

## A.1.3 Immunopatologia

### A.1.3.1 Infecció i malaltia

Les defenses de les vies respiratòries altes d'un individu se impedeixen que la majoria de microorganismes inhalats arribin als pulmons, de manera que no tothom que està exposat s'infecta. Si les partícules inhalades són suficientment petites, els microorganismes poden arribar als alvèols i provocar la infecció. Un cop el microorganisme es troba dins el pulmó, pot tenir sorts diverses:

- La resposta de l'hoste pot ser totalment efectiva i matar els bacils, o bé l'hoste pot contenir el bacil que romandrà latent i no causarà la malaltia. Aquesta situació es referida com a infecció latent, i la seva única manifestació és que els individus són positius al test tuberculínic (apartat A.1.4.2). Així, per exemple, un 90% de població infectada no desenvolupa la malaltia.
- El microorganisme pot començar a multiplicar-se i créixer immediatament després de la infecció, fins a causar la malaltia clínica coneguda com a TB primària. Entre un 5 i un 10% d'individus la desenvolupen poc després d'infectar-se. També pot passar que els microorganismes en estat de latència finalment comencin a créixer, la qual cosa ocasiona la malaltia clínica coneguda com a TB de reactivació.

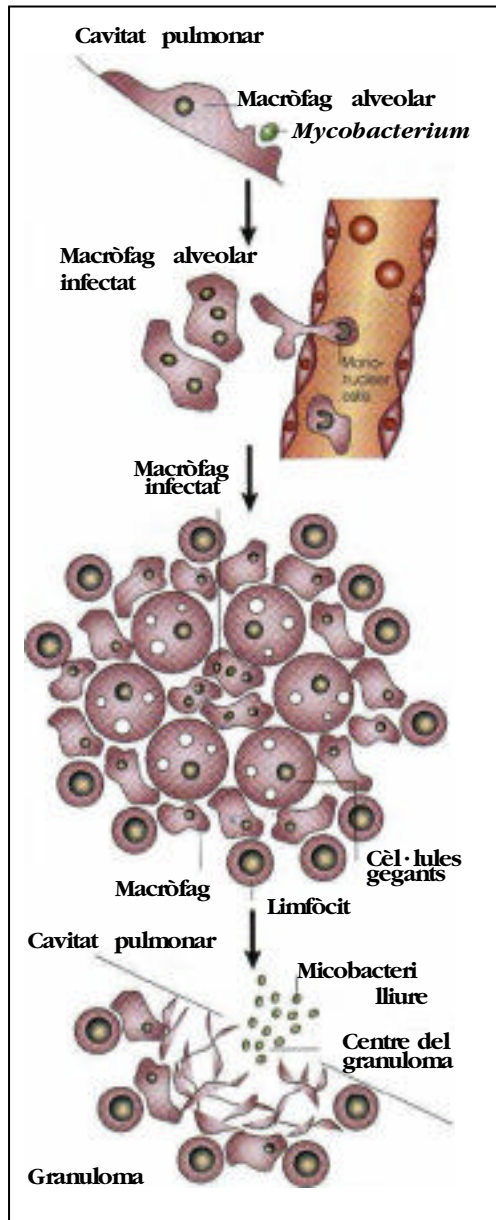
Així doncs, cal diferenciar dues situacions diferents en la relació hoste-patogen: infecció i malaltia.

A part de la virulència innata del bacil de la TB, la resposta de l'hoste té un paper molt important en el desenvolupament de la malaltia. Existeix una immunitat innata i una immunitat adquirida enfront de la TB. En alguns casos, la malaltia es desenvolupa en el context de l'estat immune de l'hoste; quan es troba en un estat d'immunosupressió (coïnfecció amb VIH, mala nutrició) la probabilitat de desenvolupar la malaltia augmenta. Però també en altres casos la malaltia té lloc sense un defecte obvi en la immunitat de l'hoste (Flynn i Chan, 2001). Estudis recents han demostrat que existeix una susceptibilitat genètica; desordres genètics que afecten la producció o la resposta enfront de l'IFN- $\gamma$  o la IL-12 estan associats a un increment en el risc d'infecció (Altare, 1998; Jouanguy, 1999).

Els bacils que són als alvèols pulmonars són captats immediatament per macròfags alveolars. Un cop a la cèl·lula, són retinguts en un vacúol fagocític fins que la cèl·lula hoste mor. Les soques patògenes de *M. tuberculosis* són capaces de convertir l'ambient hostil del fagosoma en un nínxol on es pot dividir (Deretic i Fratti, 1999). La multiplicació bacteriana dins els macròfags alveolars indueix una resposta proinflamatòria localitzada, que comporta el reclutament

de cèl·lules mononuclears dels vasos sanguinis veïns, tal com s'observa a la figura 8. En poques setmanes, els microorganismes es multipliquen i la infecció es generalitza per la disseminació del bacil per via limfohematògena. Les vies limfàtiques els transporten fins als nòduls limfàtics regionals i el sistema circulatori els transporta fins a òrgans i teixits llunyans. El compromís dels òrgans limfàtics condueix a l'expansió de cèl·lules T específiques, que migren cap al focus d'infecció.

Els macròfags infectats, envoltats de cèl·lules gegants, cèl·lules T i fibroblasts,



constitueixen el granuloma, tubercle o lesió primària, que defineix la malaltia (Dannenber, 1999). Aleshores les citocines, predominantment l'IFN- $\gamma$  provinent de cèl·lules T, activen els mecanismes microbicides del macròfag i inhibeixen el creixement del bacteri. Finalment, el granuloma s'encapsula per fibrosi i calcificació, i porta a una necrosi al centre del focus i, redueix presumiblement l'aportació de nutrients i oxigen al bacteri. Aquesta resposta de teixit tipifica la fase de contenció de la infecció, durant la qual no hi ha símptomes oberts de la malaltia i l'hoste no transmet la infecció als altres.

Després d'un canvi en l'estat immune de l'hoste, al centre del granuloma s'esdevenen la caseïnització i la descàrrega de bacils viables i infecciosos cap a les vies respiratòries. Això condueix a una tos productiva que facilita la dispersió en forma d'aerosol del bacil infecciosos (Russell, 2001).

Figura 8. Immunopatologia de la tuberculosi. Modificada a partir de Russell (2001)

### A.1.3.2 Resposta cel·lular

El *M. tuberculosis* pot entrar al macròfag mitjançant diferents tipus de receptors (Ernst, 1998) requerint el reclutament de colesterol de la membrana del macròfag (Gatfield i Pieters, 2000). Un cop és al fagosoma, sembla relativament resistent als mecanismes microbicides del macròfag. D'una banda, interfereix en la maduració del fagosoma (Deretic i Fratti, 1999). El fagosoma infectat reté una proteïna anomenada TACO (*tryptophane aspartate-containing coat protein*) que aparentment n'evita la maduració posterior (Ferrari, 1999). D'altra banda, bloqueja l'adquisició del complex ATPasa que bombeja protons i, amb ella, l'acidificació normal del fagosoma (Sturgill-Koszycki, 1994), i és capaç de prevenir la fusió amb endosomes. D'aquesta manera, el fagosoma queda segregat en els primers estadis de maduració (Via, 1997).

La maduració del fagosoma té lloc als macròfags activats, principalment mitjançant l'estimulació per IFN- $\gamma$  (Bach, 1997). L'activació del macròfag és el resultat tant de la resposta innata com de l'adaptativa. La innata s'esdevé quan el microbi interacciona amb el macròfag; llavors aquest excreta les primeres citocines (TNF i IL-12), que interaccionen amb altres cèl·lules (principalment limfòcits Natural Killer) que produeixen IFN- $\gamma$ . Posteriorment, la presentació de pèptids específics a les cèl·lules T per part dels macròfags produeix la diferenciació de les cèl·lules T, que són la font principal d'IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ , importants per a la formació del granuloma (Dannenberg, 1999).

La localització fagosomal del micobacteri dins el macròfag facilita la interacció d'antígens micobacterians amb el complex major d'histocompatibilitat (MHC) de classe II i la inducció subsegüent d'una resposta cel·lular Th1-CD4 protectora. Malgrat això, s'ha vist que cèl·lules infectades per *M. tuberculosis* tenen poca capacitat de presentar antígens restringits a MHC de classe II. Això podria ser degut a la capacitat del micobacteri de mantenir un pH de 6,5 a l'interior del fagosoma, que impediria parcialment l'acció d'enzims proteolítics necessaris per al processament de l'antigen, que requereixen d'un pH entre 5 i 6. A més, l'activació del macròfag, la presentació de l'antigen i l'activació de cèl·lules T poden ser inhibides per citocines secretades per macròfags infectats, com IL-10, IL-6 i TGF- $\beta$  (Muñoz-Elías i McKinney, 2002).

A més de la resposta de cèl·lules T CD4, s'han aïllat cèl·lules T CD8 que reconeixen específicament antígens micobacterians presentats per MHC de classe I (figura 9). No és clar com els antígens poden ser presentats ja que el micobacteri roman dins el fagosoma i cal que els antígens estiguin al citosol per a ser presentats per MHC de classe I. Tanmateix, s'ha postulat que hi pot haver inducció d'apoptosi, de manera que macròfags i cèl·lules dendrítiques poden agafar antigen provinent de cèl·lules apoptòtiques, i induir una resposta de CD8

específica d'antigen (Albert, 1998). Els efectes citolítics de les cèl·lules CD8 poden lisar directament cèl·lules infectades que són refractàries a ser activades per IFN- $\gamma$ , i alliberar bacteris exposant-los a anticossos i complement. Recentment també s'ha vist que les cèl·lules T CD8 expressen granulisina, que entra al macròfag infectat mitjançant porfirines i és capaç de matar directament el bacil (Stenger, 1998). A més, les cèl·lules CD8 són una font de producció d'IFN- $\gamma$ , que poden compensar la deficiència de les cèl·lules CD4 (Flynn i Chan, 2001).

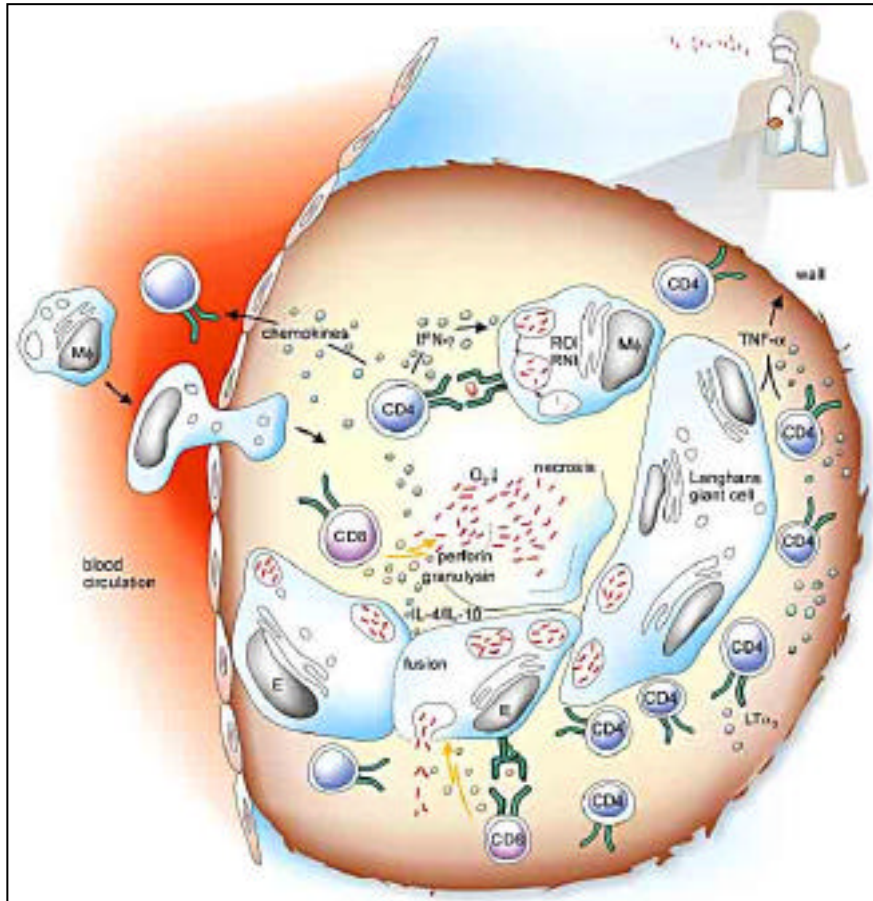


Figura 9.  
Resposta de l'hoste  
i formació del  
granuloma.  
Adaptada a partir  
d'Ulrichs i  
Kaufmann (2002)

A part de les respostes convencionals de cèl·lules T restringides a MHC de classe I i II, s'ha descobert recentment un subtipus de cèl·lules T dependents de molècules CD1. Aquestes molècules CD1 comprenen un nou llinatge de molècules presentadores d'antigen diferent a les molècules MHC de classe I i II. Les molècules CD1 presenten antígens lipídics i glicolipídics micobacterians (Porcelli i Modlin, 1999) (figura 9), que acomoden en un domini hidrofòbic. Les cèl·lules T que reconeixen les molècules CD1 poden ser tant CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> com CD8<sup>+</sup>, que produeixen IFN- $\gamma$  estimulades per antigen. El reconeixement de macròfags infectats per cèl·lules T CD8 restringides a CD1 suposen la lisi del macròfag i porten a una reducció de la viabilitat del micobacteri (Kaufmann, 2001a).

Finalment, antígens no proteics que contenen fosfat arriben també a la superfície del macròfag (encara es desconeix mitjançant quin mecanisme) i són reconeguts per cèl·lules T  $\gamma$ , aparentment sense la presència de molècules especialitzades. Aquestes cèl·lules regularien el tràfic cel·lular al granuloma, promovent l'arribada de macròfags i limfòcits i inhibint la infiltració de neutròfils (Orme i Cooper, 1999).

Al llarg de la malaltia hi ha un balanç continu entre la resposta Th1 i la Th2, ja que es detecta l'expressió tant de citocines de tipus 1 (IFN- $\gamma$ ) com de tipus 2 (IL-4). Es correlaciona un increment de IL-4 amb la gravetat de la malaltia i la cavitació, tot i que no es coneix si aquesta relació és causa o conseqüència de la malaltia (Seah, 2000).

El coneixement de la interacció complexa que té lloc entre el bacil i l'hoste encara té molts punts foscos i s'està actualitzant contínuament. El que se sap fins ara es troba explicat detalladament en un conjunt de magnífics treballs de revisió: Collins i Kaufmann, 2001; Ellner, 1997; Flynn i Chan, 2001; Flynn i Ernst, 2000; Kaufmann, 2001; Rook, 2001; Schluger, 2001b; Schluger i Rom, 1998.

### **A.1.3.3 Resposta humoral**

La funció de la resposta humoral en la malaltia tuberculosa ha estat molt discutida. Malgrat el requeriment inequívoc de la immunitat mediada per cèl·lules T, recentment s'ha revifat l'interès pel paper dels anticossos. Per la seva localització intracel·lular, s'assumeix que el bacil tuberculós no s'exposa a anticossos. Però a l'inici de la infecció, i durant curts períodes al llarg de la infecció, esdevenen extracel·lulars. En aquestes circumstàncies, els anticossos poden acomplir funcions importants, com ara prevenir l'entrada del bacteri a la superfície de mucoses, la citotoxicitat dependent d'anticossos, i/o la lisi mitjançant el complement (Collins i Kaufmann, 2002). A més, els anticossos poden opsonitzar els bacteris i facilitar la fagocitosi pels macròfags, que aleshores maten el microorganisme.

En una revisió excel·lent dels experiments realitzats al llarg dels últims 100 anys, Glatman-Freedman i Casadevall (1998) mostren els arguments a favor i en contra del paper protector dels anticossos en la TB. Aquests autors postulen el possible paper dels anticossos interferint l'adhesió a macròfag, la promoció de la fusió fagosoma-lisosoma, la neutralització de productes microbians o altres possibles mecanismes en què aquells poden interferir en el curs de la infecció. Així, hi ha diferents exemples que suggereixen que els anticossos poden contribuir al control de la malaltia, tot i que rarament tindrien lloc sense els mecanismes mediats per cèl·lules T. A més, recentment s'ha demostrat que la unió *in vitro* de *M. tuberculosis* amb anticossos abans de la infecció en ratolins minora el curs de la malaltia (Bosio, 2000; Teitelbaum, 1998). D'altra banda, la pèrdua de la

resposta IgG enfront de l'antigen 14 kDa s'ha associat amb un increment de la mortalitat en adults amb TB pulmonar (Bothamley, 1992b).

És evident, però, la presència d'anticossos en els estadis tardans de la malaltia, al llarg del tractament antituberculós, com també una possible producció a l'inici de la malaltia, la qual cosa ha motivat el seu estudi per a la recerca de la tan desitjada eina diagnòstica (Gennaro, 2000).

#### **A.1.3.4 Relació amb el VIH**

Com hem dit al llarg d'aquesta introducció, l'aparició del VIH ha tingut una significació clau en la història recent de la malaltia tuberculosa. Ja hem vist que una disminució de la immunitat cel·lular pot portar a una major susceptibilitat a patir la malaltia tuberculosa. Així, individus infectats pel VIH que pateixen una disminució de cèl·lules T CD4 són notablement més susceptibles tant a una TB primària com a una reactivació; el VIH actua com a catalitzador, i augmenta la possibilitat que la malaltia evolucioni ràpidament. A més, durant una TB activa, en un individu coinfectat es produeix una interacció intensa entre l'hoste i ambdós patògens que dona com a resultat un increment de la càrrega viral (Fauci, 1996) i un augment de la mortalitat i la morbiditat relacionades amb el VIH (Sepkowitz, 1995).

- Influència de la infecció pel VIH en la infecció per *M. tuberculosis*.
  - Percentatges elevats de TB de reactivació (7-10%/any en l'individu coinfectat *vs.* 5-8%/tota la vida a l'individu sa).
  - Percentatges elevats de malaltia aguda per TB primària (37%/primers 6 mesos *vs.* 2-5%/primers 2 anys), independentment del nombre de CD4 de l'individu.
  - Percentatges elevats d'anèrgia al test tuberculínic, que s'incrementa a mesura que el recompte de CD4 disminueix.
  - Percentatges elevats de malaltia extrapulmonar. La TB disseminada que infecta múltiples zones, i afecta generalment el sistema limfàtic o el sistema nerviós central, és particularment freqüent en malalts amb infecció per VIH.
  - Mala absorció de la medicació antituberculosa, que pot portar a l'aparició de soques resistents als fàrmacs.
- Influència de la infecció per *M. tuberculosis* en la infecció pel VIH.
  - Activació de macròfags com a resposta a la infecció per *M. tuberculosis*, que pot incrementar l'expressió de VIH al macròfag.
  - Progressió més ràpida cap a la sida si la infecció latent per *M. tuberculosis* no es tracta. El 90% de malalts tuberculosos coinfectats pel VIH progressen cap a la sida.

Diferents estudis han demostrat que el *M. tuberculosis* i alguns dels seus components indueixen una replicació *in vitro* del VIH en cèl·lules mononuclears infectades pel VIH, incrementen la infectivitat vírica a monòcits i també la transmissió del VIH-1 de monòcits a limfòcits (Lawn, 2001). Encara no es

coneixen, però, els mecanismes mitjançant els quals una TB activa incrementa la infectivitat del VIH en les cèl·lules.

El potencial de la TB per a incrementar la càrrega de VIH-1 *in vivo* pot ser degut al curs crònic de la TB activa. L'activació de cèl·lules T i macròfags i l'expressió de TNF- són trets essencials per a la immunopatogènesi i la resposta immune protectora de la TB, però poden ser perjudicials per a la contenció del virus a causa de l'activació de cèl·lules que contenen VIH latent (Toossi, 1999). La TB porta a un increment en la producció de citocines com IL-1b, TNF- o IL-6, que activen la replicació del VIH-1 (Koyanagi, 1988). En aquest sentit, s'ha observat una baixada de la càrrega viral i una possible millora clínica en administrar inhibidors de citocines (de TNF- ) juntament amb la quimioteràpia (Klausner, 1996).

## A.1.4 Diagnòstic

### A.1.4.1 Característiques d'un test

Qualsevol test de diagnòstic té unes característiques concretes que en determinen la vàlua. La sensibilitat és la capacitat d'identificar correctament els individus que tenen la malaltia dins la població. En termes matemàtics, és el nombre de persones amb el test positiu que tenen la malaltia, dividit entre la suma total de persones amb la malaltia. S'acostuma a donar com a percentatge. I l'especificitat és la capacitat de classificar correctament els qui no tenen la malaltia. En termes matemàtics, és el nombre de persones amb un test negatiu que no tenen la malaltia, dividit per la suma total de persones sense la malaltia (Grange i Laszlo, 1990). A la taula 2 s'especifiquen les característiques generals que cal considerar d'un test de diagnòstic.

TAULA 2. Característiques d'un test de diagnòstic

Sensibilitat:	Fracció d'individus amb resultat positiu del test d'entre els individus amb malaltia
Especificitat:	Fracció d'individus amb resultat negatiu del test d'entre els individus sense malaltia
Valor predictiu positiu	Fracció d'individus amb la malaltia d'entre els individus amb un resultat del test
Valor predictiu negatiu	Fracció d'individus no malalts d'entre els individus amb un resultat negatiu del test
Eficiència de predicció	Fracció d'individus classificats correctament d'entre tots els individus amb malaltia
Error de predicció:	Fracció d'individus classificats erròniament d'entre tots els individus amb malaltia

Generalment, en un test de diagnòstic la sensibilitat ve determinada per la tècnica, mentre que l'especificitat varia segons l'antigen que s'utilitza.

Per a calcular la sensibilitat, l'especificitat i els valors predicits d'un test, s'utilitza l'esquema que figura a la taula 3.

TAULA 3. Càlculs dels valors de referència d'un test

Resultat del Test	Malaltia		Totals
	Present	Absent	
Positiu	a	b	a+b
Negatiu	c	d	c+d
Totals	a+c	b+d	a+b+c+d

On podem calcular:

$$\text{Sensibilitat} = a / (a+c)$$

$$\text{Especificitat} = d / (b+d)$$

Valor predictiu positiu  $a / (a+b)$  en una població definida

Valor predictiu negatiu  $d / (c+d)$  en una població definida

### A.1.4.2 Diagnòstic de la infecció

En persones asimptomàtiques infectades pel bacil de la TB, la radiografia de tòrax acostuma a ésser normal, rarament es troben bacils àcid-alcohol resistents en la tinció d'esput i els cultius de mostres respiratòries són negatius (ATS, 2000b). Així doncs, fins ara l'únic mètode estàndard per a detectar la infecció latent per *M. tuberculosis* es basa en la resposta cel·lular que té lloc en l'hoste: el test tuberculínic. Als darrers anys, però, s'intenten introduir nous mètodes de detecció *in vitro*, com la mesura de la producció d'IFN- $\gamma$  a partir de cèl·lules sanguínies estimulades amb antígens específics. Explicarem totes dues metodologies, que es troben representades a la figura 10.

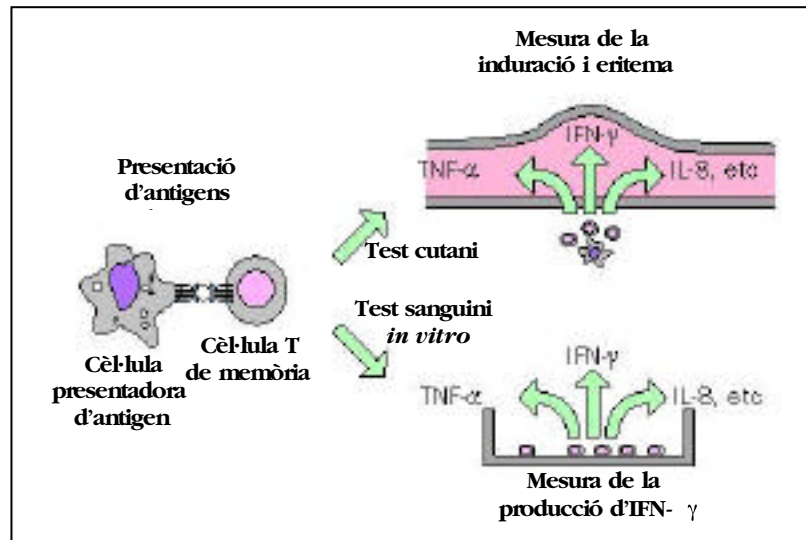
#### A.1.4.2.1 Test tuberculínic

Koch realitzà els primers experiments en què pretenia utilitzar un derivat proteic semipurificat com a teràpia per a la tisi (Kaufmann, 2001b). Posteriorment s'observà que, si bé no era útil en aquest aspecte, sí que tenia utilitat com a eina diagnòstica un cop modificat.



El test tuberculínic es basa en el fet que la infecció per *M. tuberculosis* produeix una reacció d'hipersensibilitat retardada enfront de determinats compostos antigènics presents en els extractes de filtrats de cultius, anomenats "tuberculines". La tuberculina s'obté a partir d'un filtrat del cultiu de *M. tuberculosis*. Molts dels constituents d'aquest filtrat anomenat "derivat proteic purificat" (PPD) són proteïnes petites amb pesos moleculars d'aproximadament 10 kDa, però inclou també polisacàrids i alguns lípids (Daniel, 1980). S'han preparat tuberculines a partir d'altres espècies de micobacteris, però aquests materials no són tan sensibles i específics per al diagnòstic d'infeccions per micobacteris no tuberculosos com ho és la PPD per a infeccions per *M. tuberculosis* (ATS, 2000a).

Figura 10. Reacció d'hipersensibilitat retardada. Modificada a partir d'Andersen *et al.* (2000)



Quan s'injecten subcutàniament petites quantitats d'aquest preparat (PPD), es desenvolupa una reacció inflamatòria local al cap d'unes 24-72 hores en individus que prèviament han respost al patògen. La resposta està mediada per cèl·lules Th1 que penetren en el punt d'injecció de l'antigen, reconeixen complexos de pèptids-MHC de classe II en les cèl·lules que presenten antigen i alliberen citocines inflamatòries. Aquestes augmenten la permeabilitat local dels vasos sanguinis, duen plasma al teixit, es deposita fibrina i recluten cèl·lules accessòries a aquest punt, que provoquen una inflor visible. Cadascuna d'aquestes fases tarda algunes hores, així que la reacció normalment comença al cap de 5-6 hores des de la injecció, i es lleix com a màxim entre les 48-72 hores, tot i que la reacció acostuma a persistir fins a una setmana.

Per a fer un bon ús del test cal conèixer l'antigen que s'utilitza, les bases immunològiques de la reacció i la tècnica d'administració, i saber com llegir el resultat. Per a persones amb infecció latent i un estat immune normal, el test s'apropa al 100% de sensibilitat. Però trobem tota una sèrie de problemes de sensibilitat:

- L'anèrgia. És la incapacitat per a obtenir una resposta cutània del tipus de sensibilitat retardada. Entre un 30 i 40% de malalts coinfectats pel VIH són anèrgics al test tuberculínic (Chin, 1996).

- L'efecte *booster* (reforç). En alguns individus, la capacitat per a reaccionar disminueix amb el temps, de manera que poden tenir una reacció negativa primer i, quan es repeteix el test al cap d'un temps, positivat-se. Això és degut al fet que la primera prova reforça la resposta immune que havia disminuït. Pot donar-se en persones vacunades i presenta problemes d'interpretació quan la prova es fa repetidament (per exemple cada any al personal sanitari) (Menzies, 1999).

A més, hi ha problemes d'especificitat:

- La PPD comparteix un gran nombre d'antígens amb el BCG i amb altres micobacteris (Chaparas, 1970; Andersen i Brennan, 1994), i una reacció positiva pot indicar també infecció per altres micobacteris diferents del *M. tuberculosis*, o vacunació amb BCG.
- Les respostes d'hipersensibilitat són relativament no específiques.
- Depèn del criteri que s'utilitzi per a definir què es considera positiu.

A partir de la sensibilitat i l'especificitat de la PPD i la prevalença de la TB en diferents grups, s'han establert uns criteris de lectura del test segons la grandària de la induració i els factors de risc, tal com s'especifica a la taula 4.

TAULA 4. Positivitat de la prova tuberculínica segons la grandària i els factors de risc

Induració	Persones en les quals es considera la prova tuberculínica positiva
5 mm*	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Seropositius al VIH</li> <li>– Persones amb conductes de risc per a VIH i que rebutgen realitzar test per a la detecció del VIH</li> <li>– Contactes propers a persones amb TB pulmonar o laríngia</li> <li>– Persones amb evidència radiològica de TB antiga curada</li> </ul>
10 mm	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Persones amb factors de risc per a TB diferents de ser portador d'anticossos pel VIH, com ara la diabetes, la silicosis, el tractament prolongat amb esteroides o un tractament immunosupressor, el càncer de cervell o gola, la neoplàsia hematològica, la insuficiència renal, la gastrectomia o el <i>by-pass</i> intestinal, la síndrome de mala absorció intestinal o el baix pes (un 10% o menys del pes ideal)</li> <li>– Persones amb història d'utilització de drogues (per exemple, alcoholisme, cocaïna) o usuaris de drogues per via parenteral seronegatiu pel VIH</li> <li>– Persones que viuen en residències d'avis, hospitals, presons, correccionals o centres per a la deshabitació de toxicòmans</li> <li>– Personal sanitari</li> <li>– Nens menors de 5 anys</li> </ul>
15 mm	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Persones que no compleixen cap dels criteris anteriors</li> </ul>

\*Independentment que estiguin vacunats o no amb BCG.

Taula modificada a partir de *Rafal*(2000)

Així doncs, atès que el test tuberculínic es troba per sota del 100% d'especificitat i sensibilitat i hi ha la necessitat que el pacient es torni a visitar, es busquen alternatives, com els nous tests de diagnòstic *in vitro*.

#### **A.1.4.2.2 Producció d'IFN- $\gamma$ *in vitro***

Actualment existeix al mercat un test per al diagnòstic *in vitro* de la infecció per *M. tuberculosis*: el test Quanti-FERON -TB (CSL Biosciences, Melbourne, Austràlia). Es basa en l'estimulació de limfòcits T fent servir directament sang i utilitzant com a antigen PPD obtinguts de *M. tuberculosis*, *M. avium* i *M. bovis*. A continuació es realitza un ELISA amb el sobrenedant del cultiu, en el qual es detecta l'IFN-  $\gamma$  produït (figura 10). És una mesura directa de la resposta immune mediada per cèl·lules Th1. Aquest test es desenvolupà per al diagnòstic de la TB bovina l'any 1990, i posteriorment s'ha adaptat per a poder-lo utilitzar en humans.

L'avaluació d'aquests tests, però, es fa utilitzant el test tuberculínic com a estàndard, i aquesta comparació és problemàtica. Així, Streeton *et al.* (1998) mostren una correlació molt bona amb la prova cutània en malalts i controls amb una sensibilitat del 90% i una especificitat del 98%. Pottumarthy *et al.* (1999) i Mazurek *et al.* (2001) troben una concordança del 65% en individus PPD-positius, i del 90% en PPD-negatius. En canvi, altres autors (Converse, 1997; Kimura, 1999) demostren poca correlació entre tots dos assajos, i defensen que el nou test té una sensibilitat més elevada que el test tuberculínic i que millora els resultats de la PPD en individus coinfectats pel VIH, o en usuaris de drogues per via perentoral. Per a detectar casos de TB activa, aquest test mostra una sensibilitat entre el 70 i 83%, i no presenta diferències significatives entre les formes pulmonars i les extrapulmonars, els casos confirmats bacteriològicament i casos diagnosticats clínicament, ni entre els tinció positiva i els tinció negativa (Pottumarthy, 1999; Streeton, 1998).

Respecte del test tuberculínic, aquest test presenta tota una sèrie d'avantatges: només cal una mostra de sang, es pot repetir sovint, no requereix la introducció de proteïnes estranyes a l'individu, no són necessàries visites posteriors del pacient, i no es veu influenciat per l'error del clínic que llegeix el test. Només cal que al laboratori hi hagi l'equipament requerit per a realitzar immunoassajos. El punt feble d'aquest assaig torna a ser la utilització d'un antigen no específic, que fa que no es pugui distingir entre els individus infectats i vacunats (Johnson, 1999; Mazurek, 2001).

Actualment, però, s'avalua la utilització d'altres antígens per a estimular les cèl·lules. No s'han obtingut millors resultats que amb la PPD ni utilitzant diferents fraccions de *M. tuberculosis* (Katial, 2001), ni utilitzant l'antigen purificat MTB-64 (Johnson, 1999). En canvi, sí que s'han obtingut bons resultats

amb els antígens de la regió RD1. Aquesta regió genòmica present al *M. tuberculosis* i al *M. bovis* però absent de totes les soques de BCG i gairebé de tots els micobacteris ambientals (Mahairas, 1996; Behr, 1999b), inclou les proteïnes ESAT-6 i cfp-10.

Amb l'ESAT-6 s'ha obtingut una sensibilitat en malalts amb TB d'entre el 58 i el 84%, amb una especificitat del 100% (Arend, 2000; Johnson, 1999). I s'ha demostrat la seva utilitat per a la detecció d'infectats recents (Ravn, 1999). Així doncs, aquests antígens purificats incrementen l'especificitat, però a costa de la sensibilitat del test. Actualment s'estan utilitzant combinacions d'antígens específics per tal de millorar aquesta sensibilitat (Andersen, 2000).

Darrerament s'han desenvolupat nous assajos en els quals se simplifica encara més aquest tipus de tests. Els tests ELISPOT es basen en el mateix principi, però utilitzen dos anticossos específics dirigits contra diferents epítops de la mateixa molècula per a capturar la citocina produïda. Així, en una placa de microtitulació on es troba unit un anticòs específic per IFN- $\gamma$ , s'afegeixen les cèl·lules i s'estimulen amb l'antigen, després de rentar s'hi afegeix el segon anticòs marcat, que s'unirà a l'IFN- $\gamma$  produït. Les taques (*spots*) es generen amb la reacció colorimètrica, en què el substrate precipita i s'adhereix al lloc on ha tingut lloc la reacció. L'ELISPOT és entre 10 i 200 vegades més sensible que l'ELISA. Amb aquest test s'han obtingut sensibilitats del 96% en malalts de TB, del 85% en infectats recents i una especificitat del 92%, entre individus el 77% dels quals havien estat vacunats amb BCG i cap d'ells reaccionà (Lalvani, 2001).

#### **A.1.4.3 Diagnòstic de la malaltia**

A diferència del que ha succeït en altres aspectes del coneixement de la malaltia com ara el tractament, en el diagnòstic no hi ha hagut grans avenços fins a la dècada dels vuitanta. Aquest progrés s'ha materialitzat sobretot en l'aparició de medis de cultiu més ràpids i eficaços que els tradicionals i en sistemes de detecció i d'identificació basats principalment en les tècniques de la biologia molecular. Tot això, però, comporta la necessitat d'uns mitjans en equipament i personal qualificat, i per això en la majoria de països on la malaltia és endèmica es continua utilitzant el diagnòstic tradicional (simptomatologia clínica, radiografia i tinció d'esput).

##### **A.1.4.3.1 Diagnòstic clínic**

La simptomatologia de la malaltia es caracteritza per una tos prolongada de més de tres setmanes de duració i, com a mínim, per dos dels símptomes següents:

febre, calfreds, sudoració nocturna, esgotament, anorèxia, aprimament inexplicable o ronquera. En un malalt coinfectat pel VIH, els símptomes són els mateixos que en persones amb un nombre elevat de cèl·lules CD4, però en individus amb baix nombre de CD4 són inespecífics i no permeten diferenciar la malaltia d'altres infeccions oportunistes (Rufí, 2000; Sepkowitz, 1995). Aquesta simptomatologia és compartida amb altres pneumònies respiratòries, en el cas de la TB pulmonar, i encara és més difícil en el cas de la forma extrapulmonar; de manera que cal un diagnòstic directe o indirecte per a assegurar la presència de la malaltia. Hi ha diferents tècniques que ho permeten: microbiològiques, bioquímiques i genètiques.

#### **A.1.4.3.2 Diagnòstic microbiològic**

El diagnòstic tradicional es basa en tres passos successius:

- a) la demostració de la presència de bacils àcid-alcohol resistents en les mostres obtingudes,
- b) l'aïllament mitjançant el cultiu, i
- c) la identificació de les soques aïllades.

Una vegada identificada la soca, només es realitza un antibiograma en el cas de sospita d'un malalt infectat amb una soca resistent als antimicobacterians habituals, i en el cas de persistència de baciloscòpia positiva després de dos mesos o cultiu positiu després de sis mesos de la primera mostra (Guerrero, 1999).

A continuació detallem les diferents tècniques que existeixen per a dur a terme el diagnòstic de la malaltia.

##### **A.1.4.3.2.1 Tinció**

Actualment s'utilitzen dues tècniques específiques per a la detecció de micobacteris en mostres clíniques: la clàssica de Ziehl-Neelsen i la variant de tinció amb fluorocroms, que és més ràpida i permet obtenir un camp d'observació més ampli al microscopi perquè no cal treballar amb immersió. La microscòpia de bacils àcid-resistents és barata, ràpida i fàcil de realitzar, i detecta els malalts més infecciosos. Tot això fa que continuï tenint un paper primordial en la detecció de casos, però planteja tota una sèrie de problemes que evidencien les seves mancances:

- Els resultats produïts depenen de la lectura d'un tècnic entrenat.
- El rang de positivitat en tinció és aproximadament d'entre  $5 \cdot 10^3$  i  $10^4$

micobacteris/ml (Heifets i Good, 1994).

- El 40% dels casos de TB pulmonar i el 75% de TB extrapulmonar en adults són tinció negativa (Wilkins, 1998). Recentment s'ha descrit la capacitat infectiva considerable d'individus tinció negativa, menys bacil·lífers (Behr, 1999a).
- És notablement poc sensible, amb un rang de sensibilitat descrit entre el 22 i el 78% (Pfaller, 1994; Salfinger, 1994). Segons l'OMS, actualment menys d'un 20% dels 8 milions de casos previstos anualment són identificats com a tinció positiva (WHO, 2000b).
- Els requisits de recollir l'esput, concentrar, decontaminar, assecar, tenyir i examinar retarda la comunicació. La necessitat d'examinar espunts per duplicat o triplicat complica aquest problema. A més, la recol·lecció d'especimens és dificultosa en els casos en què la malaltia està poc estesa, en formes extrapulmonars i en nens amb TB que no produeixen espunts.

Potser el desenvolupament de tècniques de tinció més sensibles, fins i tot específiques per al *M. tuberculosis* complex (Stender, 1999), pot millorar les tincions que s'utilitzen actualment.

#### **A.1.4.3.2 Aïllament**

Des dels medis de cultiu tradicionals de Löwenstein-Jensen (LJ), Coletsos i Middlebrook 7H10 i 7H11 s'ha avançat molt en aquest camp. L'aparició, als anys setanta de les tècniques de cultius radiomètrics BACTEC 460 TB<sup>R</sup> (Becton-Dickinson Microbiology Systems, EUA) comportà una millora qualitativa i va reduir el temps de creixement a dues setmanes enfront de les quatre dels medis tradicionals. A més, aquest sistema és totalment automàtic. El creixement s'observa mitjançant la detecció de la incorporació de C<sup>14</sup> en el CO<sub>2</sub> que es produeix, i informa del resultat automàticament. La limitació és haver de treballar amb isòtops radioactius.

En l'última dècada s'han introduït medis no radiomètrics automatitzats o semi-automàtics:

- el MB-BacT<sup>TM</sup> (Organon Teknika Corporation, Durham, EUA), que porta un sensor colorimètric que detecta la presència de CO<sub>2</sub> com a indicador del creixement bacterià, i
- l'ESP Myco II (Difco Laboratories, Detroit, EUA), que es basa a detectar el consum d'O<sub>2</sub> mitjançant els canvis de pressió que es donen a l'interior de l'ampolla. Porta unes esponges de cel·lulosa que abasten una àrea de creixement major.

En aquests sistemes no és necessari manipular l'ampolla des que és introduïda al

sistema. Hi ha alternatives manuals per als laboratoris que no disposen d'automatització:

- el sistema bifàsic Septi-Check<sup>R</sup> (Roche Laboratory Systems-Becton Dickinson), en què es revisa visualment el creixement en el medi líquid i/o sòlid, i
- el Mycobacteria Growth Indicator Tubes System<sup>R</sup> (MGIT<sup>R</sup>) (Becton-Dickinson), amb el qual un sensor de fluorescència sensible a l'O<sub>2</sub>, indica el creixement mitjançant la mesura del consum d'O<sub>2</sub>, quan s'exposa el tub a llum ultraviolada.

Amb aquests medis, que són de lectura ràpida (7 o 10 dies), s'obtenen molt bons resultats (Watterson, 2000). El cultiu és molt més sensible que la tinció només calen de 10 a 100 microorganismes. En general, la sensibilitat del cultiu és del 80-85% i té una especificitat del 98% (ATS, 2000a; Hale, 2001).

### **A.1.4.3.2.3 Identificació de *Mycobacterium tuberculosis***

#### **A.1.4.3.2.3.1 Proves morfològiques, culturals i bioquímiques**

El creixement en medi sòlid permet veure la morfologia colonial i detectar cultius mixtos, la pigmentació i la fotoreactivitat, amb els quals es pot classificar el micobacteri directament dins un subgrup. El *M. tuberculosis* és un creixedor lent que fa colònies de color cru, rugoses i sense pigmentació. A partir de les colònies, hi ha tres proves bioquímiques bàsiques que permeten identificar el *M. tuberculosis*: l'acumulació de niacina, la reducció de nitrats a nitrits i l'activitat catalasa. Aquestes proves proporcionen el resultat en tres dies. Altres proves bioquímiques permeten distingir entre les diferents espècies del gènere. Aquestes proves són la hidròlisi de Tween 80, l'activitat arilsulfatasa, ureasa, pirazinamidasa, i la captació de ferro, entre d'altres (Heifets i Good, 1994; Koneman, 1997).

#### **A.1.4.3.2.3.2 Cromatografia**

Es poden aplicar la cromatografia en capa fina (TLC), la cromatografia de gasos i la cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC) per a la identificació dels lípids que formen part de la paret dels micobacteris i, consegüentment, la identificació del microorganisme. La cromatografia de gasos permet identificar les diferents espècies segons el perfil dels diferents àcids grassos (Tisdall, 1979) i l'HPLC es basa en el perfil d'àcids micòlics (Butler i Guthertz, 2001). Per a totes dues existeixen patrons informatitzats que permeten la identificació de les diferents espècies habituals a la clínica (Glickman, 1994). Són tècniques ràpides (duren hores) però requereixen un equipament car. A més, calen microorganismes de

cultius purs, i no permeten diferenciar *M. tuberculosis* de *M. bovis*, però sí de *M. bovis* BCG.

#### **A.1.4.3.2.3.3 Tècniques basades en la detecció d'àcids nucleics**

A mitjan anys vuitanta arribaren nous avenços tècnics amb la introducció en la microbiologia clínica de les tècniques de detecció d'àcids nucleics. L'avantatge principal que aporten aquests mètodes és la rapidesa en la identificació, ja que són tècniques que no requereixen subcultius. La majoria de les vegades es poden dur a terme directament en cultius primaris, i es poden aplicar a cultius en medis líquids, fet que accelera els resultats a menys de 3 hores (Hale, 2001; Soini i Musser, 2001). Però tenen en contra el cost elevat, la complexitat tècnica (comparada amb la simple microscòpia) i que no existeixen sistemes comercials aplicables a tots els micobacteris que es podem trobar en les mostres clíniques.

Podem diferenciar les tècniques següents:

##### – Sondes d'àcids nucleics

Es basen en l'ús de sondes d'ADN marcades amb èsters d'acridina (quimioluminiscent; prèviament s'havien comercialitzat marcades amb iode radioactiu) i complementàries a fragments d'ARNr específics d'espècie. Hi ha sondes disponibles (AccuProbe, Gen-Probe, San Diego, EUA; [www.gen-probe.com](http://www.gen-probe.com)) per a *M. tuberculosis* complex (tot i que no diferencia espècies), *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. goodii* i *M. kansasii*. Aquests assajos s'havien dissenyat per a la confirmació de microorganismes crescuts en un medi sòlid, però es poden realitzar també a partir del cultiu líquid. Calen com a mínim  $10^6$  cèl·lules a la mostra, es realitzen en poques hores i presenten sensibilitats i especificitats pròximes al 100% (Eisenach, 1999).

##### – INNO-LiPA Mycobacteria (Innogenetics, Bèlgica)

Aquest test consisteix a amplificar la regió intergènica del 16S-23S ARNr, i amb el producte obtingut hibridar sobre una tira de niló o nitrocel·lulosa on hi ha la diana específica per al *Mycobacterium* spp., per a identificar el *M. tuberculosis* complex i set espècies més. Identifica correctament un 99% dels aïllats (Tortoli, 2001).

##### – Polimorfisme de fragments de restricció (PRA)

Consisteix en l'amplificació d'un fragment del gen que codifica per la proteïna *heat shock protein* de 65kDa dels micobacteris i en la digestió posterior del fragment per dos enzims de restricció: *Hae* III i *BsE* II. Els patrons de restricció



són específics en les diferents espècies de micobacteris. Cal poc inòcul, és una tècnica ràpida i permet identificar la majoria d'espècies descrites (Devallois, 1997).

– Seqüenciació d'àcids nucleics

A diferència de les tècniques anteriors, aquests tests permeten alhora detectar i identificar el *M. tuberculosis* directament de mostres clíniques. Es basen en la detecció i l'amplificació posterior d'àcids nucleics de seqüència coneguda en les diferents espècies de micobacteris. És una tècnica molt específica i sensible. Malgrat que en els primers estudis es van obtenir una enorme variabilitat de resultats utilitzant els tests “fets a casa” en situacions de rutina clínica (Noordhoek, 1996), deguda a la utilització de diferents protocols, amb la introducció dels primers kits comercialitzats i els més recents, que utilitzen tècniques d'amplificació de segona generació, s'han pogut treure conclusions sobre la seva utilitat (Gamboa, 1997).

Entre aquests tests trobem:

1. PCR:

1.1. Amplicor<sup>R</sup> *Mycobacterium tuberculosis* PCR Test (Roche Diagnostic Molecular Systems). Amplifica una regió del gen 16S ADNr. Aquest gen es troba bastant conservat, però té zones variables amb seqüències de nucleòtids específiques de gènere i d'espècie, que són les que s'amplifiquen. Existeix també per a *M. avium* i *M. intracellulare*.

1.2. TB-fast<sup>R</sup> (Pharmagen, SA, Espanya). Amplifica i detecta la seqüència d'inserció IS6110.

2. Tècniques d'amplificació de segona generació:

2.1. Detecció d'ADN

2.1.1. Strand Displacement Amplification<sup>R</sup> (Becton Dickinson Microbiology Systems, EUA).

2.1.2. LCx *Mycobacterium tuberculosis* Assay (Abbot Laboratories, EUA). Utilitza la reacció en cadena de la lligasa. Detecta el gen que codifica per a la proteïna antigènica b (Pab).

2.2. Detecció de ARNr

2.2.1. Ensayo Q-<sub>2</sub> Replicasa. Galileo-Probe Amplification<sup>R</sup> (Gene-Trak). Detecta i amplifica ARNr 23S.

2.2.2. Amplifier *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (AMTDT) (Gen-Probe Inc., EUA). Amplifica ARNr 23S. Amplificació mediada per transcripció.

2.2.3. NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification; Organon Teknika). Amplifica selectivament ARNr 16S micobacterià.

Els més avaluats han estat l'Amplicor i l'AMTDT. En general, aquests tests presenten una sensibilitat del 95% en mostres de malalts tinció positiva i de prop del 50% en malalts tinció negativa, amb una especificitat pròxima al 100% (Catanzaro, 1997). De manera que l'eficiència d'aquests tests és més gran que en el cas de la tinció però més petita que en el cultiu.

El problema més greu en l'ús d'aquests tests és la possible contaminació de reactius o mostres amb ADN diana o amplificat prèviament; a més, es pot detectar ADN micobacterià fins a molt temps després d'haver començat el tractament antituberculós. Quant a la sensibilitat, cal considerar la interferència de substàncies inhibidores que poden afectar l'amplificació (Eisenach, 1999). Per raó del seu cost elevat, la tecnologia, el personal altament qualificat i el control de qualitat que requereixen, només són viables en laboratoris especialitzats. El seu ús en els diferents casos ha estat molt discutit, però sembla clar que no poden substituir la tinció i que sempre cal fer cultiu, que serà qui en doni el diagnòstic definitiu (ATS, 2000a; Schluder, 2001a; Soini i Musser, 2001).

#### **A.1.4.3.2.3.4 Detecció d'antigen amb anticossos monoclonals**

Recentment s'han comercialitzat un test que es basa en la detecció de l'antigen MPB64, mitjançant una immunocromatografia (apartat A.2.2.). El test consisteix en la utilització d'anticossos monoclonals anti-MPB64 units a una membrana de nitrocel·lulosa per a la identificació de *M. tuberculosis* a partir del cultiu (tant colònies com cultiu líquid). Utilitzant aquest test, Abe *et al.* (1999) identifiquen correctament 111 aïllats clínics i 20 soques de referència, excepte un feble senyal que els dona una de les quatre soques de *M. marinum* i una de *M. flavescens*. Hasegawa *et al.* (2002) identifiquen correctament 133 aïllats de MOTT com a negatius pel test, 160 de *M. tuberculosis* i *M. africanum* com a positius, i els reaccionen 2 de les 4 soques de *M. bovis* i 1 de les 7 de *M. bovis*BCG.

## **A.2 Diagnòstic serològic**

La serologia ha estat considerada el Sant Graal del diagnòstic de la TB. Fa més de 100 anys que s'intenta aconseguir un test de diagnòstic utilitzant el sèrum dels malalts. Aquests tests són potencialment una opció ràpida i es podria utilitzar una mostra fàcil d'obtenir com és el sèrum. Malgrat s'han presentat millores significatives en la tecnologia utilitzada al llarg dels darrers anys (millores en les tècniques de purificació, la fabricació d'antígens recombinants, el desenvolupament de test de detecció més sensibles, etc), els test serològics no han demostrat encara un funcionament prou acurat per a garantir-ne l'ús rutinari en els programes de control.

### **A.2.1 Potencial i interès**

El rol primari de la serologia és el diagnòstic de la malaltia. Aquests tests han de ser especialment importants allí on els mètodes de diagnòstic convencional

fallen, en grups específics d'individus en què el diagnòstic de la malaltia és particularment desafiant, és a dir els tinció negativa.

Aquest grup de mostres tinció negatives inclou habitualment mostres de nens, vells i casos de TB extrapulmonar. Tant a la població pediàtrica com a persones grans, el diagnòstic bacteriològic de TB és particularment difícil perquè no acostumen a produir una quantitat adequada d'esput per ser analitzat i per l'elevada incidència de la malaltia disseminada (Khan i Starke, 1995). Malauradament, aquests dos grups són els grans oblidats en l'avaluació sistemàtica dels tests serodiagnòstics. També seria particularment important un test de diagnòstic serològic per a la malaltia extrapulmonar, en poder-se detectar anticossos en líquids estèrils, com el líquid cefaloraquidi (LCR) o el líquid pleural, on el cultiu és majoritàriament negatiu.

Un test de diagnòstic serològic hauria de poder diferenciar:

- entre individus amb tinció positiva i malaltia per altres micobacteris diferents del *M. tuberculosis*;
- entre els sospitosos de patir una TB en què es pot fer un altre diagnòstic. Detectar tuberculosos amb tinció negativa;
- entre malalts i individus infectats, vacunats o que hagin estat estimulats per micobacteris ambientals.

A part del diagnòstic, els tests serològics podrien utilitzar-se també en:

- el cribratge d'individus tuberculosos en poblacions d'alt risc (recerca de casos);
- el monitoratge de la quimioteràpia, la detecció d'abandonament del tractament o d'aparició de soques resistents als antibiòtics (Bothamley, 1995);
- l'avaluació de l'eficàcia de noves vacunes per a la TB (Shinnick, 2000).

A l'hora de dissenyar un test de diagnòstic serològic caldria diferenciar les necessitats entre els països on la prevalença de la malaltia és baixa i els països on la prevalença és alta (Perkins, 2000). Així, en un país on la prevalença és menor, caldria:

- detectar malalts a l'inici de la malaltia, poc infecciosos o amb símptomes mínims, amb un substitut igual de sensible i específic que el cultiu però més ràpid;
- identificar brots epidèmics i caracteritzar transmissions nosocomials;
- discriminar pacients amb infeccions per altres micobacteris, substituint les proves bioquímiques i les sondes espècie-específiques.

En canvi, en països on hi ha una elevada prevalença, caldria:

- un substitut per a la tinció prou específic que permetés iniciar la teràpia;
- un substitut per al cultiu per a avaluar malalts complexos, suficientment sensible per a detectar individus amb tinció negativa, i
- un test de cribratge amb una sensibilitat molt elevada (encara que només sigui només moderadament específic), per a destriar els individus tuberculosos simptomàtics d'altres amb la mateixa simptomatologia.

Atesa l'extensió de la malaltia tuberculosa en àrees subdesenvolupades, segons l'OMS (WHO, 1997), un test que pogués diagnosticar la malaltia no caldria que fos ideal (100% sensible i específic), sinò que millorés la tinció i cultiu actuals, és a dir, que tingués les següents característiques:

- una sensibilitat per sobre del 70% (per a substituir la tinció) o del 80% (per a substituir el cultiu) i una especificitat per sobre del 95-99%;
- que no es veiés afectat per la coinfecció amb el VIH;
- la mostra que s'utilitzés hauria de ser esput, sang, sèrum o orina;
- un test simple, fàcil de dur a terme per un tècnic amb poca o nul·la preparació, que no calgués equipament, i que inclogués els reactius necessaris;
- un test estable durant un any o dos, que no perdés la capacitat serodiagnòstica, i que tingués un cost econòmic baix.

## A.2.2 Tipus d'assaigs

La història dels tests serològics per a la TB comença gairebé des del moment en què es va conèixer l'existència de *M. tuberculosis*, cap a l'any 1898, quan s'intentà desenvolupar un test d'aglutinació utilitzant el bacil sencer. Argoing, l'any 1898, va obtenir una sensibilitat del 57% i una especificitat del 89% (Bothamley, 1995). A partir d'aleshores, i fins l'aparició de l'ELISA l'any 1972, es van desenvolupar nombroses tècniques utilitzant antígens no específics de *M. tuberculosis* (Grange i Laszlo, 1990). En general les dades són molt variables, amb sensibilitats molt elevades però amb especificitats baixes. En aquest apartat de la introducció repassem els diferents tipus de tests serològics i els resultats obtinguts.

### – Tècniques d'aglutinació

S'han utilitzat tècniques d'aglutinació d'eritròcits sensibilitzats o bé altres partícules portadores. Middlebrook i Dubos (1948) presentaren un test d'hemoaglutinació on sensibilitzaven cèl·lules sanguínies amb filtrats de cultiu o

extractes del bacil, que aglutinaven en presència d'anticossos. Al llarg dels anys sorgiren diferents variants en què se sensibilitzaven eritròcits amb PPD, proteïnes, fosfolípids, polisacàrids i, finalment, glicolípid (Reggiardo, 1981). També es van desenvolupar tests d'aglutinació directa; aglutinació amb partícules de làtex: inicialment amb antígens proteics (Dubocky i White, 1969) i posteriorment amb PPD, OT, fosfàtids i filtrat de cultius; aglutinació amb caolí, i proves de floculació amb bentonita i de titulació globulínica (revisats a Caminero, 1990a; Krambovitits, 1987). En general, tots aquests tests no permetien diferenciar entre individus infectats i malalts; tot i així, hi ha alguns estudis que mostren elevades sensibilitats i especificitats. Reggiardo i Vázquez (1981) obtenen sensibilitats per sobre del 86% i especificitats del 96% amb antígens glicolípidics.

#### – Tècniques de fixació del complement

La unió d'IgG o IgM a bacteris pot provocar la lisi cel·lular en presència del complement. El primer test d'aquest tipus per a la TB es descriu el 1901. Malgrat els resultats positius en malalts tuberculosos, també presentava una incidència elevada de falsos positius, fet que, juntament amb la poca reproductibilitat, va fer que s'abandonés aquesta tècnica (Wadsworth, 1930).

#### – Tècniques de precipitació

S'han utilitzat molts mètodes de precipitació, com ara la immunodifusió, la microimmunodifusió (Kaplan i Chase, 1980), la difusió en doble gel, la precipitació en gel i la doble difusió en agar. Amb la difusió en gel i amb filtrat de cultiu com a antigen, Parlett i Youmans (1959) trobaren una sensibilitat entre el 60 i el 84% en malalts tuberculosos, però els reaccionaven fins un 43% de malalts no tuberculosos, un 56% de casos de tuberculosi inactiva i un 73% de malalts infectats amb micobacteris atípics. En general, la resta d'autors trobaren aquestes tècniques poc sensibles i que no aportaven avantatges sobre l'hemoaglutinació (Froman, 1968).

#### – Tècniques d'immunoassaig amb indicadors marcats

Les tècniques inicials de precipitació foren substituïdes per altres en què l'antigen es va unir a una fase sòlida. S'han realitzat proves amb antigen soluble fluorescent, i de radioimmunodifusió i radioimmunolectroforesi. També s'ha utilitzat àmpliament el radioimmunoassaig (RIA), en el qual s'unien isòtops radioactius a antígens o anticossos per a incrementar la sensibilitat. En general, amb aquestes tècniques no s'aconseguí diferenciar entre malalts amb TB activa i inactiva (Carr, 1980; Winters i Cox, 1981). A més es demostrà la presència

d'anticossos anti-*M. tuberculosis* en individus sans que no havien estat exposats al bacil (Bardana, 1973).

En general, tots aquests assajos inicialment semblaven prometedors, però posteriorment se'n confirmava la baixa especificitat i poca reproductibilitat (Daniel i Debanne, 1987). Cap d'ells es mostrà prou eficaç per a substituir la tinció i el cultiu. Dins les tècniques d'immunoassaig, s'afegiren posteriorment els mètodes enzimàtics. L'ELISA aportà una elevada sensibilitat, un aparellatge poc sofisticat i facilitat per ser reproduït.

### 1. ELISA

El primer treball utilitzant aquesta tècnica per al serodiagnòstic de la TB el realitzaren Nassau *et al.* (1976). L'ELISA consisteix en la mesura d'anticossos units a un antigen que ha estat fixat en una fase sòlida, utilitzant un anti-anticòs marcat amb un enzim. Usualment aquests enzims són la fosfatasa alcalina, la peroxidasa o la  $\beta$ -galactosidasa. El test és simple i ideal per a avaluar nous antígens i presenta una sensibilitat elevada, similar al RIA. A la figura 11 podem veure un esquema del funcionament de la detecció d'anticossos amb un ELISA.

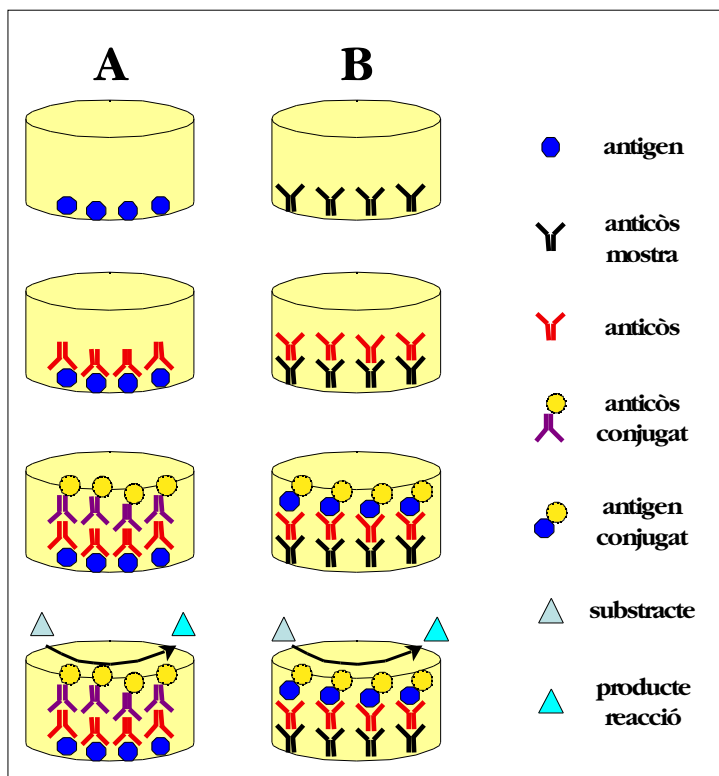


Figura 11. Esquema del funcionament d'un ELISA per a la detecció d'anticossos

En l'esquema A es mostra la unió de l'antigen al pou per a la detecció d'anticossos a la mostra, afegint posteriorment un anticòs marcat amb l'enzim. En l'esquema B s'uneixen anticossos al pou per a la captura d'anticossos a la mostra i, posteriorment, s'afegeix l'antigen marcat

Utilitzant l'ELISA s'han desenvolupat la major part d'anàlisis de nous antígens, ja que com a suport sòlid es poden utilitzar plaques de microtitulació que permeten analitzar simultàniament moltes mostres, i s'obté una lectura objectiva dels resultats. Per a realitzar-los es necessiten micropipetes i un lector de plaques. La majoria dels kits que existeixen al mercat per al diagnòstic serològic de la TB es troben en aquest format (apartat A.2.5.1).

## 2. DOT-ELISA

El fonament de l'assaig és exactament el mateix que el de l'ELISA, però en aquest cas la reacció immunològica es realitza sobre una membrana com a suport, en comptes de la placa de microtitulació de poliestirè que s'utilitza a l'ELISA. L'avantatge que aporta aquest tipus de test és que no cal tenir un lector de plaques per a llegir-ne el resultat, sinó que es llegeix visualment. Això, però, també suposa un inconvenient ja que la lectura s'ha de fer comparant el color de la reacció amb un estàndard, i cada lectura dependrà de la persona que la realitzi.

### - Immunocromatografia

Als darrers anys s'ha desenvolupat un sistema òptim que es pot dur a terme en qualsevol laboratori: la immunocromatografia. Aquesta tècnica consisteix en una tira de membrana (habitualment nitrocel·lulosa) on es troba unit l'antigen. En afegir el sèrum en un dels extrems de la tira, s'uneix a un conjugat marcat amb or col·loïdal, i aquest complex s'anirà desplaçant per capil·laritat al llarg de la membrana. En un punt mig de la tira hi ha l'antigen al qual s'uniran els anticossos-conjugat, cosa que proporciona un color rosat visible. El resultat es llegeix visualment comparant amb un control positiu: anticossos anti-conjugat units a la membrana en un punt distanciat de l'antigen. En la figura 12 es mostra un esquema de les diferents parts de què consta una immunocromatografia.

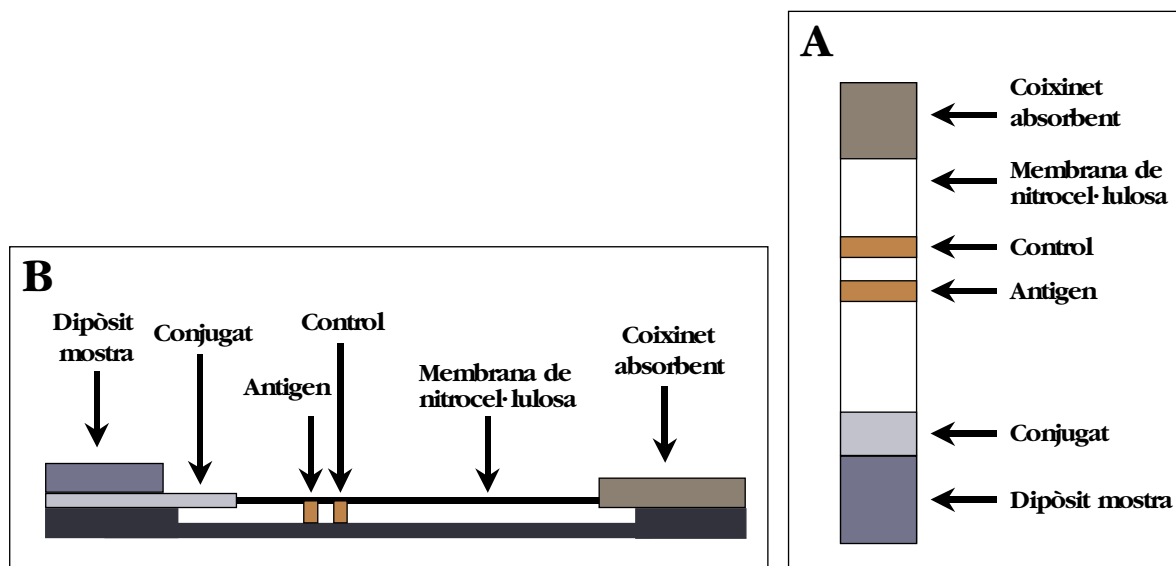


Figura 12. Esquema del funcionament d'una immunocromatografia. Modificat a partir de Domínguez *et al.* (2001)

Tècnicament, aquests tests són ideals per al diagnòstic de malalties, ja que són molt ràpids (15 minuts) i no requereixen cap tipus de tecnologia sofisticada ni personal altament qualificat per a la seva realització. Utilitzant aquest mètode,

s'han desenvolupat diferents assajos per al diagnòstic de la TB, que es mostren a l'apartat A.2.5.2.

### **A.2.3 Detecció de diferents immunoglobulines**

Habitualment s'ha intentat detectar la presència d'IgG en sèrums de malalts amb TB, ja que aquesta és la més abundant a la sang, i la que es troba present al llarg dels diferents estadis de la malaltia. Alguns estudis han intentat detectar la presència d'IgM, que s'associa a estadis inicials de la malaltia. Menys estudis, i únicament amb antígens semipurificats i alguns dels proteics, han utilitzat la detecció d'IgA com a eina serodiagnòstica. La IgA es veu incrementada sovint en malalts amb TB i la seva concentració es correlaciona amb l'extensió de la malaltia, de manera que disminueix quan la teràpia aconseguix disminuir la infecció (Krambovitis, 1987; Maes, 1999).

En el diagnòstic de la TB, la mesura d'IgG dóna sensibilitats de l'ordre del 50-60% en àrees de baixa prevalença de la malaltia, i del 70-85% on hi ha una prevalença elevada. Si s'escull un punt de tall apropiat és possible obtenir especificitats del 97% (Daniel, 1988). La detecció d'IgM és relativament inespecífica. Finalment, la detecció d'IgA ha demostrat que és considerablement específica, però el títol d'anticossos és generalment baix (Daniel, 1988). En aquest apartat tractem diferents aspectes que cal considerar a l'hora de detectar els diferents tipus d'immunoglobulines.

#### **A.2.3.1 Immunocomplexos**

Diferents autors han descrit la formació d'immunocomplexos antígen-anticòs amb diferents tipus d'antígens al llarg de l'evolució de la malaltia tuberculosa (Carr, 1980; May, 1983; Samuel, 1984). La caracterització dels antígens o anticossos dels complexos dissociats ha mostrat un elevat potencial diagnòstic i de pronòstic de la malaltia (Bhattacharya, 1986; Mehta i Khuller, 1989; Raja, 1995). La formació d'aquests complexos seria una raó per a explicar el nombre de malalts amb TB que proporcionen falsos negatius en els tests serològics.

Simonney *et al.* (1997) troben una gran heterogeneïtat entre malalts adults pel que fa a la presència d'immunocomplexos formats amb antígens glicolipídics. Alguns malalts presenten nivells baixos d'anticossos lliures però nivells alts d'anticossos IgG complexats, altres a l'inrevés, i un tercer grup mostra nivells similars de cadascun d'ells. Aquests autors no aconseguixen establir una correlació en la formació de complexos amb la càrrega bacteriana en aquests malalts, ni amb la forma de presentació de la TB. Dissociant els immunocomplexos i detectant els anticossos per ELISA, aconseguixen una millora en la sensibilitat del test del 23 al 77% per les



DAT, i del 47 al 71% pels LOS. En canvi, sí que troben que només es formen IgG-LOS en TB pulmonars en nens malalts (no en formes extrapulmonars, contactes o infectats) (Simonney, 2000).

Patil *et al.* (1996) detecten immunocomplexos en LCR d'un 60% de malalts amb TB meníngia. A més, combinant la detecció d'immunocomplexos amb la detecció d'anticossos específics aconseguixen una sensibilitat del 82%. Detecten la presència d'immunocomplexos i anticossos lliures en un 33% del LCR dels malalts analitzats, només immunocomplexos en un 27% i només anticossos en un 22%. Igualment, Gupta *et al.* (1998) troben una sensibilitat del 90%, amb una especificitat del 93%, detectant antigen en immunocomplexos circulants, estudiant sèrum de 84 individus amb formes de TB extrapulmonar i 115 controls, respectivament.

### **A.2.3.2 Detecció d'IgM o IgA**

Quan es vol detectar la presència de IgM o IgA a la mostra, cal tenir present la possible presència de falsos negatius degut a l'excés d'IgG. D'altra banda, s'ha descrit la presència de factor reumatoide en algunes malalties i infeccions cròniques (Hassan, 1992). El factor reumatoide és una immunoglobulina (pot ser IgM o IgA) que s'uneix específicament a la part constant de la IgG (Carpenter, 1997), de manera que pot significar la presència de falsos positius en la detecció d'IgM i/o IgA. Aquests problemes es resolen amb l'eliminació de les IgG presents en el sèrum. Aquesta eliminació d'IgG es pot realitzar de diferents formes, com són: amb raïnes d'intercanvi iònic; per centrifugació amb gradient de sacarosa; o mitjançant la fixació de la IgG amb proteïna A o anti-IgG d'ovella enfront del fragment Fc de la IgG humana (Gutiérrez, 2002). Així doncs, en els casos en què s'obté una positivitat baixa per a la detecció d'IgMs o IgAs, cal repetir l'assaig afegint-hi prèviament anti-IgG.

### **A.2.4 Tipus d'antígens**

El que determina l'especificitat d'un test de diagnòstic és l'antigen utilitzat. Al llarg de la història del desenvolupament dels tests serològics per al diagnòstic de la TB, s'han anat utilitzant diferents tipus d'antígens. Inicialment s'utilitzaren extractes crus i antígens semipurificats. Posteriorment, a fi d'obtenir especificitats més elevades es purificaren tant antígens proteics com glicolípidics. I, finalment, una tercera generació de tests s'han desenvolupat en aquesta darrera dècada utilitzant proteïnes recombinants. Al llarg d'aquest apartat mostrarem els resultats obtinguts amb els diferents tipus d'antígens i, finalment, els estudis realitzats amb cadascun dels tests que es comercialitzen actualment.

### A.2.4.1 Semipurificats i extractes crus

Des dels primers tests desenvolupats per al serodiagnòstic de la TB fins l'arribada de l'ELISA, els antígens més utilitzats han estat els antígens bacil·lars crus, és a dir filtrats de cultiu de *M. tuberculosis*, micobacteris sencers (tant *M. tuberculosis* com *M. bovis*) i sonicats, extractes de parets, etc. Igualment s'han assajat antígens semipurificats com la PPD, OT i fraccions lipídiques. Els resultats obtinguts amb els assajos realitzats es troben detallats en dos magnífics treballs de revisió de Daniel i Debanne (1987) i Caminero (1990b). En general, els resultats obtinguts utilitzant la tècnica d'ELISA se sintetitzen a la taula 5.

TAULA 5. Rang de sensibilitats i especificitats obtingudes utilitzant antígens bacil·lars crus i antígens semipurificats, amb la tècnica d'ELISA.

<b>Antigen</b>	<b>Sensibilitat</b>	<b>Especificitat</b>
Filtrat de <i>M. tuberculosis</i>	56 - 80%	91- 97%
Sonicat de <i>M. bovis</i> BCG	68 - 92%	96 - 100%
Sonicat de <i>M. tuberculosis</i>	94%	97%
<i>M. bovis</i> BCG	68-92%	96-100%
PPD	31 - 86%	78 - 100%
Fraccions lipídiques	52 - 91%	97 - 100%

Taula modificada a partir de Caminero (1990b), i Daniel i Debanne (1987).

Els resultats que mostren els diferents autors pel que fa a sensibilitat i especificitat han estat bons (taula 5) malauradament, però, molts antígens micobacterians mostren reaccions encreuades amb infeccions originades per altres micobacteris (Chaparas, 1970) o altres microorganismes, tan en persones sanes com en persones amb altres tipus de malalties (Minden, 1972; Daniel i Debanne, 1987). Conseqüentment, aquests antígens són inviablès per a un test serològic. Malgrat això, s'han continuat realitzant assajos en què s'utilitza aquest tipus d'antígens; fins i tot recentment s'han introduït en el mercat tests que n'utilitzen com a antigen (apartat A.2.5 d'aquesta introducció).

### A.2.4.2 Purificats

#### A.2.4.2.1 Proteïcs i proteïnes recombinants

Amb la finalitat de trobar un test suficientment específic amb el qual es pugui discriminar entre malalts amb TB i la resta de la població, s'han cercat antígens

específics del *M. tuberculosis*. Tradicionalment les molècules més estudiades han estat les d'origen proteic. Aquestes molècules hidrofíliques, per ser transportades i presentades als subtipus cel·lulars, han estat considerades els millors candidats com a antigens per al diagnòstic serològic. Entre totes les que s'han estudiat destaquen les proteïnes que el micobacteri excreta a l'exterior durant el seu creixement i les proteïnes estructurals que formen part de la paret cel·lular. A la taula 6 es mostren algunes de les proteïnes que s'han utilitzat per al serodiagnòstic de la TB, i s'indica el nom o noms que se'ls ha donat.

TAULA 6. Proteïnes de *M. tuberculosis* que s'han utilitzat per al serodiagnòstic de la TB

<b>Pes mol. (Kda)</b>	<b>Nom/s</b>	<b>Funció</b>	<b>Anotació genòmica</b>
6	ESAT6	Antigen secretat	Rv 3875
12	GroES	Heat-shock protein; funció en el plegament i translocació	Rv 3418c
16		Família de les Heat-shock protein de baix pes molecular	Rv 2031c
18	MPT63	Antigen secretat	Rv 1926c
18	MPT70	Proteïna secretada majoritària	Rv 2875
19		Potencial pèptid senyal i seqüència concens per a lipoproteïnes; carbohidrat associat a les proteïnes purificades; potencial funció en l'adquisició de fosfats	Rv 3763
23	MPT64	Proteïna secretada majoritària en el complex <i>M. tuberculosis</i>	Rv 1980c
30/31	CIE Ag85A, P32, MPT44	Família multigènica que codifica tres o més proteïnes majoritàries que són secretades i relacionades entre sí; proteïnes d'unió a la fibronectina; pèptid senyal de trencament en proteïnes madures; funció com a micolil transferases	Rv 3804c
30/31	CIE Ag85B, MPT59, -antigen, US-Japan Ag6		Rv 1886c
30/31	CIE Ag85C		Rv 0129c
38	PhoS, CIE Ag78, US-Japan Ag5	Proteïna d'unió en el transport de fosfats. Potencial pèptid senyal i seqüència concens per a lipoproteïnes	Rv 0932c
65	GroEL, CIE Ag82, 64 kDa-antigen	Heat-shock protein; funció en el plegament i translocació	Rv 0440

Taula modificada a partir de *Thorpe et al* (1999)

Probablement l'antigen més estudiat ha estat l'antigen 5. Va ser el primer antigen purificat que s'utilitzà, amb el qual es van obtenir excel·lents resultats (Daniel and Debanne, 1987). El compost purificat inicialment contenia LAM, de manera que es va purificar més acuradament i es va avaluar la capacitat serodiagnòstica

de la proteïna purificada (38 kDa). Tots els assajos realitzats coincideixen en l'elevada especificitat obtinguda, entre el 88 i el 100%. Però el rang de sensibilitats va des del 36 al 89% en malalts amb tinció positiva, del 16% al 54% en malalts amb tinció negativa, i del 12 al 56% en malalts amb TB extrapulmonar (Bothamley, 1992b; Bothamley, 1995; Espitia, 1989; Jackett, 1988; Uma Devi, 2001). Tot i la variabilitat de resultats obtinguts, l'antigen 38 kDa actualment se sintetitza de manera recombinant i és la base de la majoria de test per al serodiagnòstic de la TB que es troben al mercat (apartat A.2.5). Aquest antigen es troba en el *M. tuberculosis* complex i també en el *M. intracellulare* i el *M. malmoense* (Freeman, 1998).

L'antigen 6 va ser un altre dels primers antígens proteïcs avaluats, menys purificat que l'anterior i amb resultats menys satisfactoris, es considera equivalent al complex 85 de *M. bovis* BCG. Les proteïnes que formen aquest complex: 85A, 85B i 85C són les que es troben en major quantitat en els filtrats de cultiu de *M. tuberculosis* i *M. bovis* BCG, i es troben a totes les espècies del gènere. Aquestes proteïnes també s'han avaluat per separat, així, s'ha descrit una resposta discriminativa en malalts amb TB enfront dels control sans pels antígens 85A i 85B (Lim, 1999). Amb l'antigen 85A (o P32) Turneer *et al.* (1988) trobaren una sensibilitat del 55% per a la detecció d'IgG i del 40% per a la IgA, amb especificitats del 95%.

A part d'aquest primers antígens, s'han avaluat nombrosos antígens proteïcs i s'han obtingut resultats molt diversos. Malgrat s'han mostrat elevades especificitats, les sensibilitats són, en general, baixes. Amb l'antigen 19 kDa es van obtenir sensibilitats entre el 8% i el 55%, i amb el complex 45-47 kDa es van obtenir sensibilitats de només el 40% amb especificitats del 98% (Bothamley, 1992a; Diagbouga, 1997). Verbon *et al.* (1993) van estudiar diferents proteïnes de *M. tuberculosis*: els antígens 10, 16 i 24 kDa i un anticòs monoclonal enfront de l'antigen 38 kDa, i van trobar sensibilitats entre el 29 i 51% amb especificitats entre el 95% i 98%. McDonough *et al.* (1992) utilitzant l'antigen 30 van comparar un DOT i un ELISA i van obtenir sensibilitats del 69% i el 78%, i especificitats del 92% i el 97%, respectivament. En aquest estudi, però, la sensibilitat fou només de l'11% en malalts coinfectats pel VIH. Recentment, Raja *et al.* (2002) amb l'antigen 16 kDa han obtingut sensibilitats del 52% i del 62% (detecció d'IgA i IgG, respectivament) amb especificitats del 97% i del 100% en controls sans, però especificitats del 90% i del 60% en el grup de controls amb altres malalties pulmonars.

Amb el desenvolupament de les tècniques de biologia molecular, i la descripció del genoma de *M. tuberculosis*, s'han estudiat les proteïnes recombinants corresponents a aquests antígens i s'han descrit nous antígens proteïcs. En general cap antigen per sí sol proporciona sensibilitats per sobre del 50%

(Dillon, 2000; Hendrickson, 2000; Lodes, 2001; Lyaschenko, 1998; Moran, 2000). Lyaschenko *et al.* (1998) analitzà la resposta en paral·lel enfront de 10 antígens diferents i va observar una clara heterogeneïtat en el reconeixement dels diferents antígens. El patró d'anticossos enfront dels antígens proteics varia en cada individu. Aquesta variabilitat ha fet que diferents investigadors hagin postulat la utilització de diferents antígens recombinants barrejats per al serodiagnòstic de la TB (Genaro, 2000).

#### **A.2.4.2.2 Glicolípídics i lipoglicans**

Els experiments de Reggiardo *et al.* a començament dels anys vuitanta mostraren la presència d'anticossos enfront de les fraccions glicolípídiques de la paret dels micobacteris en sèrum de malalts tuberculosos. A partir d'aquests experiments, s'han purificat i identificat els diferents glicolípids amb la finalitat de trobar un bon antigen per al serodiagnòstic. Al llarg dels anys noranta, s'han estudiat sobretot LAM, LOS, PGL, CF i DAT. A causa de l'elevada variabilitat de poblacions estudiades, especificarem per a cada antigen quina població d'individus s'analitzà en cada estudi i quins resultats de sensibilitat i especificitat es van obtenir.

##### **A.2.4.2.2.1 CF**

Malgrat que el CF és un dels antígens presents a totes les espècies del gènere *Mycobacterium*, ha estat un dels més estudiats per al serodiagnòstic de la TB. De fet, un dels anàlegs sintètics del CF s'ha utilitzat com a antigen en un test comercialitzat, i el CF natural és el component principal de l'anomenat TBGL, base també d'un kit comercial (apartat A.2.5).

Els resultats obtinguts utilitzant el CF com a antigen són contradictoris. La majoria d'autors troben sensibilitats per sobre del 80% i especificitats properes al 100% (He, 1991; Maekura, 1993; i Kashima, 1995), en canvi, Laszlo *et al.* (1992) n'obtenen una sensibilitat del 58% amb una especificitat del 93%, i conclouen que el CF no és un bon antigen per al serodiagnòstic de la TB. Aquests autors justifiquen que s'hagi obtingut un resultat millor amb anàlegs sintètics (92% de sensibilitat) perquè la molècula es deu modificar a l'interior del macròfag i presentar posteriorment als limfòcits amb una estructura més semblant a la d'aquests anàlegs.

El que és clar és que també hi reaccionen sèrums de malalts amb malalties originades per MOTT. Així, He *et al.* (1991) i Enomoto *et al.* (1998) detecten anticossos IgG en sèrums del 100% i 80%, respectivament, de malalts amb infeccions per altres micobacteris.

Tots els assajos realitzats detecten IgG en el sèrum dels malalts, ja que els

estudis que detecten IgM no han resultat satisfactoris (He, 1991; Kashima, 1995; Maekura, 1993).

D'altra banda, Maekura *et al.* (1993) observen que es mantenen els títols d'anticossos IgG en individus malalts fins els 3 mesos després d'haver començat el tractament antituberculós. Després de 6 mesos continuen baixant però, no és fins als 3 anys que els títols d'anticossos antiCF en sèrum baixen fins al nivell dels no tuberculosos.

#### **A.2.4.2.2.2 DAT**

Com es pot observar a la taula 7, les DAT han estat un dels glicolípid més estudiats com a antigen per al serodiagnòstic de la TB. Inicialment es descobrí que formaven part de la fracció no fosforilada dels glicolípid que havia utilitzat Reggiardo *et al.* als anys vuitanta (Ridell, 1992). En vista de l'elevada sensibilitat obtinguda amb aquesta fracció, es purificà per a aconseguir-ne una major especificitat i s'assajà en diferents poblacions.

Per a alguns d'aquests estudis s'han utilitzat DAT procedents de *M. tuberculosis* (DAT<sub>T</sub>) o DAT procedents de *M. fortuitum* (DAT<sub>F</sub>), i s'obtenen resultats similars (taula 7). En general, quan s'obtenen especificitats per sobre del 95%, la sensibilitat del test està per sota del 70% (taula 7). Els resultats, però, són bastant contradictoris i amb la mateixa especificitat les sensibilitats poden oscil·lar entre el 9 i el 86%, tot i analitzar les mateixes poblacions d'individus (malalts amb una TB pulmonar i controls sans) (Escamilla, 1996; Sempere, 1995). Vera-Cabrera *et al.* (1999) atribueixen la variabilitat de resultats a variacions metodològiques, variabilitat de les poblacions estudiades, variacions en la resposta immune entre els individus estudiats o variacions en la composició de les DAT, perquè el glicolípid purificat està format per diferents DAT, és a dir, varien en la composició dels àcids grassos que esterifiquen la molècula de trealosa.

Alguns dels treballs publicats estudien sèrums d'individus coinfectats pel VIH. Alguns autors observen una disminució de la sensibilitat del test (DAT/IgG) segons més avançada es presenta la malaltia. Així, Saad *et al.* (1996) observen sensibilitats del 73%, el 36% i el 0%, en individus tuberculosos sense infecció pel VIH, infectats pel VIH i amb la sida, respectivament. En canvi, altres autors observen una sensibilitat més elevada a individus VIH-positius enfront dels VIH-negatius (Daleine i Lagrange, 1995; Martin-Casabona, 1992; Simonney, 1996).

Només hi ha un assaig publicat que utilitzi les DAT en un format diferent de l'ELISA. Vera-Cabrera *et al.* (1999) desenvolupen un DOT que comparen amb l'ELISA i un ELISA modificat (AmpELISA) descrit prèviament pels mateixos autors (Vera-Cabrera, 1994). Amb l'AmpELISA incrementen la sensibilitat de l'ELISA convencional quan amplifiquen la reacció que catalitza la fosfatasa. Obtenen resultats similars en el DOT i l'ELISA normal, però una major

sensibilitat amb l'AmpELISA (taula 7).

TAULA 7. Assajos serològics presents a la literatura utilitzant DAT com a antígen, detec

Malalts TB	Controls	Sensibilitat	Especificitat	Referència
39 pulmonar	52 sans	59 - 67%	96 - 100%	Cruaod, 1989
		(depenent punt tall)	(depenent punt tall)	
79 pulmonar	251 sans	51,6% - 74,2%	100% - 88%	Cruaod, 1990
20 extrapulm.	37 altres mal.	14,5% - 40,3% (IgM)	100% - 90,3% (IgM)	
		(depenent punt tall)	(depenent punt tall)	
156 (ND)	289 sans	51,9%	98,9%	Martín-Casabona
		47,4% (IgM)	68,7% (IgM)	1992
56 (ND)	12 sans	83%	93%	Laszlo, 1992
		44 altres mal.		
50 pulmonar	25 sans	50% DAT1	76% DAT1	Ridell, 1992
		28% DAT2	100% DAT2	
61 pulmonar	41 sans	28,1%	95,1% sans	Savage, 1993
35 extrapulm.	121 altres mal.		85,9% altres mal.	
		46 TB abans	91,3% TB abans	
49 pulmonar	65 sans	ELISA 42,8%	92,3%	Vera-Cabrera, 19
		ELISAamp 61,2%		
32 pulmonar	20 sans	34,3-9,3% DAT	90-100% DAT	Sempere, 1995
		(depenent punt tall)	(depenent punt tall)	
98 pulmonar	301 sans	59,1% pulmonar	86,7% sans	Simonney, 1995
55 extrapulm.	59 altres mal.	50,9% extrapulm.	89,8% altres mal.	
50 pulmonar	50 sans	61,5%	98%	Simonney, 1996
46 extrapulm.	29 altres mal.			
60 pulmonar	100 sans	86,7% DAT	98% DAT	Escamilla, 1996
65 pulmonar	177 sans	44,5% DAT	99,1%	Tórtola, 1996
9 extrapulm.	105 altres mal.	48,6% DAT		
50 pulmonar	27 sans	68% DAT	96,2% DAT	Muñoz, 1997a
		76% DAT	100% DAT	
30 (ND)	128 sans	50%	97,6% sans	Amicosante, 1997
		29 altres mal.	93,1% altres mal.	
		14 <i>M. avium</i>	80% <i>M. avium</i>	
42 pulmonar	35 sans	50% DOT	97,1%	Vera-Cabrera, 19
2 extrapulm.		47,7% ELISA	94,2%	
		77,2% ELISAamp	97,1%	

Extrapulm.: extrapulmonar; ND: No Determinat; altres mal.: altres malalties; ~~DOT~~ de *M. tuberculosis*; DAT: DAT de *M. fortuitum*.

Diferents estudis han monitoritzat la presència d'anticossos anti-DAT al llarg del

(2000) han observat que els títols es mantenen al llarg del tractament. D'altra banda, Martín-Casabona *et al.* (1992) i Amicosante *et al.* (1997) troben IgG anti-DAT en individus VIH-positius mesos abans que desenvolupin la malaltia i, per tant, el consideren un bon antígen per al pronòstic de la TB.

#### **A.2.4.2.2.3 IAM**

Malgrat que aquest polisacàrid és present a tots els micobacteris, probablement ha estat el més avaluat per a la seva utilització en el serodiagnòstic de la TB. Actualment existeixen al mercat un DOT i un ELISA que utilitzen el LAM sol o amb altres antígens (apartat A.2.5).

En tots els estudis s'ha detectat IgG. Inicialment, Sada *et al.* (1990) trobaren, mitjançant un ELISA, una sensibilitat global del 72% (del 80% en la TB pulmonar i del 65% en la TB pleural) en 66 malalts, amb una especificitat global del 91% (del 97% en sans, del 60% en malalts amb histoplasmosi, i del 89% en malalts amb altres malalties pulmonars). Da Costa *et al.* (1993) demostraren que el LAM estimula una resposta de la subclasse IgG<sub>2</sub>, i van trobar per a aquesta Ig una sensibilitat del 58% en malalts amb TB VIH-negatius i del 35% en VIH-positius, amb una especificitat del 100%. En malalts TB VIH-positius però, troben una sensibilitat del 16% per IgG<sub>4</sub> i del 4% per IgG<sub>1</sub>, que no es donaven en VIH-negatius.

En altres mostres diferents de sèrums, Park *et al.* (1993) trobaren una sensibilitat del 85% detectant anticossos IgG en líquid cefaloraquidi en 27 malalts amb TB meníngia i 78 controls, comparant amb un 26% obtingut en mostres de sèrum, amb unes especificitats del 96 i del 100%, respectivament.

D'altra banda, s'ha provat la detecció de LAM. Sada *et al.* (1992) amb una tècnica de coaglutinació detecten la presència de LAM en el sèrum, després de tractar els sèrums per a concentrar l'antigen i reduir reaccions inespecífiques. N'obtenen una sensibilitat del 88% en malalts TB amb tinció positiva i del 67% en malalts tinció negativa, que es reduïa al 57% en tuberculosos malalts de sida, amb una especificitat del 100%. També s'ha intentat detectar LAM directament en mostres clíniques mitjançant la captura d'antigen utilitzant anticossos monoclonals, i se n'han obtingut sensibilitats del 91% i especificitats del 100% (Pereira, 2000). Recentment s'ha aconseguit detectar LAM en orina de malalts amb TB (Tessema, 2001), i se n'ha obtingut una sensibilitat del 81% en malalts amb tinció positiva i del 57.4% en malalts tinció negativa, i una especificitat del 87% en malalts no tuberculosos i del 90% en controls sans.



#### **A.2.4.2.2.4 LOS**

Malgrat que els LOS es troben en grans quantitats a "*M. canettii*", no es troben, o només es troben en traces, a *M. tuberculosis* (Muñoz, 1997b). En els assajos serològics pel diagnòstic de la TB que s'han realitzat amb aquest antígen, s'han utilitzat els LOS de "*M. canettii*".

Papa *et al.* (1993) trobaren una sensibilitat de només el 14% per a una especificitat del 100%, analitzant sèrum de 20 malalts amb TB pulmonar i 27 controls sans. En canvi, Daleine i Lagrange (1995) detectaren igualment IgG en 36 malalts tuberculosos i van obtenir una sensibilitat del 60% en VIH-negatius i del 94% en VIH-positius, amb una especificitat del 93 i el 98%, respectivament, mentre que per a la IgM no trobaren diferències respecte del grup de control. Aquests autors no troben diferències en la producció d'anticossos entre individus amb TB pulmonar i extrapulmonar, ni entre individus tinció positiva i tinció negativa. Detectant IgG, Simonney *et al.* (1996) troben una sensibilitat del 56% en VIH-negatius i del 73.9% en VIH-positius, amb una especificitat del 98%.

#### **A.2.4.2.2.5 PGL**

Els bons resultats obtinguts inicialment en el diagnòstic de la lepra amb el PGL-I de *M. leprae* van encoratjar els investigadors a trobar-ne l'homòleg per a la malaltia tuberculosa. Es purificà el PGL-Tb1 de "*M. canettii*", que es troba en quantitats considerables a la paret d'aquesta espècie (8% de l'extracte cru del bacteri) (Astola, comunicació personal), i se'n comprovà la immunogenicitat (Papa, 1988 i 1989); posteriorment, s'han realitzat molts estudis per a avaluar-ne la capacitat serodiagnòstica. Els resultats obtinguts es troben representats a la taula 8. Diferents estudis han mostrat que la part sacàrida és la que proporciona antigenicitat a la molècula (Papa, 1989; Vercellone, 1992).

Malauradament, els estudis serològics es contradiuen amb els bioquímics. Mentre un grup d'autors argumenta l'existència de PGL-Tb1 en aïllats clínics per la producció d'anticossos en malalts amb TB; un altre grup d'autors nega la utilitat d'aquest glicolípid en serologia ja que no s'ha trobat PGL-Tb1, o se n'han trobat traces en alguns aïllats clínics de *M. tuberculosis* (Chaicumpar, 1997; Daffé, 1991; Muñoz, 1997b: Annex d'aquesta tesi).

Al *M. tuberculosis* s'han trobat altres PGL que difereixen del Tb1 en el  $\alpha$ -diol, que també s'han avaluat per a la detecció d'anticossos. Watanabe *et al.* (1995) troben anticossos IgM enfront d'aquests glicolípid (PGL-TbK i PGL-TbO) tant en malalts amb TB (171) com en individus sans (192), de manera que consideren que la presència d'anticossos enfront dels PGL és un bon indicador d'infecció.

TAULA 8. Assajos serològics que utilitzen PGL-Tb 1 com a antígen

Malalts TB	Controls	Ig	Sensibilitat	Especificitat	Referència
40 pulmonar	122 sans	IgM	97,5%	86,1%	Torgal-García, 1988
39 pulmonar 7 extrapulm.	134 sans	IgM	97,8%	91,8%	Torgal-García, 1989a
48 pulmonar 10 meníngea	134 sans	IgM	97,9% pulmonar 100% meníngea	91,8%	Torgal-García, 1989b
35 pulmonar 3 extrapulm.	62 sans	IgG IgM	94,7% 65,8%	96,8% 75,8%	Martín-Casabona, 1985
50 pulmonar	25 sans	IgG	60%	100%	Ridell, 1992
98 pulmonar 55 extrapulm.	301 sans 59 altres mal.	IgG	66,3% pulmonar 56,3% extrapulm.	92,3% sans 81,3% altres mal.	Simonrey, 1995
26 pulmonar 10 extrapulm.	104 sans	IgG	0%	95%	Dalcine i Lagrange, 1995
50 pulmonar 46 extrapulm.	50 sans 29 altres mal.	IgG	64,6%	98%	Simonrey, 1996

Extrapulm.: extrapulmonar; altres mal.: altres malalties.

#### A.2.4.2.2.6 PIM

Els PIM constituïen una de les fraccions glicolípídiques purificades per Reggiardo *et al.* (Ridell, 1992). Posteriorment, només un estudi ha avaluat la seva capacitat serodiagnòstica. Mehta i Khuller (1988) comparen els PIM amb la PPD com a antígens utilitzant 60 sèrums de malalts amb TB pulmonar i 47 controls, i n'obtenen una sensibilitat del 71% en individus tinció negativa i del 94.4% en individus tinció positiva, i una especificitat del 97% en el grup de sans i del 100% en el grup d'individus amb altres malalties respiratòries.

#### A.2.4.2.2.7 SL-I

Malgrat que és exclusiu de les soques virulentes de *M. tuberculosis*, únicament s'han fet dos estudis exhaustius per analitzar el potencial d'aquest glicolípid en el serodiagnòstic de la malaltia tuberculosa. En tots dos s'estudia la presència d'IgG i IgM.

Cruaud *et al.* (1989) el comparen amb les DAT (aleshores SL-IV) i troben, per a la detecció d'IgG, sensibilitats del 33 i el 39% i especificitats del 100 i el 96%, respectivament, segons el punt de tall escollit. Pel que fa a la detecció d'IgM,

diuen que és negligible per al diagnòstic. Només inclouen en el seu estudi individus sans i malalts tuberculosos.

Rojas-Espinosa *et al.* (1999) realitzen un estudi per comparar la resposta d'IgG i IgM en malalts afectats de TB i lepra, enfront del SL-I i del PGL-I de *M. leprae*. Amb ambdós antígens poden discriminar entre malalts i sans, però no troben diferències en la resposta dels malalts amb TB i lepra, respecte de tots dos antígens. Conclouen que cap dels dos antígens és útil per al diagnòstic diferencial de cap de les dues malalties.

#### **A.2.4.2.2.8 TAT**

A la bibliografia únicament existeixen tres treballs que utilitzin les TAT com a eina diagnòstica: Sempere *et al.* (1995) i Escamilla *et al.* (1996), que utilitzen les TAT purificades a partir de *M. fortuitum*, i un treball realitzat en el nostre laboratori que compara la reacció serològica enfront de les TAT de *M. tuberculosis* i *M. fortuitum* (Muñoz, 1997a: Annex d'aquesta tesi).

En el primer estudi (Sempere, 1995) s'avalua la resposta serològica utilitzant sèrums de malalts tuberculosos (84), d'altres malalties respiratòries (38) i individus sans (46), i s'obté una sensibilitat per a la detecció d'IgG del 79% i el 39%, amb una especificitat que oscil·la entre el 83 i el 98%, respectivament, segons el punt de tall escollit. Detectant IgM es van trobar sensibilitats entre el 2 i el 10%, amb especificitats entre el 77% i el 100%.

En els dos estudis restants, només s'avalua la detecció d'IgG i s'utilitzen sèrums de malalts afectes de TB pulmonar i d'individus sans. En tots dos casos, s'obtenen sensibilitats i especificitats molt elevades, entre el 91-93% i el 96-98%, respectivament, depenent del punt de tall escollit (Escamilla, 1996; Muñoz, 1997a). No hi ha diferències significatives en els resultats obtinguts amb l'antigen purificat a partir de *M. tuberculosis*, enfront del purificat de *M. fortuitum*.

#### **A.2.4.2.2.9 Barreja de glicolípidis**

Dos grups d'investigadors han avaluat la possibilitat de posar diferents glicolípidis purificats en un mateix pou de la placa d'ELISA, per tal d'avaluar-ne la utilitat serodiagnòstica. D'altra banda, utilitzant principalment CF i en menys quantitat DAT, TAT, SL-I i PGL, Kawamura *et al.* (1997) troben una sensibilitat del 90% i una especificitat del 98%. En el mateix estudi, comparen la vàlua del CF purificat tant mitjançant columnes de cromatografia líquida com rasant-lo d'una TLC, i n'obtenen el mateix resultat. En aquest estudi, utilitzen mostres d'individus tuberculosos i sans. Posteriorment s'ha avaluat exhaustivament aquest ELISA en

la seva versió comercialitzada (apartat A.2.5.1.5).

D'altra banda, Harrington III *et al.* (2000) proposen l'ús de DAT, SL-I, PIM i BDA-TDA (bis-N, N-*dioctadecylamide of trehalose dicarboxylic acid*, un anàleg sintètic del CF) en un mateix pou. Analitzant sèrum de 155 malalts tuberculosos i 211 individus de control (100 sans, 79 contactes, i 32 amb altres malalties pulmonars), troben una especificitat del 95% i una sensibilitat del 61%, que incrementa fins a un 80% amb la dissolució d'immunocomplexos, en les mostres que havien donat negatives per a la detecció d'anticossos.

### **A.2.5 Tests serològics comercialitzats**

Malgrat que s'havien realitzat moltes proves de laboratori, l'interès de les cases comercials per a desenvolupar tests serològics no es manifesta fins a ben entrats els anys vuitanta. L'aparició de l'ELISA, que suposa una garantia de reproductibilitat i baix cost econòmic, comença a interessar en el diagnòstic de la TB. Al llarg de la dècada dels noranta s'han anat introduint diferents tests, que descriurem en aquest apartat.

Actualment existeixen en el mercat diferents assajos, basats en diferents antígens, que detecten IgG, IgM o IgA en formats d'ELISA, DOT i immunocromatografies (taula 9). Les dades dels assajos clínics són insuficients per avaluar la qualitat de la majoria dels tests, tot i que en general es pot dir que detecten des del 30 al 75% de malalts amb tinció positiva, i una proporció més petita de casos amb tinció negativa en malalts sense coinfecció pel VIH. En el cas dels coinfectats, es detecten menys del 30% dels malalts tuberculosos (Perkins, 2000). Diferents autors han avaluat la seva capacitat, però recentment s'ha reclamat més rigor en aquests assajos (Small i Perkins, 2000). Tal com argumenten aquests autors, la majoria de tests són avaluats en estudis finançats per les mateixes empreses que els treuen al mercat o realitzats únicament amb la finalitat de publicar, amb el subsegüent biaix dels resultats. Així doncs, és indispensable mantenir un consens seriós sobre aquest punt tenint en compte el tipus i el nombre de població estudiada.

Mostrarem els resultats obtinguts amb els tests comercialitzats en diferents formats, ELISA, DOT, o immunocromatografia, utilitzant diferents tipus d'antígens: extractes semipurificats, proteïnes recombinants o lipoglicans.

TAULA 9. Tests comercialitzats per al diagnòstic serològic de la TB

Format	Nom de Passaig	Fabricant	Antigen/s utilitzat/s	Conjugat	Referències	
ELISA	ANDA TB	Anda Biologicals, França	A60	IgG, IgM, i IgA	Apartat A.2.5.1.1	
	Kp-90 TB ELISA	Kreatech Diagnostics, Holanda	Kp-90	IgA	Apartat A.2.5.1.2	
	Kreatech TB IgA ELISA	Kreatech Diagnostics, Holanda	KT3	IgG i IgA	www.kreatech.com	
	Pathozyme MYCO	Omega Diagnostics, Escòcia	38 kDa i LAM	IgG, IgM, i IgA	Apartat A.2.5.1.3	
	Pathozyme TB <i>complex</i>	Omega Diagnostics, Escòcia	38 kDa i 16 kDa	IgG	Apartat A.2.5.1.3	
	Detect-TB	BioChem ImmunoSystems, Inc., Canadà	Proteïna/pèptids	IgG	Apartat A.2.5.1.4	
	ELAGEN DETECT Kit	InflaZyme Pharmaceuticals Ltd. and BioChem ImmunoSystems Inc., Canadà	Sintètic pseudo-CF	IgG	-	
	Anti-TBGL antibodies assay kit	Kyowa-Medex Co., Ltd., Japó	TBGL: principalment CF, junt amb DAT, TAT, SL-I, i PGL	IgG	Apartat A.2.5.1.5.	
	DOT	MycroDot™	DynaGen, Inc., USA	LAM	IgG	Apartat A.2.5.2.1
		ICT TB Test	ICT Diagnostics, Austràlia; Binox, USA	5 antigens proteïcs recombinants (un d'ells 38 kDa)	IgG	Apartat A.2.5.3.1
Rapid test TB		Quorum Diagnostics, Vancouver, Canadà	38 kDa	IgG	Apartat A.2.5.3.2	
Focus™ TB Flo-Trough test		ABP Diagnostics Ltd., UK	Lipopolisacàrid i proteïna barrejats	IgG	www.abpdiagnostics.co.uk	
TB Stat-Pak		Chembio Diagnostic Systems, USA	Un únic antígen recombinant	IgG	www.chembio.com	
DiagnosTech TB test		DiagnosTech, Inc., La Jolla Diagnostics, Inc., USA	3 antigens específics	IgG	www.lajd.com	

## **A.2.5.1 Els ELISA**

### **A.2.5.1.1 Anda-TB**

ANDA DIAGNOSTICS (Anda Biologicals, Estrasburg, França).

Aquest test ha estat el primer dels assajos serològics comercialitzats. Utilitza com a antigen l'A60, un compost format per uns 30 components, que inclouen lípids lliures i units, polisacàrids i proteïnes, els quals representen la fracció majoritària termoestable del PPD (Cocito, 1991; Maes, 1989). Aquesta fracció es troba també en altres espècies del gènere *Mycobacterium*, a *Nocardia* i *Corynebacterium*. El test es realitza entre 2,5 i 3 hores. Existeixen tres tipus de tests per a la detecció d'IgG, IgM, i IgA, respectivament.

L'ANDA-TB ha estat avaluat en molts estudis, tal com s'indica a la taula 11. Els resultats obtinguts pels diferents autors presenten una elevada variabilitat. S'han descrit sensibilitats entre el 17% i el 89% en malalts amb TB pulmonar, i d'entre el 32% i 86% en malalts amb formes extrapulmonars. La sensibilitat no supera el 51% en els treballs on s'estudien sèrums de nens amb TB (Taula 10). A més, com que no és un antigen específic d'espècie, hi reaccionen sèrums d'individus amb infeccions per altres micobacteris diferents del *M. tuberculosis* (Cocito, 1991; Taula 10).

### **A.2.5.1.2 Tuberculosis IgA EIA**

Tuberculosis IgA EIA (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Holanda).

Recentment s'ha introduït al mercat un altre test que utilitza com a antigen un compost semblant a l'A60, l'anomenat Kp-90. Aquest compost s'obté a partir de BCG. El bacil es trenca mitjançant *French-press* i es sonica, se centrifuga durant 2 hores a 4°C, i el pellet obtingut és el complex antigènic anomenat Kp-90. Es detecten anticossos IgA enfront d'aquest antigen.

Quatre estudis han avaluat la utilitat d'aquest test per al serodiagnòstic de la TB. Arikan *et al.* (1998) estudien una població de 51 malalts amb TB (23 amb TB pulmonar i 28 amb TB extrapulmonar) i 71 individus de control, i troben una sensibilitat del test del 78 o el 68%, segons si s'utilitza sèrum o altres fluids corporals, amb unes especificitats del 90 i del 97%, respectivament. Alifano *et al.* (1997), en una població de 88 individus amb TB pulmonar i 87 controls, troben una sensibilitat i una especificitat del 70% i el 91%, respectivament.

Contràriament a aquests dos estudis, Chiang *et al.* (1997), en un ampli treball utilitzant sèrum de 312 pacients amb TB pulmonar i 282 controls, mostren una sensibilitat i una especificitat del test del 80% i del 41%, respectivament, que canvia al 62% i al 66%, en ajustar el punt de tall del test. Finalment, Pottumarthy

*et al.* (2000) troben una sensibilitat del 58% en 33 malalts amb TB pulmonar i del 55% en 11 individus amb TB extrapulmonars i, una especificitat del 93% i el 62% en 204 sans i 50 individus d'altres malalties, respectivament.

### A.2.5.1.3 Pathozyme kits

La casa comercial Omega Diagnostics Ltd. (Alloa, Escòcia) té dos tipus de test al mercat:

- Pathozyme-TB *complex test kit*
- Pathozyme-MYCO IgG, IgM, i IgA *assay kits*

Tots dos tipus de tests són ELISA que es poden realitzar en un temps d'entre 2 i 2,5 hores. El primer test (*complex*) utilitza dues proteïnes recombinants (38kDa i 16kDa) com a antigens i detecta IgG en sèrum, mentre que el segon test (MYCO) utilitza la proteïna recombinant 38kDa i LAM, i existeix en tres formats, per a la detecció d'IgG, IgM, o IgA, respectivament. S'han realitzat diferents assajos amb aquests tests els quals s'especifiquen a la taula 11. Aquests resultats també són discordants entre els diferents autors, però en general tots mostren sensibilitats baixes.

TAULA 11. Avaluacions dels tests Pathozyme

Malalts TB	Controls	Sensibilitat	Especificitat	Test	Referència
292 pulmonar	34 sans 24 altres mal.	66,4%	94,1% sans 95,8% altres mal.	<i>Complex</i>	Wilkinson, 1997
13 pulmonar	9 sans 18 altres mal.	40%	100% sans 81,2% altres mal.	<i>Complex</i>	Grubek-Jaworska 1997
312 pulmonar	118 sans 63 altres mal. 101 TB abans tall fabricant)	64,2% (39,1% punt de tall fabricant)	80,7% (89,7% punt de tall fabricant)	<i>Complex</i>	Chiang, 1997
33 pulmonar 11 extrapulm.	204 sans 50 altres mal.	15% pulmonar 18% extrapulm.	97% sans 96% altres mal.	<i>Complex</i>	Pottumarthy, 2000
		58% pulmonar 46% extrapulm.	89% sans 90% altres mal.	MYCO-IgG	
		21% pulmonar 9% extrapulm.	80% sans 100% altres mal.	MYCO-IgM	
		46% pulmonar 27% extrapulm.	85% sans 72% altres mal.	MYCO-IgA	

Extrapulm.: extrapulmonar; altres mal.: altres malalties.

### A.2.5.1.4 Detect-TB

Detect-TB (BioChem ImmunoSystems, Mont-real, Quebec, Canadà).

És un ELISA desenvolupat recentment, que utilitza diferents antigens: dues proteïnes recombinants i tres pèptids sintètics de 5 proteïnes diferents, secretades al medi en un cultiu de *M. tuberculosis* H37Rv. Es detecten IgG.



Només dos treballs fins ara han analitzat la seva vàlua serodiagnòstica. A Zahrani *et al.* (2000) troben una sensibilitat del 33% i una especificitat del 87%, amb el punt de tall que els autors escullen, ja que amb el que el fabricant escull els resultats són del 45% de sensibilitat i el 77% d'especificitat. En el seu estudi, avaluen 60 malalts amb TB pulmonar i un grup de 440 controls: 277 amb TB inactiva, 122 malalts no TB, 14 malalts per MOTT i 27 sans. D'altra banda, Amicosante *et al.* (1999) en descriuen una sensibilitat més alta, del 75% (del 84% en sèrums d'individus amb tinció positiva i del 65% en individus amb tinció negativa) en 100 malalts amb TB pulmonar; amb una especificitat global del test del 97%: del 92% en 150 sans, del 100% en 50 vacunats, del 98% en 50 contactes i del 85% en 20 malalts d'altres pneumònies.

#### **A.2.5.1.5 Anti-TBGL antibodies assay kit**

Anti-TBGL antibodies assay kit (Kyowa-Medex Co., Ltd., Tokyo, Japó).

Aquest test en format d'ELISA, desenvolupat al Japó, utilitza com a antígen una barreja de glicolípid purificats: principalment CF, juntament amb DAT, TAT, SL-I i PGL purificats de la soca *M. tuberculosis* H37Rv. Aquesta barreja d'antígens l'anomenen TBGL. L'any 1997 els mateixos autors van descriure la sensibilitat i l'especificitat que havien observat inicialment al laboratori (apartat A.4.2.2.9).

Recentment, en un ampli estudi amb aquest kit, en què es detecten IgG en un total de 1.277 mostres (Maekura, 2001), els resultats obtinguts han estat d'una sensibilitat del 81% en malalts tuberculosos i del 79% en malalts amb infeccions provocades per altres micobacteris. Malgrat que l'especificitat obtinguda és del 95% en joves sans menors de 30 anys, disminueix fins al 82, el 84, el 85, i el 74% en adults sans, altres malalties no respiratòries, altres malalties respiratòries i TB antigues, respectivament. Així doncs, la sensibilitat i l'especificitat global del kit per al diagnòstic de la TB és del 81% i el 79%, respectivament.

#### **A.2.5.2 Els DOT**

##### **A.2.5.2.1 MycoDot™ test**

MycoDot™ test (Dynatech Inc., EUA).

Aquest test utilitza com a antígen el LAM. El kit és format per una pinta on hi ha l'antígen unit a cadascuna de les puntes de les pines. Aquesta pinta se submergeix primer en el sèrum diluït i posteriorment en el conjugat marcat amb or col·loïdal. Es deixa assecat i es llegeix la reacció enfront d'una gradació de tonalitats rosades que fan de patró. El test és molt simple d'utilitzar, cal poc material de laboratori i el temps total requerit és tan sols de 20 minuts.

Els resultats obtinguts per diferents autors es mostren a la taula 12. Aquests resultats són molt divergents, i s'obtenen rangs de sensibilitat i especificitat molt amplis. Mentre que tots els autors coincideixen en una especificitat del test elevada (per sobre del 84%), divergeixen en els resultats de sensibilitat: Chan (2000) i Del Prete (1998) troben sensibilitats molt altes, mentre que per a la resta són considerablement més baixes. Chan *et al.* (2000) argumenten que aquesta baixa sensibilitat observada per diferents autors pot ser deguda al temps d'incubació del sèrum, ja que s'observen millores considerables si la incubació dura entre 40 i 60 minuts, en comptes dels 20 minuts que prescriuen els fabricants del kit, i si es manté una agitació constant.

TAULA 12. Avaluacions del test MycoDot<sup>SM</sup>

Malalts TB	Controls	Sensibilitat	Especificitat	Referència
85 (ND)	85 sans 104 MOTT	10,6%	100% sans 98% MOTT	Boggian, 1996
52 pulmonar	40 altres mal.	44,2%	97,5%	Lawn, 1997
230 pulmonar 60 extrapulm.	308 sans	53% pulmonar 43,3% extrapulm.	97,4%	Ratanasuwan, 1999
24 pulmonar 4 extrapulm.	50 sans 74 sospitosos TB	95,8% pulmonar 50% extrapulm.	100%	Del Prete, 1998
83 pulmonar	102 sospitosos TB	16%	84%	Somi, 1999
29 pulmonar (Índia)	37 sans	93%	100%	Chan, 2000
13 pulmonar (USA)	84 sans 7 TB abans	85%	94% sans 29% TB abans	Chan, 2000

Extrapulm.: extrapulmonar; ND: No Determinat; altres mal.: altres malalties; MOTT: alt micobacteri diferent de *M. tuberculosis*

### A.2.5.3 Immunocromatografies

#### A.2.5.3.1 ICT Tuberculosis diagnostic kit

ICT Tuberculosis diagnostic kit (ICT Diagnostics, Balgowlah, Nova Gal·les del Sud, Austràlia).

L'ICT tuberculosis test és una immunocromatografia basada en la detecció d'anticossos IgG enfront de cinc antígens secretats per *M. tuberculosis*, utilitzant anti-IgG humana marcada amb or col·loïdal. Un dels cinc antígens utilitzats és la proteïna recombinant 38kDa i els altres quatre són desconeguts per l'usuari.

A la taula 13 es descriuen els resultats en termes de sensibilitat i especificitat obtinguts amb aquest test. Els primers articles que aparegueren a la bibliografia amb la finalitat d'avaluar aquest test mostraven unes sensibilitats i especificitats elevades (Cole, 1996; Zhou, 1996), que únicament han estat corroborades per Chang *et al.* (2000). La resta d'autors en general n'obtenen una especificitat alta però sensibilitats inferiors al 50%.

TAULA 13. Avaluacions del ICT TB Test

Malalts TB	Controls	Sensibilitat	Especificitat	Referència
152 pulmonar	30 sans 56 altres mal.	79,6% pulmonar	96,6% sans 91% altres mal.	Cole, 1996
201 pulmonar	79 sans	78,1% pulmonar	94,9% sans	Zhou, 1996
67 extrapulm.	7 altres mal.	76% extrapulm.	88% altres mal.	
8 pulmonar	101 altres mal.	50% pulmonar	100%	Grobusch, 1998
4 extrapulm.		50% extrapulm.		
34 pulmonar	47 sans	41,2% pulmonar	100% sans	Struyf, 1999
7 extrapulm.	38 altres mal.	42,9% extrapulm.	91,4% altres mal.	
59 pulmonar	3 sans	20%	100% sans	Mathur, 1999
	32 altres mal.	(4% en el primer mes)	94% altres mal.	
	10 MOTT		70% MOTT	
33 pulmonar	204 sans	49% pulmonar	96 sans	Pottumarthy, 2000
11 extrapulm.	50 altres mal.	18% extrapulm.	88% altres mal.	
24 pulmonar	24 sans	68,2% pulmonar	83,4% sans	Rasolofo, 2000
23 extrapulm.	19 altres mal.	65,2% extrapulm.	73,7% altres mal.	
37 recent	60 sans	73% recent	91,6% sans	Chang, 2000
31 recaiguda	17 altres mal.	87% recaiguda	94% altres mal.	
67 TB pleural	52 altres mal.	50,7%	57,7%	Chierakul, 2001

Extrapulm.: extrapulmonar; altres mal.: altres malalties; MOTT: altre micobacteri diferent del *M. tuberculosis*

#### A.2.5.3.2 Rapid Test TB

RAPID TEST TB (QUORUM DIAGNOSTICS, Vancouver, British Columbia, Canadà)

Fins ara, només un estudi a la bibliografia avalua aquest kit en format d'immunocromatografia. Pottumarthy *et al.* (2000) troben una sensibilitat de

només el 25% (el 27% en 33 malalts amb TB pulmonar, i el 18% en 11 malalts amb TB extrapulmonar), amb una especificitat del 87% en 204 sans i del 86% en 50 malalts amb malalties diferents a la TB. L'antigen que s'utilitza és la proteïna recombinant 38 kDa.

# **OBJECTIUS**



## B. Objectius

Els objectius principals que s'han plantejat a l'inici d'aquest treball han estat:

1. Desenvolupar un enzim immunoassaig utilitzant antígens glicolípidics: DAT, TAT, CF, i SL-I aïllats de la paret cel·lular de *M. tuberculosis*, i PGL-Tb1 aïllat a "*M. canettii*".
2. Determinar la presència d'immunoglobulines específiques de les classes IgG, IgM i IgA en sèrums de malalts tuberculosos i un ampli grup de població de control, enfront de quatre glicolípidis purificats: DAT, TAT, CF, i SL-I.
3. Avaluar la capacitat serodiagnòstica de nou tests comercialitzats que utilitzen com a antígens extractes proteics (A60 i Kp-90), proteïnes recombinants (38 kDa i 16 kDa), i/o polisacàrids (LAM).
4. Comparar la capacitat serodiagnòstica dels tests basats en els antígens glicolípidics amb nou tests comercialitzats. Analitzar la possible complementació dels diferents tests basats en diferents tipus d'antígens purs.

