

Diagnóstico Serológico de Tuberculosis

Utilización del antígeno P32 y el antígeno SLIV, para el diagnóstico rápido y precoz de la tuberculosis por la serología (ELISA) en el Hospital Regional IHSS en San Pedro Sula, Honduras

Dubón J. M., L. Rigouts**, Portaels Françoise**

RESUMEN

Hemos examinado 148 muestras de suero provenientes de enfermos sufriendo de tuberculosis pulmonar (examen directo del esputo positivo) y extrapulmonar (ganglionar). De esos mismos pacientes, la serología VIH fue efectuada.

Según los resultados de la serología ELISA P32 y el antígeno sulfolípidico SL IV, la sensibilidad de la prueba donó valores muy bajos, de 48.6% para el antígeno P32 y 21.4% para el SL IV. La especificidad de la prueba fue de 76.9% para el antígeno P32.

RESUME

Nous avons testé 148 échantillons de serums provenant de malades atteints de tuberculose pulmonaire (examen direct du crachat positif) et extrapulmonaire (ganglionnaire). Parmi ces mêmes patients nous avons fait la sérologie VIH. Les résultats de la sérologie ELISA O32 et l'antigène sulpholipide SL TV, concernent leur sensibilité et leur spécificité. Des valeurs très basses ont

été trouvées (sensibilité de 48.6% pour la P32 et 21.4% pour le SL TV. La spécificité était de 76.9% pour la P32).

Palabras Claves. Antígeno Proteína P32, Antígeno Sulfolípidico IV, ELISA, VIH, Tuberculosis.

INTRODUCCIÓN

Las muestras que hemos examinado fueron provenientes de enfermos sufriendo de tuberculosis pulmonar o extrapulmonar (ganglionar diagnosticada por la clínica de neumología y el laboratorio (examen directo de esputo o biopsia), en el hospital del Seguro Social en San Pedro Sula. Esta es la segunda ciudad de Honduras, donde la incidencia de la tuberculosis pulmonar fue de 9 por 10,000 habitantes en 1991.^m

Los resultados que hemos obtenido por la serología utilizando como antígeno la proteína p32 puede tener un interés para la serología de la tuberculosis, como condición de poder aumentar la sensibilidad del examen.

Otra de las investigaciones sobre la utilización de diferentes antígenos lipídicos (lípidos purificados de *M. tuberculosis* y lípidos sintéticos) hemos también realizado la determinación de los anticuerpos VIH por el método de aglutinación serodia (kit comercial), en

Patólogo Clínico y Microbiólogo Médico, Hospital Regional IHSS, San Pedro Sula, Honduras.
Departamento de Microbiología, Instituto de Medicina Tropical, Prince Leopold, Ambires, Bélgica.

Alguna de las muestras para hacer una comparación entre los sujetos infectados por el virus VIH y la serología de tuberculosis positiva.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Material Los sueros

En el estudio todos los pacientes afectados por la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar, fueron casos nuevos diagnosticados en el servicio de Neumología del Hospital. Hemos incluido entre los controles, los pacientes no tuberculosos pero presentando otra patología tropical, para ver la existencia o no de reacciones cruzadas. Los controles sanos fueron también recolectados en el laboratorio de transfusión sanguínea del hospital.

Todas las muestras de suero fueron enviadas en tubos nunca a los cuales se les agregó azida de sodio al 0.01% según el método recomendado por F. Portaels, Micobacteriología IMT^{ca}. Enseguida fueron enviados al Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica por correo. A su llegada todos fueron guardados a -20 °C, antes de ser analizados.

Las 148 muestras de sueros pueden ser subdivididos en 4 grupos, según su procedencia, (cuadro 1).

GRUPO I.

a) 93 pacientes afectados de tuberculosis pulmonar, VIH + = 22, VIH (-) = 30. VIH no efectuados = 41.

b) 3 pacientes afectados de tuberculosis extrapulmonar, (ganglionar), VIH (+) = 2, VIH (-) = 1.

GRUPO II.

40 pacientes controles sanos.

GRUPO III.

12 pacientes afectados de enfermedades tropicales como la tripanosomiasis (enfermedad de Chagas). VIH (-).

Cuadro 1: Procedencia de los sueros y serología VIH.

Grupo	Proveniencia	Total de Casos	VIH		
			+	-	NT
I. tuberculosis					
	TB pulmonar	93	22	30	41
	TB Extrapulmonar	3	2	1	-
II. controles sanos (donantes de sangre)		40	-	40	-
III. enfermedades tropicales (Chagas)	12	-	12	-	-
Total		148	44	83	41

NT = No examinados TB = tuberculoso Los

Antígenos

- La P32, antígeno proteico ha sido purificado por J. De Bruyn en el Instituto Pasteur de Brabant y ha sido enviado al laboratorio de Micobacteriología del Instituto de Medicina Tropical. Se trata de un antígeno proteico identificado como Ag. 85 dentro de sistema de referencia BCG (Bacilo de Calmette)^(3,1). Es purificado a partir de filtrados de cultivos de *M. bovis* BCG privados de Zinc.
- El sulfolípido SL TV es un antígeno lipídico, las investigaciones efectuadas con los antígenos lipídicos han sido efectuadas con el sulfolípidos IV, aislado del *M. tuberculosis* por cromatografía efectuado por F. Papa, en el Instituto Pasteur de París⁽⁵⁾. Se trata del sulfato 23 diacyl trehalosa-2'⁽⁶⁾, su interés por el serodiagnóstico de la tuberculosis ha sido revelado por los trabajos de Craud y Colab.⁽⁶⁾.

A fin de comparar la sensibilidad del ELISA-SLIV y el ELISA P32, hemos efectuado los exámenes utilizando los sueros positivos por ELISA P32, es decir 14 sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar.

Método ELISA P32

Antígeno

El antígeno purificado en el Instituto Pasteur de Brabant es utilizado para efectuar el coating de las placas

Los controles con infecciones tropicales como la tripanosomiasis son en número de 12. Dentro de este grupo, 10 casos son negativos a la P32, contra 2 casos falsos positivos, sea una especificidad de 83.3%.

TES VIH	TOTAL DE CASOS	P32 (-)	P32 (+)
Negativo	28	13(46.4%)	15 (53.5%)
Positivo	6	2 (33.3%)	4 (66.6%)
TOTAL	34	15	19

Controles sanos	40	30	10	75%
Controles con infección tropical	12	10	2	83.3%
TOTAL	52	40	12	76.9%

Influencia del VIH sobre la reactividad de la P32.

Hemos efectuado la serología VIH en 34 muestras de sueros provenientes de pacientes con tuberculosis pulmonar y extrapulmonar.

Hemos encontrado que 4 pacientes VIH(+) reaccionaron positivamente a la P32 y 2 pacientes resultaron negativos. Por el contrario, 15 pacientes VIH (-) han presentado una reactividad a la P32 y 13 pacientes VIH (-), han sido negativos a la P32.

Hemos visto que los 14 casos examinados con la SL IV son todos VIH (-).

Cuadro 5: Influencia del VIH sobre la reactividad a la P32.

Los resultados obtenidos por los diferentes autores sobre la investigación de anticuerpos IgG, por el método ELISA han sido efectuados con antígenos diferentes y sobre grupos de enfermos y controles muy variables.

La sensibilidad del test ELISA varía de 51% a 97.5% en función de la localización de la tuberculosis y del antígeno utilizado. Las especificidades obtenidas por los autores varían también de 31.8% a 100%.

En nuestro estudio hemos obtenido una sensibilidad de 47.5% por todos los tuberculosos. Los resultados parecen ser variables, con el antígeno P32 Turneer y Col.⁽¹¹⁾ han encontrado una sensibilidad de 63% en los infantes con una tuberculosis pulmonar en Bélgica⁽¹¹⁾, mientras que los resultados obtenidos en Burundi⁽¹²⁾, 51% de sensibilidad son comparables a los encontrados en nuestro estudio. En las regiones de alta prevalencia, los casos llegan en un estado avanzado de enfermedad, con una tasa muy elevada de anticuerpos. La pérdida de sensibilidad del examen podría explicarse por una pérdida de actividad antigénica del antígeno P32 seguido de una mala conservación o pérdida de anticuerpos debido a la congelación de las muestras y a la adición de azida de sodio.

A fin de verificar la influencia del modo de conservación de los sueros sobre la pérdida eventual de anticuerpos antituberculosos, proponemos comparar los resultados obtenidos con sueros conservados a + 4 °C sin azida y los mismos sueros sin adicionarles azida. La tasa de anticuerpos será en cada caso examinada antes y después de la congelación a - 20 °C.

La especificidad mencionada dentro de la literatura varía de 31.8% a 100% en función del antígeno utilizado del lugar de estudio y sobre todo de los grupos controles utilizados, ZattayCol.⁽¹²⁾ encontraron una especificidad de 90%, como Kiran y Col.⁽¹³⁾ en India y Turneer y Col.⁽¹¹⁾ en Bélgica utilizando todos los controles de pacientes sanos, y respectivamente los antígenos PPD y P32. Nuestro estudio muestra una especificidad de 75% utilizando como grupo control pacientes sanos. Por el contrario, si se utiliza como controles sujetos sanos y pacientes con una infección no tuberculosa, la especificidad encontrada fue de 76.5%.

Esta investigación ha sido efectuada para conocer la existencia de reacciones cruzadas como lo había observado Zattay⁽¹²⁾. Como sabemos que a nivel de la membrana de las bacterias, existen las proteínas de "choque" que, cuando la bacteria se encuentra en período de "stress", seguido a una agresión exterior, induce la producción de anticuerpos no específicos.

En ese caso el problema viene a ser más complicado para el método serológico y hay que pensar en el uso de anticuerpos monoclonales.

En nuestro estudio no observamos reacciones cruzadas con la enfermedad de Chagas.

Por las tuberculosis pulmonares activas, Torgal y Col.⁽¹¹⁾ que utilizan como antígeno, el glipídico fenólico PGL-TB1, obtiene una sensibilidad de 97.5%, mientras que Craud y Col.^m obtiene una sensibilidad de 59% con el antígeno lipídico SL IV que es un sulfolípid. Nuestra sensibilidad es muy baja (21.4%), comparada a la obtenida con la P32. A primera vista pareciera que el test ELISA SL IV sea menos sensible que el test ELISA P32. Sería por lo tanto mucho mejor de examinar un mayor número de sueros antes de obtener conclusiones definitivas.

De una manera general, sería interesante analizar varias centenas de muestras de sueros dentro de una población muy grande. Habría también de determinar si el antígeno P32 pierde su actividad durante un período determinado y si la conservación y transporte de sueros ejercen una influencia sobre la tasa de anticuerpos IgG medidos.

La infección VIH no influye en la sensibilidad del test ELISA P32. Estos resultados concuerdan con aquellos obtenidos precedentemente con el Antígeno 60⁽⁸⁾. Estos resultados son importantes porque la tuberculosis está asociada a la infección VIH, en las regiones donde la prevalencia de las dos infecciones es elevada.

Esta asociación debe de estar presente en los clínicos que deberán pensar en la posibilidad de una tuberculosis en todo paciente VIH(+) e inversamente, en una infección VIH en todo paciente al cual un diagnóstico de tuberculosis es efectuado. La puesta en ruta de un tratamiento precoz, es por lo tanto más importante ya que la enfermedad es contagiosa.

CONCLUSIONES

La sensibilidad y la especificidad han sido estudiadas en 14 sueros provenientes de Honduras. Se trata de 93 muestras de pacientes con tuberculosis pulmonar, 3 pacientes con tuberculosis extrapulmonar(ganglionar). 12 muestras de pacientes con enfermedad de Chagas y 40 muestras de controles sanos.

El estudio de la sensibilidad con la prueba ELISA P32, donó valores de 48.6 % para la tuberculosis pulmonar y 33% para la tuberculosis extrapulmonar. Estos dos valores son muy bajos considerando que en el país la prevalencia de la enfermedad es elevada.

La especificidad de la prueba ELISA P32 es de 75% para los controles sanos, esto corresponde a los resultados obtenidos en otros estudios, por lo tanto en nuestro estudio, la especificidad no es influenciada por la enfermedad de Chagas. La sensibilidad de la prueba ELISA SL IV es muy baja (21.4%), comparada con la encontrada con la P32 (48.6%).

Es posible que estos valores muy bajos de sensibilidad sean debidos a una pérdida de anticuerpos unida a los modos de conservación de los sueros. Deben de compararse diversos modos de conservación de sueros a fin de elucidar este problema.

Dentro de las condiciones de nuestro trabajo, la serología de la tuberculosis no parece presentar una ventaja comparado al diagnóstico clásico de la enfermedad por el examen directo.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo se llevó a cabo gracias a la colaboración de la Fundación Padre Damien de Bruselas, Bélgica.

REFERENCIAS

1. Rivera Ada. Reporte Anual Estadístico, Departamento de Medicina Preventiva, San Pedro Sula, Marzo 1991.
2. Portaels F, De Bruyn J, Bosseloir Y, d'Hoop MH, Rigouts L. Rapid, early and specific diagnosis of tuberculosis and other Mycobacterial diseases. Second periodic progress report contract No. TS2-0136-B, personal communication 1990.
3. De Bruyn J, Bosmans R, Turneer M, Weckx M, Nuabenda J, Van Vooren J, Falmagne P, Wiker HG, Harboe, M. Purification, partial characterization and identification of a skinreactive protein antigen of *M. bovis* BCG. *Infect Immun* 1987;55: 245-252.

4. Closs O, Harboe M, Axelsen N H, Bunch-Christensen K, Magnusson M. The antigens of *M. bovis*, strain BCG, studied by crossed immunoelectrophoresis: a reference system. *Scand J Immunol* 1980; 12: 249-263.
5. Papa f. Antigenicity and specificity off selected glycolipid fractions from *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol* 1989; 140: 569-578.
6. Cruaud Ph, Berlie C, Torgal García J, Papa F, David HL. Human IgG antibodies immunoreacting with specific sulfolipids from *Mycobacterium tuberculosis*. *Zentrallbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A* 1989; 271:481-485.
7. Mattar S, Broquetas JM, Gea J, Aran X, Sauleda J, Torres JM. Comparison of single and dual antigens (PPD, A60, ELISA) on serodiagnosis of tuberculosis. Abstract World Conference on Lung Health. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: A804.
8. Rigouts L, Collart JP, Gogase P, Kadende P, Kaboto M, Perriens J, Willame JC, Prignot J, Portaels F. Serological diagnosis of pulmonary tuberculosis and tuberculous adenitis in HIV positive and HIV negative patients from Central Africa (Zaire and Burundi). Abstract World Conference on Lung Health. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: A226.
9. Streobel AB, Daniel TM, Lau JHK, Leong JCY, Richarson H. Serologic diagnosis of bone and joint tuberculosis by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Inf Dis* 1982; 146:280-283.
10. Torgal-García J, David HL, Papa F. Preliminary evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* phenoglycolipid antigen in the serologic diagnosis of tuberculosis. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1988; 139:289-294.
11. Turneer M, Van Vooren JP, De Bruyn J, Serruys E, Dierckx P, Yernault JC. Humoral Immune response in human tuberculosis: Immunoglobulines G, A, and M directed against the purified P32 protein antigen of *Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin*. *J Clin Microbiol* 1988; 26:1714-1719.
12. Zattla F, Petithory JC. L'ELISA avec l'antigene A60 dans lediagnostic de la tuberculose. Reactions croisees dans le leishmaniose viscerale. *Techn et Biol* 1989; 5: 220-225.
13. Kiran U, Shrinivas, Kumar R, Sharma A. Efficacy of three mycobacterial antigens in the serodiagnosis of tuberculosis. *Eur J Respir Dis* 1985; 66:187-195.