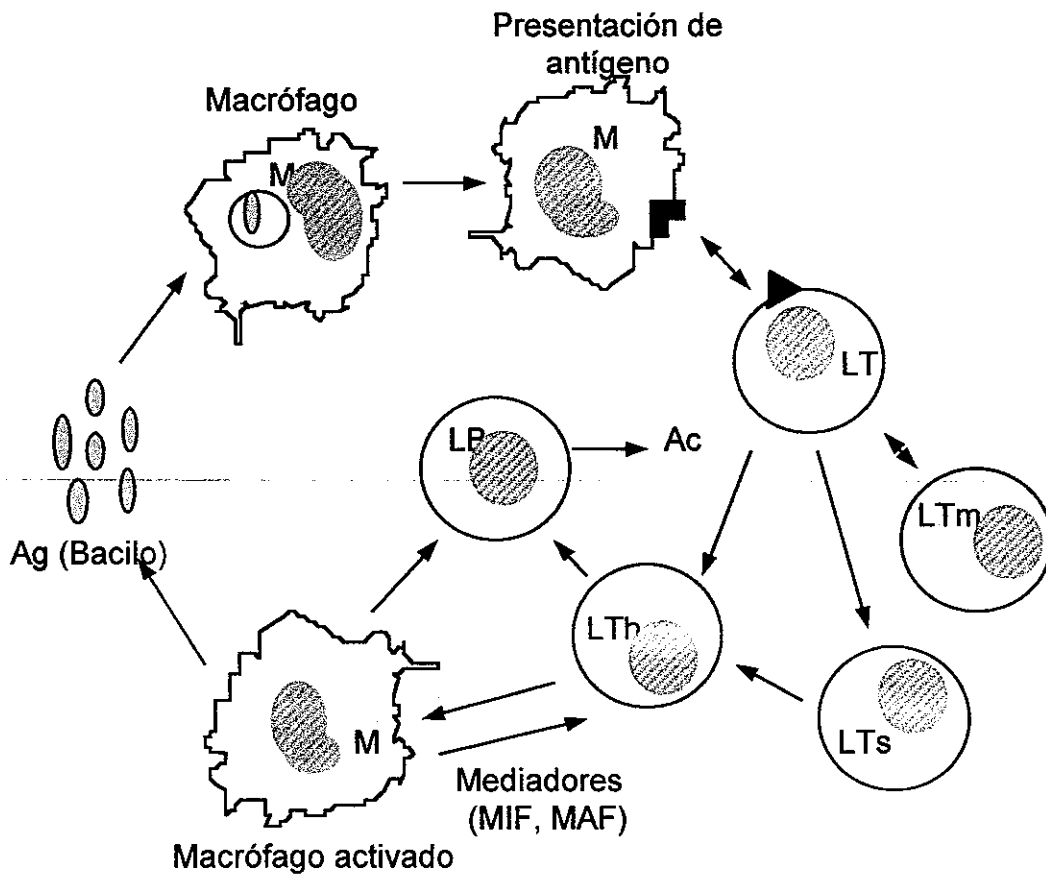
PLACA AgPPD (100  $\mu$ g)  
(comparación mx vrs. sda/sdb)





## ANEXO 12

### Respuesta inmune en la tuberculosis





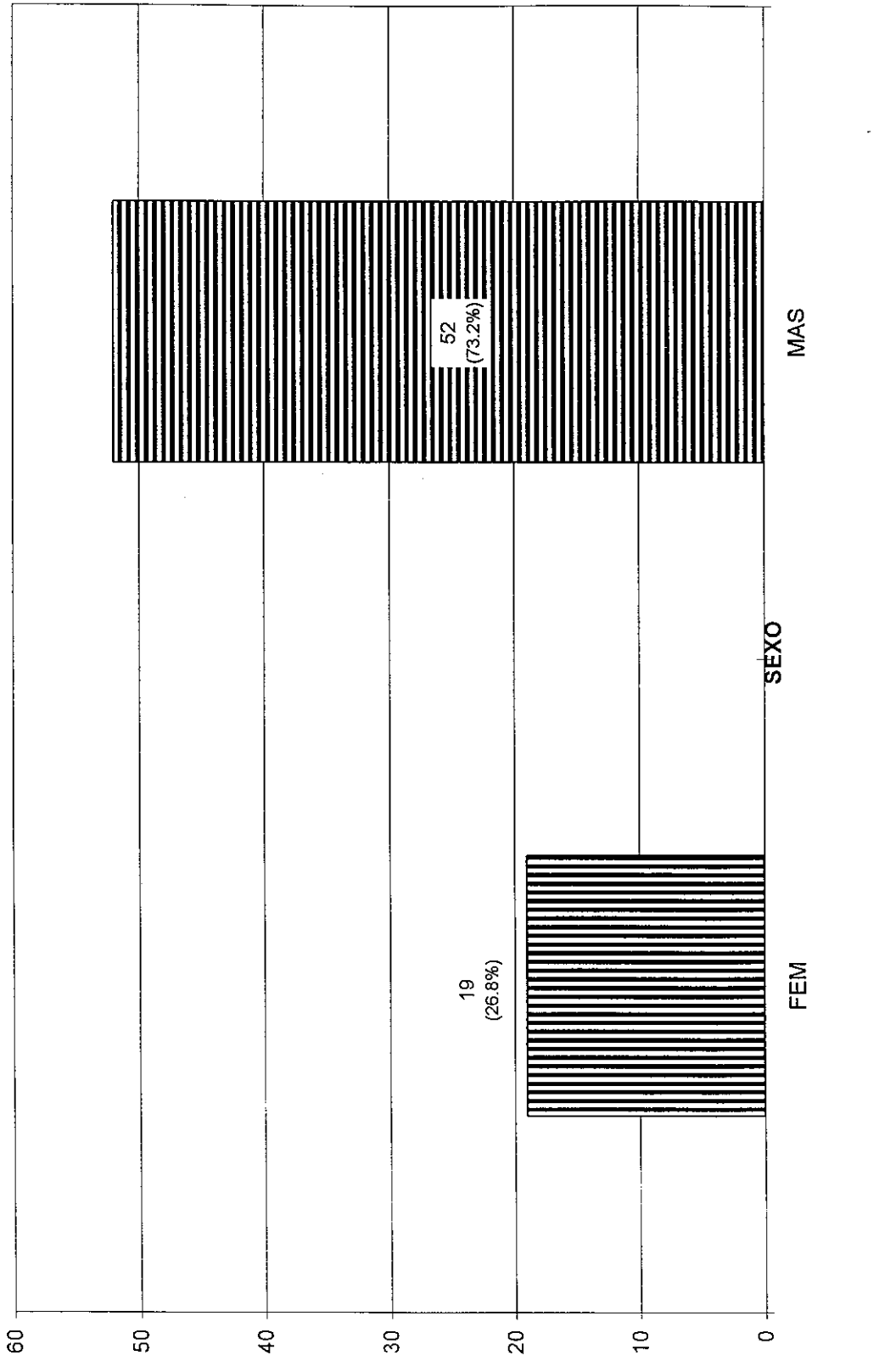
## ANEXO 13

**TABLA RESUMEN DE CASOS DE TUBERCULOSIS**

FEM	MAS	EDAD	TB PULM	TB EXTRA	SITIO EXTRAPUL	CULTI (+)	BK (+)	ELISA TB (+)	PPD (+)	VIH (+)	BCG NEG	PROCED	TOTAL
	26X	65	1			1	1					HUEHUE	2
	24X	58	1				1					QUETZAL	
	21X	54	1				1					RETALHU	
	19X	26	1			1	1					SAN MARC	
	18X	45	1			1	1					SAN MARC	
	17X	46	1			1	1					SAN MARC	
	16X	35	1				1				1	SAN MARC	
	15X	28	1				1					ESCUIN	
	14X	54	1				1					RETALHU	
	12X	63	1				1				1	SUCHITEP	
	22X	21	1									RETALHU	
	4X	38	1									RETALHU	
	11X	70	1				1				1	HUEHUE	
	8X	28	1			1	1					SAN MARC	
11XM		46	1			1						SAN MARC	
12XM		32	1			1	1					QUETZAL	
16XM		69	1				1					SUCHITEP	
19XM		23	1				1					RETALHU	
20XM		18	1			1	1				1	SAN MARC	
21XM		23	1			1	1					SAN MARC	
22XM		29	1									SUCHITEP	
24XM		17	1	1	ARTICU							QUETZAL	
25XM											1		
		35	1				1					SUCHITEP	
30XM		20		1			1					RETALHU	
19	52	37.31	65	6	GA(3),AR(2)	35	57	1	1	2	5	70	70

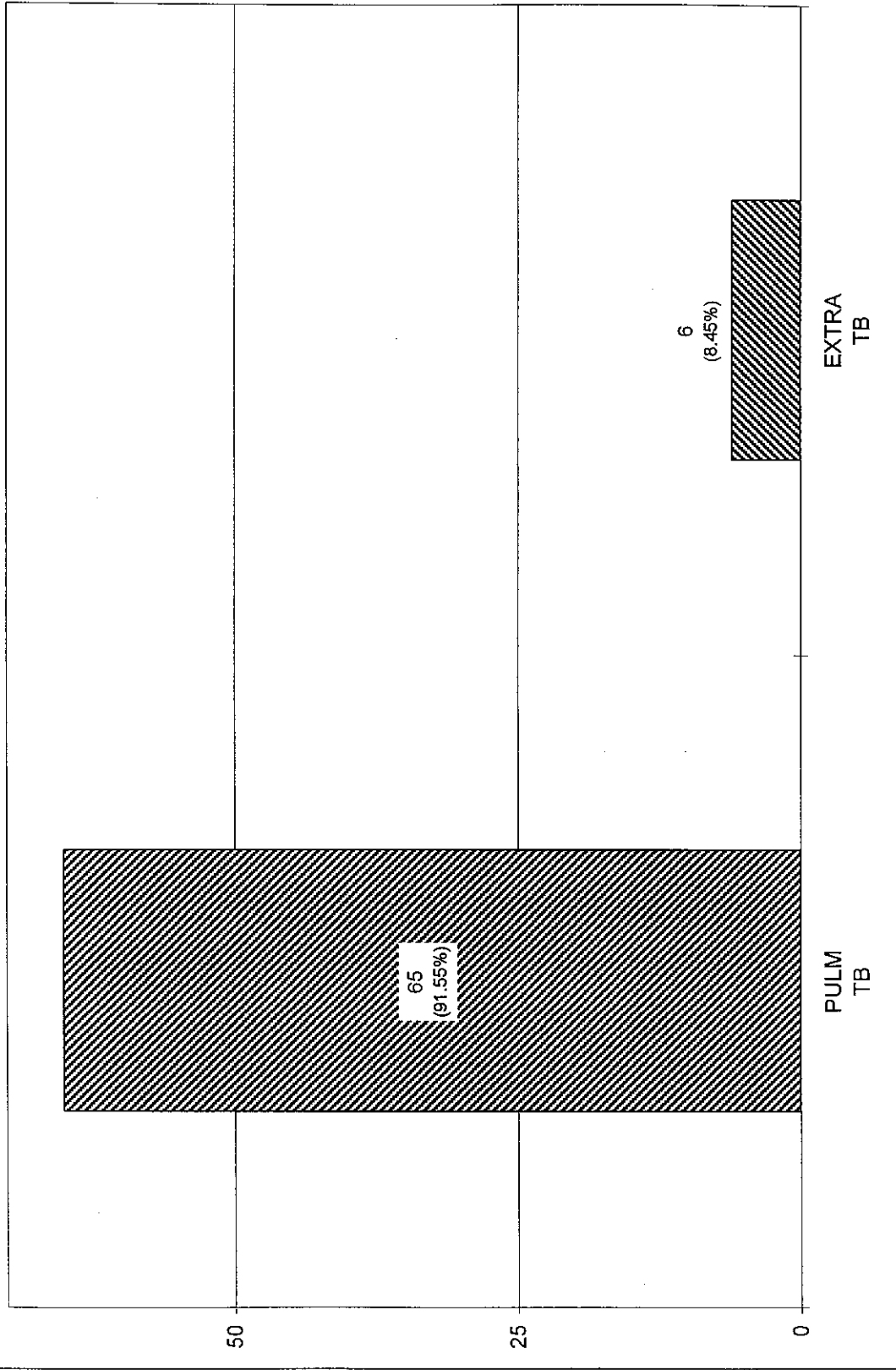
# ANEXO 13

## CASOS vs. SEXO

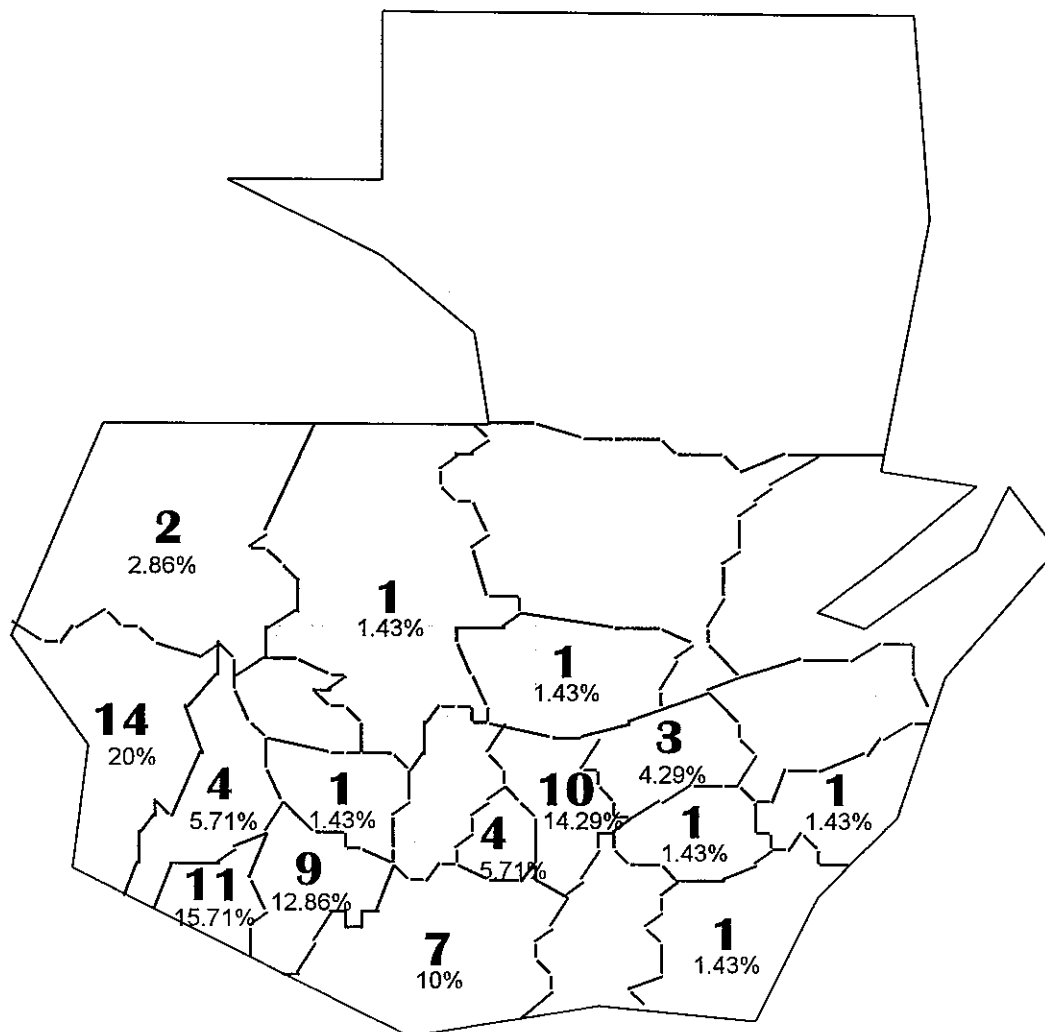


# ANEXO 13

TB PULMONAR vs TB EXTRAPULMONAR

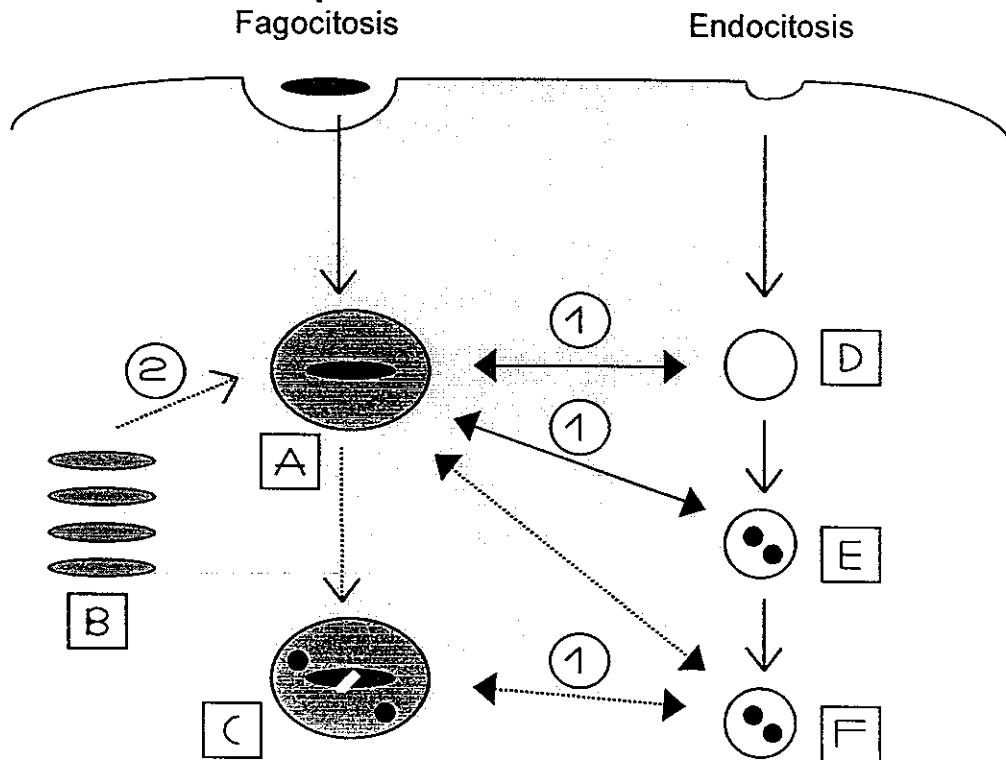


**ANEXO 13**  
**Distribución geográfica**  
**de los casos de Tuberculosis**



## ANEXO 14

### Interrupción del proceso fagocítico por *M. tuberculosis*



Los fagosomas maduran normalmente por cualquiera de los siguientes mecanismos:

- 1: Intercambio bidireccional de material con la vía endocítica y/o
- 2: Adquisición de material desde el Complejo de Golgi

A: Fagosoma  
B: Complejo de Golgi  
C: Fagolisosoma

D: Endosoma temprano  
E: Endosoma tardío  
F: Lisosoma

-----: eventos que no ocurren o son alterados cuando se fagocita a *M. tuberculosis*

**ANEXO 15**  
**Características de crecimiento e identificación**  
**de algunas micobacterias de crecimiento lento**

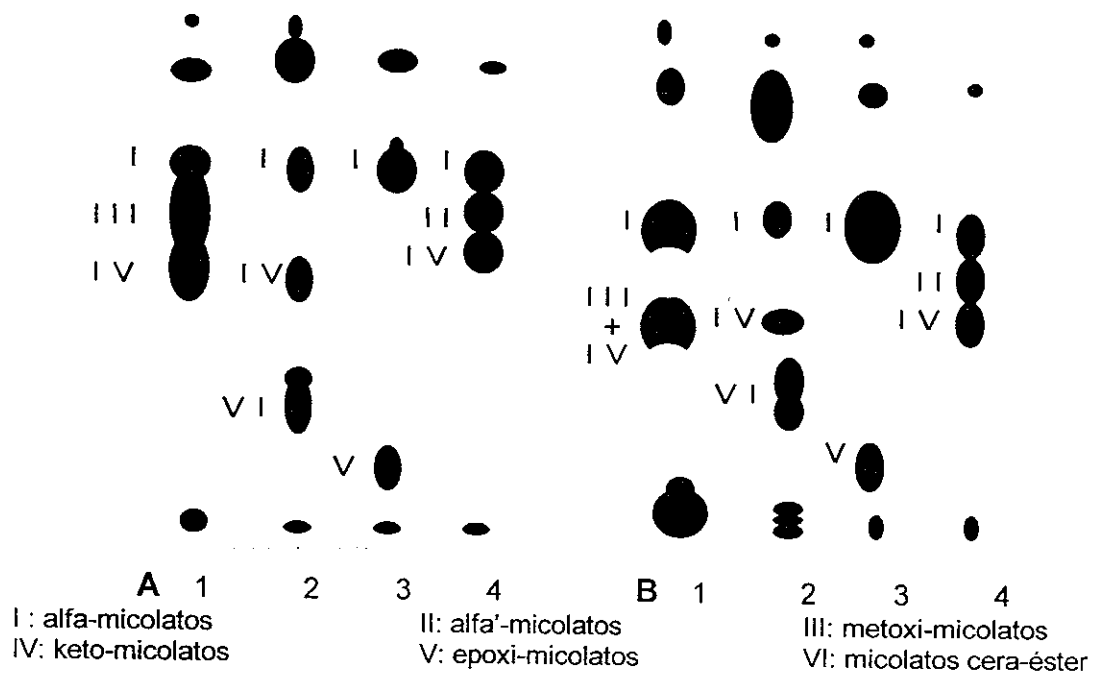
Especies	Crecimiento en < 7 días	Niacina	Reducción de nitratos		Catalasa a 68°C	Hidrólisis del Tween (días)		Reducción del telurito en 3 días
			1+	3+		5	10	
			<i>M. tuberculosis</i>	-		+	+	
<i>M. kansasii</i>	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>M. scrofulaceum</i>	-	-	-/+	-	+	-	-	-
<i>M. avium</i>	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	-	+	-	-	+

**Identificación de Cepas para**  
**el estudio de ELISA indirecto**

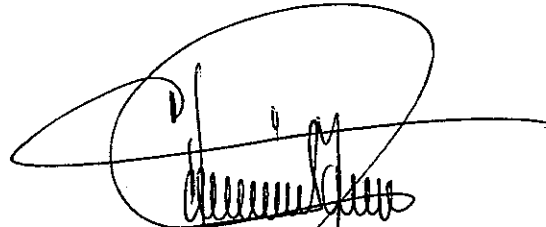
CEPA	NIACINA	CATALASA A 68°C	REDUCCION DE NITRATOS	IDENTIFICACION
4132	+	-	+	<i>M. tuberculosis</i>
4303	+	-	+	<i>M. tuberculosis</i>
5120	+	-	+	<i>M. tuberculosis</i>
9627	+	-	+	<i>M. tuberculosis</i>
9824	+	-	+	<i>M. tuberculosis</i>
13903	-	+	+	<i>M. kansasii</i>
14340	-	+	+	<i>M. kansasii</i>




**ANEXO 16**  
**Cromatograma (TLC)**  
**de metil-micolatos de**  
**varias cepas de Micobacterias**




Cromatograma (TLC) de metil-micolatos de: *M. tuberculosis* (líneas 1), *M. intracellulare* (líneas 2), *M. fortuitum* (líneas 3) y *M. simiae* (líneas 4). Los análisis se realizaron con diferentes sistemas de elución: n-hexano-éter (85:15 vol/vol) para dos corridas (A) y diclorometano (B).



Br. Héctor Alfonso Cuevas Meckler  
**TESISTA**



Licda. Ingrid V. Tabarini  
**ASESORA**



Licda. Heidi Eike Logeman Lima  
**DIRECTORA**



Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta  
**DÉCANA**