

Evaluación de la prueba de ELISA para anticuerpos contra el antígeno micobacterial P-90 en el diagnóstico de tuberculosis

ALFONZO URIBE¹, OSWALDO JAVE², JAIME ALEGRE³, MARCO VALLADARES², HÉCTOR DÍAZ²,
ANTENOR HERNÁNDEZ², ANTONIO SALAS², TERESA MONTOYA³, ELVIA ÁLVAREZ⁴.

¹Director del Hospital Nacional Dos de Mayo. UNMSM.

²Hospital Dos de Mayo. ³Médico Serumista. ⁴Enfermera Hospital Dos de Mayo.

RESUMEN

OBJETIVO: Determinar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico serológico mediante la detección de IgA específica para tuberculosis (TB). **DISEÑO:** Estudio observacional, prospectivo, de casos y controles. **LUGAR:** Hospital Nacional Dos de Mayo, en el período de octubre de 1998 hasta marzo de 1999. **MATERIALES Y MÉTODOS:** Se evaluó 81 casos de tuberculosis demostrados mediante frotis y cultivo y/o biopsia positiva para bacilo de Koch (BK) y 86 controles demostrados sanos. Se utilizó la prueba de diagnóstico serológico de TB mediante la respuesta de IgA al antígeno P-90, con la prueba de enzima inmunoabsorbente (kit Kreatech EIA-TB, Amsterdam, Holanda), preparada a partir del BCG. **RESULTADOS:** La sensibilidad de la prueba es 96,3%, la especificidad 77,9%. **CONCLUSIONES:** La detección de inmunoglobulina A mediante el antígeno clase Kp-90 Im CRAC del *Mycobacterium tuberculosis* no es de utilidad complementaria en el diagnóstico de tuberculosis, especialmente en el gran porcentaje de pacientes que es tratado como BK negativo.

Palabras claves: Tuberculosis pulmonar; serodiagnóstico; técnicas inmunológicas; ELISA.

EVALUATION OF ELISA ANTIBODIES TEST AGAINST P-90 MYCOBACTERIAL ANTIGEN IN TUBERCULOSIS DIAGNOSIS

SUMMARY

OBJECTIVE: To determine the serologic tuberculosis-specific IgA test's sensitivity and specificity. **DESIGN:** Prospective case-control study. **SETTING:** Hospital Nacional Dos de Mayo from October 1998 through March 1999. **MATERIAL AND METHODS:** Eighty-one tuberculosis cases diagnosed by smear and culture and/or Koch bacillus positive biopsy, and 86 healthy controls. The tuberculosis serologic diagnosis was done by IgA response to P-90 antigen by immune absorbent enzyme test (EIA-TB®, Kreatech; Amsterdam, the Netherlands) prepared from BCG. **RESULTS:** The test sensitivity was 96,3%, and specificity 77,9%. **CONCLUSIONS:** IgA detection by *Mycobacterium tuberculosis* Kp 90 Im CRAC antigen is not useful in tuberculosis diagnosis, especially in the important percentage of BK negative treated patients.

Key words: Tuberculosis, pulmonary; serodiagnosis; immunologic techniques; enzyme-linked immunosorbent.

Correspondencia:

Dr. Alfonso Uribe Barreto
Hospital Nacional Dos de Mayo
Parque de la Medicina s/n. Lima 1, Perú
E-mail: direh2m@amauta.rcp.net.pe

INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas más serios de Salud Pública en el ámbito mundial es la tuberculosis. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en los países en desarrollo ocurren 1,3 millones de casos cada año. Desde el punto de vista económico, afecta en mayor porcentaje a la población más pobre y económicamente activa (1).

La tuberculosis es la principal causa de muerte por agentes infecciosos, y causa 7% de todas las defunciones, pudiéndose prevenir 26% de ellas.

El incremento rápido de la infección VIH y los factores sociales –como la drogadicción, el hacinamiento y el desarrollo de multiresistencia bacteriana– son problemas importantes en el resurgimiento de esta enfermedad (3-5).

El Hospital Nacional Dos de Mayo, atiende y diagnostica a 4% de la población de tuberculosos de todo el país. Nuestro país tiene una de las más altas tasas de prevalencia de tuberculosis a nivel latinoamericano (165,4 x 100 000 habitantes), según informes de la Organización Panamericana de la Salud (24 de marzo de 1999) (1,2).

El método de diagnóstico bacteriológico directo, a pesar de tener limitaciones por la necesidad de hallar el bacilo, con un alto riesgo de contaminación para el personal de laboratorio, tiene una sensibilidad de 60%. El método de diagnóstico bacteriológico por cultivo demora seis a ocho semanas, y las posibilidades de utilizar métodos de cultivo más rápidos, como BACTEC, son muy limitadas en nuestro medio.

El Laboratorio Kreatech de Holanda realizó un proyecto internacional EUREKA, financiado por la Comunidad Europea, que concluyó el año pasado, en el que demuestra que el método de diagnóstico en estudio tiene una sensibilidad de 70% y una especificidad de 92% (6-9). El mismo estudio ha sido realizado en varios países, siendo el más importante el de Alifano y col. publicado en la revista *Chest* el año 1997 (10).

El Perú, un país con alta prevalencia de tuberculosis, tiene entre sus más graves debilidades el diagnóstico tardío y el costo alto en los casos BK negativos de TBC pulmonar y extrapulmonar en adultos y niños; ello llega a superar el 20% del total de casos de TBC (3) y la presencia de casos nuevos con resistencia primaria al tratamiento (4). En estas circunstancias, la búsqueda de un método de diagnóstico precoz, complementario, de tuberculosis es importante para disminuir la morbimortalidad o evitar secuelas discapacitantes dadas por el inicio tardío del tratamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente es un estudio observacional, prospectivo, de casos y controles, con un nivel de significación estadística de $\alpha = 0,05$, buscando la diferencia entre la prueba de diagnóstico serológico mediante la detección de IgA específica para tuberculosis con el método de diagnóstico bacteriológico.

Se utilizó el método de Elisa, mediante la prueba inmunoabsorbente (EIA) (8) de unidades arbitrarias, utilizando la placa microtituladora cubierta con Kp-90 e incubadora (kit Kreatech EIA-TBO®, Kreatech; Amsterdam, Holanda).

El procedimiento de medición, el EIA, fue presentado como un dosaje inmunoenzimático sobre una base sólida. El punto de corte utilizado fue 0,259, según lo especificado por el fabricante.

Luego, muestras de suero humano fueron distribuidas en pequeños pozos de la placa microtituladora y cubiertos con Kp-90. Se permitió la incubación hasta la formación de complejos antígeno-anticuerpo. Los pequeños pozos fueron incubados con peroxidasa marcada con anticuerpo IgA antihumano secundario.

Los componentes que no se fijaron, subsecuentemente fueron extraídos y la presencia de anticuerpos específicos IgA se reveló por una reacción de color.

Los casos fueron pacientes de cualquier edad, con baciloscopia directa y cultivo y/o biopsia positivo (bronquial o transbronquial) y que no hubieran recibido tratamiento farmacológico antituberculoso durante por lo menos seis meses antes del estudio. Ellos tenían serología VIH negativa, sin antecedente de TB previa, registrados en el Programa de Control de Tuberculosis. Los pacientes ingresaron al estudio de manera secuencial.

El grupo control estuvo constituido por 86 personas, sin antecedente de TB ni evidencia de enfermedad TB actual, que no hubieran estado en contacto con pacientes TB en los últimos cuatro años. Para aumentar los márgenes de seguridad, se les tomó un control radiológico de tórax (fotorroentgen o radiografía de tórax estándar) y se les aplicó PPD, con resultados menores de 10 mm.

Se excluyó a las personas que hubieran recibido amoxicilina + ácido clavulánico o quinolonas por más de tres días, dentro de los últimos tres meses.

Para determinar las diferencias entre los grupos de casos y controles se utilizó las pruebas de sensibilidad, especificidad. Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas con el paquete de SPSS versión 7,5.

RESULTADOS

Los tipos de tuberculosis evaluados correspondieron a los siguientes:

TB pulmonar	35 casos
TB miliar	07 casos
TB pleural	28 casos
TB dérmica	02 casos
TB enteroperitoneal	01 caso
TB renal	02 casos
TB ganglionar	03 casos
TB vertebral	01 caso
Meningoencefalitis TB	02 casos
Total	81 casos

Tabla 1.- Pacientes sometidos a la prueba de ELISA, según edad.

Edad (años)	Casos		Controles		Total	
	n	%	n	%	n	%
0-15	5	6,2	0	0,0	5	3,0
16-30	32	39,5	82	95,3	114	68,3
31-45	24	29,7	3	3,5	27	16,1
46-60	10	12,3	0	0,0	10	6,0
61 a ≥	10	12,3	1	1,2	11	6,6
Total	81	100,0	86	100,0	167	100,0

Se realizó 167 pruebas de ELISA entre los casos y controles, los mismos que se registra en la Tabla 1, según la edad.

Se valoró la hemoglobina en tres categorías, lo que se explica en la Tabla 2.

El grado de anemia entre los casos y controles tiene diferencia en nuestra población estudiada (⁵).

Se encontró relación directa entre los niveles de IgA y el número de cruces de baciloscopia directa en esputo. No se consideró los hallazgos de BK en cultivos y/o biopsias.

Tabla 2.- Niveles de hemoglobina.

Grados de anemia	Casos		Controles		Total	
	n	%	n	%	n	%
Anemia moderada (Hb: 6-10,0 g)	6	7,4	1	1,2	7	4,1
Anemia leve (Hb: 10,1-11,9 g)	21	25,9	14	16,2	35	21,0
Normal (Hb: ≥12,0 g)	54	66,6	71	82,6	125	74,9
Total	81	100	86	100	167	100

* $\chi^2 = 7,14$; $p = 0,03$.

Tabla 3.- Resultados de IgA en sangre en los casos y controles.

Resultado de la prueba	Enfermedad		Total n
	No n	Sí n	
Positivo	19	78	97
Negativo	67	03	70
Total	86	81	167

Sensibilidad: 96,2%

Especificidad: 78%

Razón de probabilidad = 91.68

DISCUSIÓN

La tuberculosis es una enfermedad altamente prevalente en el Perú (^{1,2}); por ello, es de urgente la necesidad de buscar o probar métodos de diagnóstico precoces y de costo bajo.

La red pública de salud (MINSA y EsSalud) utiliza únicamente los métodos bacteriológicos para diagnóstico de TB, los cuales han servido para confirmar el diagnóstico de aproximadamente 85% de los casos, habiendo ingresado a tratamiento un 15% de casos de diagnóstico dudoso, sin confirmación bacteriológica. Esto representa varios miles de casos en todo el país.

Resulta importante contar con métodos diagnósticos complementarios, con elevada sensibilidad y especificidad, comparados con los métodos tradicionales. Habiéndose desarrollado la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que consiste en la detección de ácidos

Tabla 5.- IgA en sangre: reactivo, dudoso o negativo.

	No reactivo	Dudoso	Reactivo	Total
Casos		3	78	81
Controles	54	13	19	86
Total	54	16	97	167

nucleicos bacterianos mediante técnicas de amplificación genética, aún no se ha establecido niveles de confiabilidad, habiéndose realizado numerosos estudios con resultados variables, siendo el de Condos y col. el que encuentra la más alta tasa de sensibilidad (95%) y la más baja de especificidad (89%), muy similar a nuestros resultados (^{11,12,17}).

Estudios previos han investigado el valor diagnóstico de los anticuerpos IgM, IgG e IgA anti-A60 en pacientes con TB pulmonar y extrapulmonar (¹³⁻¹⁵).

La detección de IgA en líquidos corporales podría ser una pista diagnóstica valiosa, particularmente para los casos de TB extrapulmonar, debido a su función secretoria. En una publicación del año 1994, se encontró anticuerpos IgA anti-Kp 90 en el suero de 13 de 15 pacientes con TB activa demostrada (¹⁶).

Las técnicas serológicas, actualmente, requieren de gran sofisticación, por lo que no podrían ser difundidos en laboratorios con equipamiento mínimo y especialmente en hospitales con gran demanda de atención, por sospecha de TB.

El trabajo de investigación con mayor parecido al nuestro es el de Alifano y col., realizado en 1997 (¹⁰), con la diferencia de que los controles son pacientes enfermos con patología no tuberculosa, cuando puede encontrarse falsos positivos o negativos. En el nuestro utilizamos controles, en quienes se ha reforzado el estado de no enfermedad con exámenes radiológicos, PPD y examen clínico minucioso.

Algunos expertos afirman que por cada paciente con TB pulmonar con frotis positivo existirían dos con baciloscopia negativa/TBP frotis negativo y TB extrapulmonar.

En el caso de pacientes con TB extrapulmonar no confirmada bacteriológicamente, existe la posibilidad de realizar un prolongado seguimiento diagnóstico, consistente en baciloscopías periódicas repetidas, hasta conseguir la conversión a baciloscopia posi-

va, o esperar el resultado del cultivo de *M. tuberculosis* que, en condiciones ideales, no debería demorar más de un mes, pero que en condiciones operacionales demora hasta dos meses o más, para llegar a manos del médico tratante y paciente.

Algunas de las limitaciones de esta práctica son:

- a. El riesgo de perder al paciente, quien no retorna a su control de seguimiento, con la posibilidad de aumentar sus lesiones, las que se hacen progresivas e invalidantes.
- b. Estos pacientes, al convertir su baciloscopia a positiva, transmitirán la infección a otros miembros de la comunidad.
- c. La posibilidad de que aún al final del proceso de seguimiento diagnóstico, el cultivo para *M. tuberculosis* resulte informado como contaminado, habiéndose perdido, por tanto, un tiempo vital para el paciente y su entorno familiar.
- d. La posibilidad de que el cultivo para *M. tuberculosis* resulte negativo y el médico se vea ante la disyuntiva de diagnosticar TB únicamente por criterio clínico, en el caso de decidir tratarlo, o, lo que es probablemente peor, no iniciarle tratamiento, aún cuando el paciente tenga enfermedad por *M. tuberculosis*, simplemente por el hecho de no tener confirmación bacteriológica.

Por ello, es necesario el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos, que no sustituirán a los métodos basados en la bacteriología, sino que complementarán el diagnóstico.

Por lo tanto, se concluye que el diagnóstico serológico de tuberculosis mediante la detección de IgA no es de utilidad complementaria en el diagnóstico de tuberculosis, aunque en los casos demostrados de tuberculosis es altamente sensible (96,2%). Su especificidad es limitada (77,9%), pues en los controles sanos uno de cada cinco pacientes tiene resultado positivo. Se ha dado ventaja a la prueba al considerar como negativos a los resultados dudosos, según características de la prueba.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) **Declaration to Stop TB.** "A Call for Accelerated Action Against Tuberculosis" Tuberculosis en el Perú. Informe 1999. Amsterdam, The Netherlands: 24 March 2000. p. 15-20.
- 2) **Suárez G.** El control de la tuberculosis en el Perú y sus logros en el período 1990-1999. Tuberculosis en el Perú. Informe 1999; 2:27-34.
- 3) **Epstein D.** Noticias de Prensa de la Organización Panamericana de la Salud. Washington, DC: 23 de marzo de 1999.
- 4) **World Health Organization.** TB 97. Treatment of Tuberculosis. Guidelines for National Programs. S. 220.
- 5) **World Health Organization.** TB 98. Global Tuberculosis Control. Summary. S. 237.
- 6) **Das PK, Grange JM.** Mycobacteria in relation to tissue immune response and pathogenesis. Rev Med Microbiol 1993; 4:15-23.
- 7) **Das PK, Rambukkana A, Baas JG.** Enzyme-linked immune absorbent assay for distinguishing serological responses of lepromatous and tuberculoid leprosy to the 29/33 kilodalton doublet and 64-kilodalton antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1990; 379-82.
- 8) **Fakiri E, Nicolaou S, Ziros G, Stratakos G, Marinis E.** Detection of IgA antibody to *M. tuberculosis* in serum by an enzyme-linked immunosorbent assay. Atenas, Grecia: Athens Hospital for Chest Diseases, Departamento de Microbiología, National Mycobacterium Reference Unit (NMRU).
- 9) **Banker DD, Daftary VG.** Tuberculosis screening: Usefulness of new Kreatech IgA Elisa test. Indian J Med Sci 1994; 48(8):181-5.
- 10) **Alifano M, di Pascalis R, Sofia M, Faraone S, del Pezzo M, Covelli I.** Evaluation of Ig A- mediated humoral immune response against the Mycobacterial antigen P-90 in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Chest 1997; 3(3):601-5.
- 11) **Hawkey PM.** The role of polymerase chain reaction in the diagnosis of mycobacterial infections. Rev Med Microbiol 1994; 5:21-32.
- 12) **Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, et al.** Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence for *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis 1990; 161:977- 81.
- 13) **Charpin D, Herbault H, Gevaudan MJ, et al.** Value of ELISA using A60 antigen in the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. Am Rev Resp Dis 1990; 142:380-4.
- 14) **Lopez-Cortes LF, Nogalez Perez MC, Gomez-Mateos J, et al.** Antibodies to antigen 60 in cerebrospinal fluid from patients with tuberculosis meningitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994;13:490-5.
- 15) **Delacourt C, Gobin I, Gaillard JL, et al.** Value of ELISA using Antigen 60 for the diagnosis of tuberculosis in children. Chest 1993;104:393-8.
- 16) **Banker DD, Daftary VG, Daftary GV, et al.** Tuberculosis screening: usefulness of a new Kreatech IgA ELISA test. Indian J Med Sci 1994; 48:181-5.
- 17) **Condos R, McClune A, Rom WN, et al.** Peripheral-blood-based PCR assay to identify patients with active pulmonary tuberculosis. Lancet 1996; 347:1082-5.