

RESULTATS I DISCUSSIÓ

C. Resultats i discussió

En vista dels prometedors avantatges que comportaria disposar d'un test de serodiagnòstic per a la TB, a l'inici d'aquest treball ens vam plantejar avaluar la capacitat serodiagnòstica dels diferents antígens glicolípidics de la paret dels micobacteris. La localització d'aquestes molècules a la paret del micobacteri els fa bons candidats per a la seva implicació en la resposta humoral. Així doncs, vam escollir les molècules més estudiades (de principi dels anys vuitanta i durant tota la dècada dels noranta) com ara el PGL-Tb 1, el CF o les DAT, i dues gairebé no avaluades però atractives: el SL-I i les TAT. El SL-I es troba exclusivament a la paret de soques virulentes de *M. tuberculosis* i les TAT s'han descrit únicament en *M. tuberculosis* i *M. fortuitum*.

Després d'una revisió bibliogràfica exhaustiva, vam veure que la bibliografia prèvia era molt confusa. Alguns treballs conclouien que alguns d'aquests antígens eren útils i d'altres que la mateixa molècula no tenia vàlua serodiagnòstica. De la mateixa manera, vam analitzar els protocols que seguia cadascun dels treballs i hi vam observar una gran heterogeneïtat en la metodologia utilitzada (resumida a la taula 1 de l'article IV). Així, ens vam proposar verificar si les diferències metodològiques dels treballs anteriors podien ser la base dels resultats discrepants obtinguts fins al moment. Al mateix temps, desenvolupàvem un test idoni per a l'avaluació d'aquests antígens.

Inicialment vam intentar desenvolupar un DOT-ELISA, utilitzant com a suport membranes de nitrocel·lulosa o de PVDF (*polyvinylidene difluoride*). Vam assajar els diferents tipus de suport, basant-nos en la resposta enfront d'aquests glicolípidics d'uns pocs sèrums pertanyents a malalts amb una TB pulmonar, abans de començar el tractament antituberculós, i controls sans. A diferència de Vera-Cabrera *et al.* (1999), que troben com a millor suport per a les DAT la membrana de nitrocel·lulosa, nosaltres vam observar que amb la membrana de PVDF s'unien bé tots els glicolípidics. Vam poder comprovar la unió a la membrana utilitzant reveladors específics com l'antrona, l'àcid fosfomòbdílic o el cresil violeta. Amb aquesta membrana, podíem utilitzar cloroform (que és el solvent amb què es poden dissoldre ràpidament tots els glicolípidics), a diferència de la membrana de nitrocel·lulosa que no tolera el cloroform. A més, era fàcil de manipular i els resultats eren reproductibles. El fet més important fou que a l'hora de realitzar l'immunoassaig obteníem menys soroll de fons que utilitzant la membrana de nitrocel·lulosa (figura 13). Aquestes molècules glicolípidiques estan constituïdes per una part hidrofílica, la molècula de trealosa que és la que els confereix l'antigenicitat (Papa, 1989), i una part hidrofòbica, constituïda pels àcids grassos que esterifiquen la trealosa. La naturalesa hidrofòbica de la membrana de PVDF

ens garantia que els glicolípidis podien unir-se per la seva part hidrofòbica, i deixar exposada als anticossos la part sacàrida.

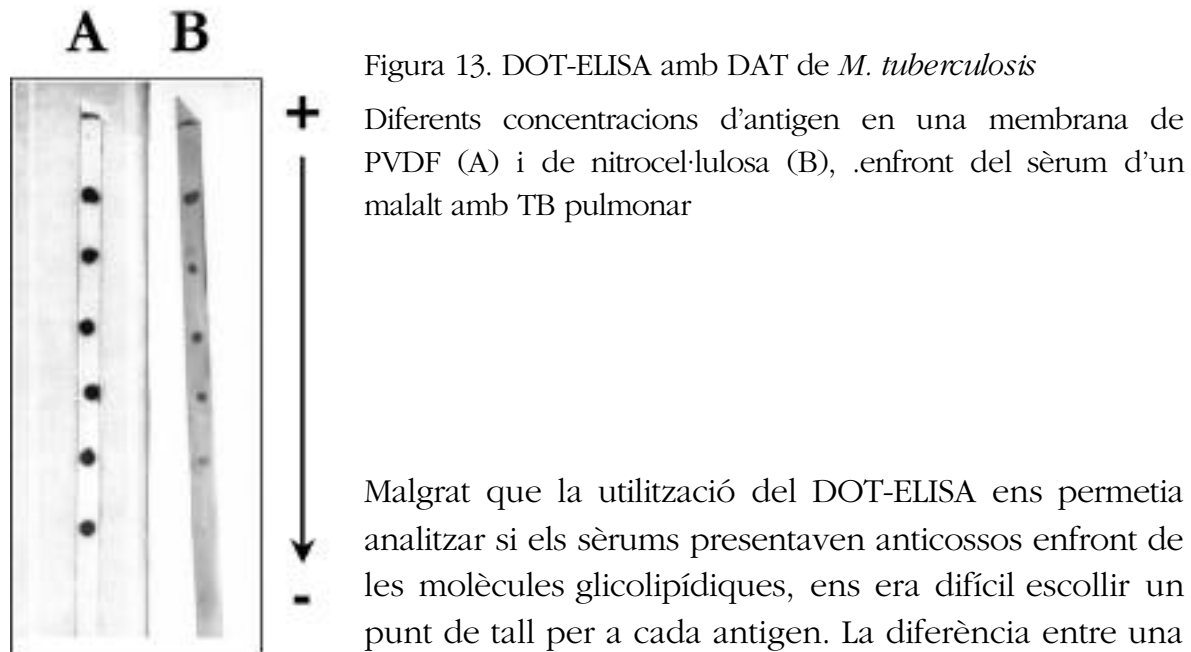


Figura 13. DOT-ELISA amb DAT de *M. tuberculosis*

Diferents concentracions d'antigen en una membrana de PVDF (A) i de nitrocel·lulosa (B), enfront del sèrum d'un malalt amb TB pulmonar

Malgrat que la utilització del DOT-ELISA ens permetia analitzar si els sèrums presentaven anticossos enfront de les molècules glicolípidiques, ens era difícil escollir un punt de tall per a cada antigen. La diferència entre una

reacció positiva o negativa depenia de la intensitat del color blau produït pel substrat de la fosfatasa alcalina, i aquesta lectura depenia del criteri de qui llegia la reacció. A més, la utilització de tires de membrana dificultava el poder avaluar simultàniament una gran quantitat de sèrums. Així doncs, amb la finalitat de poder avaluar d'una manera objectiva la utilitat de cada antigen i poder estudiar un gran nombre de mostres de sèrum desenvolupàrem un enzim immunoassaig en plaques de microtitulació. Primerament, vam escollir plaques MultiScreen-IP (Millipore Corporation), que es caracteritzen perquè en el fons del pou tenen una membrana hidrofòbica de PVDF, on ja sabíem que hi havia una unió estable dels antigens glicolípidics. L'única diferència amb un ELISA en plaques de poliestirè fou que després d'afegir el substrate per la fosfatasa i deixar que reaccionés, s'havia de passar el contingut del pou a una placa de plàstic per a poder llegir la densitat òptica (OD) en un lector de plaques. Utilitzant aquest mètode vam analitzar simultàniament la resposta d'IgG en un ampli grup de sèrums de malalts afectes de TB pulmonar i un grup de controls sans, enfront de les DAT i TAT de *M. tuberculosis* i *M. fortuitum*. El nostre objectiu fou avaluar la possible diferència a nivell d'antigenicitat de les dues procedències (Annex: Muñoz, 1997a). Amb aquest mètode podíem tenir una lectura objectiva dels resultats, sense la influència de la persona que llegia els resultats.

Les DAT de *M. tuberculosis* i *M. fortuitum* oferien un 68 i un 76% de sensibilitat, respectivament, amb unes especificitats del 96,2 i el 100%, mentre que les TAT de *M. tuberculosis* i *M. fortuitum* mostraren una sensibilitat del 76 i el 80%, amb especificitats del 96,2 i el 100%. Així doncs, un cop coneixíem el potencial de dos

dels antígens glicolípídics, com a mínim, ens plantejarem la necessitat d'avaluar aquests antígens juntament amb el SL-I i el CF enfront d'una població molt més nombrosa de sèrums que incloguessin individus amb TB tant pulmonar com extrapulmonar, adults i nens, i controls tant sans com malalts afectes d'altres pneumònies. La realització d'aquests assajos tenia l'inconvenient del cost elevat d'aquestes plaques d'ELISA, i el problema d'haver de passar el volum final del substrat de la reacció a una altra placa per a llegir-la. Així doncs, vam decidir posar a punt l'immunoassaig en plaques de poliestirè.

C.1 Desenvolupament d'un enzim immunoassaig per a antígens glicolípídics purificats de la paret de *Mycobacterium tuberculosis* (article IV)

C.1.1 Solvent, tampó, concentració d'antigen i dilució d'anticossos

La utilització de plaques de poliestirè per a unir els glicolípidis va implicar, inicialment, haver d'estudiar com dissoldre cadascun dels glicolípidis en un solvent diferent del cloroform, ja que aquest solvent orgànic destrueix les plaques de poliestirè. Vam comprovar la solubilitat de cada un dels antígens en diferents solvents orgànics tolerats pel poliestirè. A la bibliografia prèvia s'utilitzava preferentment hexà, però alguns autors usaven etanol, hexà-etanol o metanol (taula 1 de l'article IV). Després de comprovar mitjançant TLC la solubilitat de cada un d'ells en cada solvent, en comparació del mateix glicolípid dissolt en cloroform, escollírem *n*-hexà per a diluir tots els antígens.

Amb uns pocs sèrums pertanyents a individus malalts amb TB pulmonar amb tinció positiva i a controls d'altres pneumònies i sans, vam escollir un protocol estàndard (una hora d'incubació per cada anticòs a temperatura ambient) i vam assajar diferents tampons (TBS), variant entre cadascun d'ells la concentració de NaCl, per tal d'evitar reaccions inespecífiques. De totes les concentracions assajades, vàrem trobar que una concentració 0,5 M de NaCl ens permetia disminuir les reaccions inespecífiques del sèrum d'individus amb altres malalties, sense perdre sensibilitat per als sèrums dels malalts tuberculosos (figura 14).

Així doncs, un cop escollits el solvent (*n*-hexà) i el tampó que utilitzaríem (TBS + 0,5 M NaCl), ens vam disposar a determinar la concentració òptima d'antigen per a cadascun dels tests i la dilució òptima dels sèrums. Escollírem la concentració d'antigen en què s'iniciava la corba de saturació de la reacció enfront d'un grup determinat de sèrums. Per a tots els antígens vam trobar que una concentració de

1.000 ng de glicolípid per pou era la idònia per a dur a temer l'assaig. A la figura 15 es mostra, per exemple, les corbes obtingudes utilitzant diferents concentracions d'antigen en tres dels glicolípid avaluats.

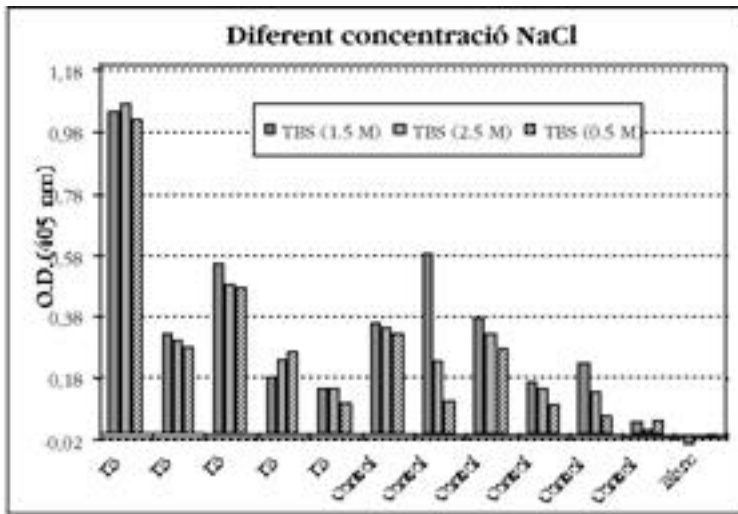


Figura 14. Unió d'IgG al SL-I utilitzant diferents tipus de tampons per a l'ELISA.

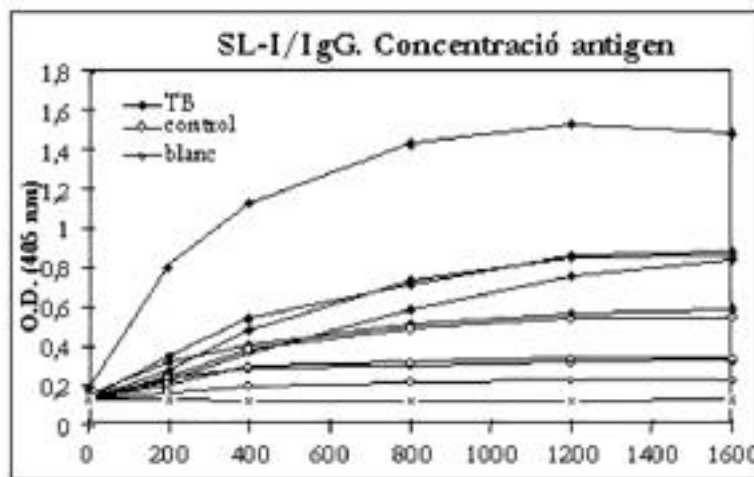
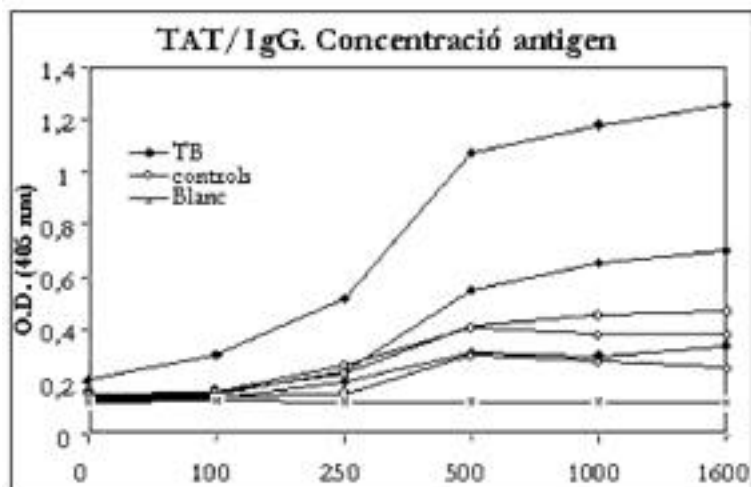


Figura 15. Concentració òptima d'antigen.



Pel que fa a la dilució dels sèrums, amb una concentració fixa d'antigen (els 1.000 ng escollits) assajaren un grup de sèrums (que pertanyien a malalts amb TB, d'altres malalties i sans) a diferents dilucions. Escollírem la dilució que ens permetia separar millor els tuberculosos de la resta, que fou una dilució d'1/400 per a la detecció d'IgG (figura 16), d'1/200 per a la IgM i d'1/100 per a la IgA. Finalment, el conjugat que vam utilitzar era subministrat per un fabricant i el vam utilitzar dins del rang recomanat.

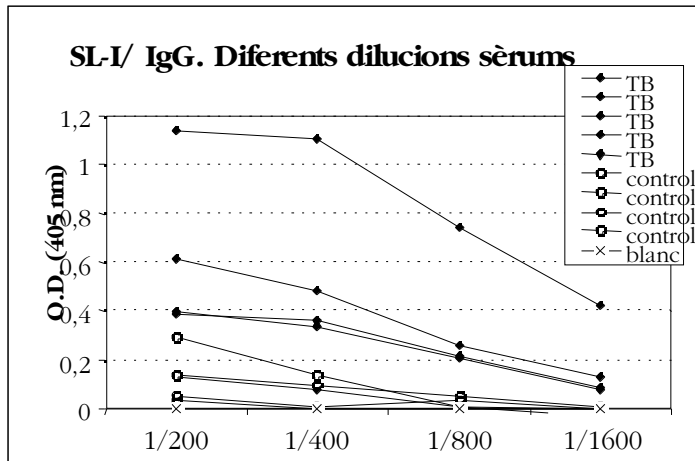
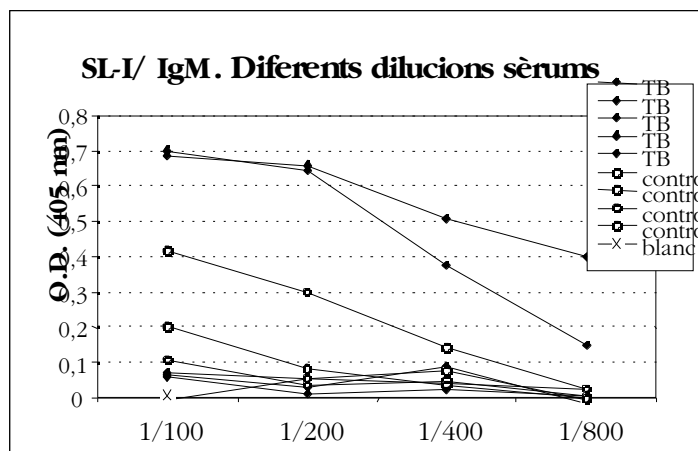


Figura 16. Diferents concentracions dels sèrums enfront del SL-I.



C.1.2 Bloquejador

En la majoria d'assajos previs s'havia utilitzat albúmina sèrica bovina (BSA) com a bloquejador dels pous d'ELISA (taula 1 de l'article IV), però Simonney *et al.* (1995) van recomanar la utilització de gelatina per les possibles reaccions encreuades que hi podia haver entre la BSA i una proteïna descrita a *M. tuberculosis* (TB66), que presentava un 80% d'homologia amb l'extrem N-terminal de la BSA (Deshpande, 1994). Nosaltres vàrem avaluar la resposta d'un grup de 10 sèrums pertanyents a malalts amb TB i 10 de controls sans,

enfront dels diferents antígens utilitzant tant BSA com gelatina i no observaren diferències significatives entre els dos bloquejadors (taula 2 de l'article IV), ni amb l'ELISA ni fent un *Western-blot*. Com que hi observàrem els mateixos resultats vàrem escollir utilitzar gelatina, perquè era l'opció més barata. El preu de la BSA era d'1,78 €/g, enfront dels 0,17 €/g de la gelatina.

C.1.3 Influència del detergent

Finalment, alguns dels estudis previs utilitzant glicolípid usaven detergent (0,05% de Tween 20) en els tampons per tal de disminuir reaccions inespecífiques. Alguns autors l'utilitzaven tant en rentats com en dissoldre els anticossos (taula 1 de l'article IV). Nosaltres vam provar d'utilitzar-ne, però els sèrums que ens donaven positiu fent servir només TBS es negativitzaven per a les DAT, les TAT, el SL-I i el PGL quan feiem servir TBS + 0,05% Tween 20, mentre que es mantenien reactivitats similars (amb Tween 20 i sense) per al CF (figura 1 de l'article IV).

Vam hipotetitzar que la disminució de la reacció podia ser a causa del desenganxament dels glicolípid de la placa en utilitzar Tween 20 a l'assaig. Per a intentar demostrar-ho, vam incubar els antígens units a la placa de microtitulació amb TBS + 0,05% Tween 20, en temps diferents. Després vam recollir el contingut del pou i el monitoritzàrem mitjançant TLC. Vam observar que es podien desenganxar les DAT, les TAT, el SL-I i el PGL units al plàstic, mentre que el CF no es podia recuperar amb TBS + 0,05% Tween 20, però sí que el recuperàvem si afegíem hexà al pou (figura 2 de l'article IV). Aquest experiment ens podia explicar les discrepàncies en els resultats de sensibilitat i especificitat obtinguts en alguns dels treballs previs. Per exemple, estudis en què s'obtenien baixes sensibilitats amb les DAT i les TAT utilitzaven Tween 20 al llarg de tot el protocol (Sempere, 1995). Els nostres resultats, doncs, constitueixen una millora respecte dels procediments utilitzats anteriorment i expliquen alguns dels resultats discrepants obtinguts pels diferents autors.

C.2 Detecció d'immunoglobulina G, IgM i IgA enfront dels antígens glicolípidics (articles V i VI)

Després de posar a punt el mètode, el pas següent va ser dur a terme un estudi sistemàtic amb cadascun dels antígens (DAT, TAT, SL-I i CF) amb un gran nombre de sèrums. Així, paral·lelament a la purificació dels antígens (Annex: Muñoz, 1997b) i a la posada a punt de la metodologia, vam construir una seroteca per a poder avaluar els tests.

Es van recollir sèrums de tres fonts diferents:

- El Servei de Microbiologia de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (HUGTiP) de Badalona (Barcelona). Vam reunir sèrums d'adults i nens amb TB, sèrums de persones amb pneumònia diferent a la TB i de personal sa de l'HUGTiP.
- El Programa de Control i Prevenció de la Tuberculosi a Barcelona, del Departament de Sanitat i Seguretat Social de la Generalitat de Catalunya. A partir del Dispensari de Malalties del Tòrax Dr. Lluís Sayé, vam reunir sèrums de malalts amb TB, persones PPD-positives i persones vacunades anteriorment amb BCG.
- El dispensari de la Universitat Autònoma de Barcelona. Vam recollir sèrums de voluntaris sans del Departament de Genètica i de Microbiologia de la Facultat de Ciències, i de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina.

Vàrem analitzar tots els sèrums recollits pels protocols estandarditzats i vàrem avaluar els quatre antígens glicolípidics basats en una molècula de trealosa: DAT, TAT, SL-I i CF. Les característiques demogràfiques de les persones de les quals vam obtenir els sèrums es detallen a la taula 1 de l'article V.

Per a homogeneïtzar les dades estudiades i evitar les variacions entre diferents plaques o entre els diferents dies en què vam realitzar els tests, es va seguir el tractament de resultats que prèviament havien descrit Cruaud *et al.* (1990), recomanat (tal com s'indica al material i mètodes de l'article V). Vàrem escollir com a punt de tall la mitjana de l'OD corregida, més 3 vegades la desviació estàndard del grup de control sa, i n'obtinguérem els resultats següents en el grup d'adults: taula 2 i figura 1 de l'article V, i taula 14.

En els resultats obtinguts podem observar que mentre les especificitats obtingudes a tots els tests van estar per sobre del 96,8% considerant només la població sana, les especificitats globals dels tests se situaren entre el 75 i 88% per a la detecció d'IgG, entre el 75 i el 96% per a les IgA i encara per sobre

del 96% per a les IgM. Aquesta davallada en l'especificitat global dels tests

TAULA 14. Sensibilitats i especificitats dels diferents test en la població d'adults.

Test utilitzat	Sensibilitat (%)	Especificitat (%)		
		Controls sans	Altres pneumònies	Global
DAT / IgG	54	100	58,3	82,1
TAT / IgG	68,9	100	41,6	75
SL-I / IgG	81	98,4	50	77,6
CF / IgG	54	98,4	75	88,3
DAT / IgA	66,2	96,8	50	76,7
TAT / IgA	74,3	96,8	47,9	75,8
SL-I / IgA	66,2	100	70,8	87,5
CF / IgA	33,7	96,8	95,8	96,4
DAT / IgM	10,8	98,4	100	99,1
TAT / IgM	24,3	100	91,6	96,4
SL-I / IgM	10,8	98,4	95,8	97,3
CF / IgM	2,7	98,4	97,9	98,2

per a les IgG i IgA era deguda a l'elevada reacció dels sèrums que pertanyien a malalts afectes d'altres pneumònies diferents de la TB (taula 14).

Qualsevol dels tests basats en els antígens glicolípidics que vam desenvolupar era capaç de distingir els malalts tuberculosos de les persones sanes, fins i tot les persones vacunades prèviament amb BCG i/o PPD-positives. En canvi, la majoria de tests (IgG i IgA) no discriminaven la població tuberculosa dels malalts amb altres pneumònies, amb el punt de tall escollit.

Per tal de millorar l'especificitat dins d'aquest grup de malalts i evitar les reaccions encreuades, es pot intentar l'absorció prèvia del sèrum amb un altre antígen, ja sigui un altre micobacteri o un altre microorganisme amb el qual comparteixi epítops el *M. tuberculosis*. Malgrat que altres autors també troben reaccions inespecífiques utilitzant altres antígens (Chan, 2000a), han estat pocs els qui han aprofundit en aquesta possibilitat de millora. Un grup d'investigadors que va estudiar aquesta possibilitat va ser Laal *et al.* (1997). Aquests autors, en estudiar la resposta humoral enfront d'antígens proteics secretats per *M. tuberculosis*, van mesurar-ne la reacció preabsorbint prèviament o no els sèrums amb un sonicat d'*Escherichia coli*. Aquests autors van obtenir una millora en l'especificitat de l'assaig preabsorbint les mostres. Els mateixos autors han continuat aplicant aquesta metodologia en els estudis posteriors amb aquests mateixos antígens. Aquesta opció seria, doncs, un punt a considerar per a realitzar en un futur per tal de millorar l'especificitat dels tests basats en molècules glicolípidiques que hem desenvolupat.

D'altra banda, quant a la sensibilitat obtinguda per cada test, malgrat que és important estudiar malalts amb tinció positiva per a valorar qualsevol test de diagnòstic ràpid, s'han d'estudiar malalts amb tinció negativa que són en els que, potencialment, la serologia seria més útil.

Tal com es pot observar a la taula 2 de l'article V, en el cas de les formes pulmonars pràcticament la mateixa proporció de sèrums de malalts amb tinció positiva i tinció negativa presentaven IgG per al punt de tall escollit. En canvi, en pacients amb formes de TB extrapulmonar, el percentatge de sèrums que donaven un resultat positiu era més elevat en els de tinció positiva. En general també es detectaven més anticossos IgG antiglicolípidis en els casos de malaltia pulmonar que extrapulmonar. Aquesta resposta d'IgG dels de tinció negativa a TB pulmonar era baixa. Estudiant un grup de sèrums més petit i escollint un punt de tall més elevat per tal d'obtenir tests més específics (la mitjana de l'OD corregida més sis vegades la desviació estàndard) (taula 1 de l'article VI), observàrem que només quatre dels vint-i-dos malalts amb tinció negativa donava una OD elevada enfront dels glicolípidis (taula 4 de l'article VI). De manera que, quan els tests que detecten IgG basats en glicolípidis proporcionen veritablement una especificitat elevada, no és possible detectar els individus amb tinció negativa.

Pel que fa a la detecció d'IgA en sèrum enfront dels antígens glicolipídics, sorprenentment va resultar ser la més específica. Aquest estudi era el primer en què s'analitzà la resposta d'IgA enfront d'aquests antígens glicolipídics. Malgrat que s'havien descrit concentracions elevades d'anticossos IgA en malalts amb TB (Daniel i Debanne, 1987) i que s'havien detectat anticossos enfront antígens proteics (Turner, 1988; i recentment: Uma Devi, 2001; Raja, 2002) i semipurificats, amb els quals hi ha fins i tot tests comercialitzats (apartat A.2.5.1), cap estudi fins ara havia intentat utilitzar la detecció d'IgA com a eina serodiagnòstica per antígens glicolipídics. Excepte en el cas de les DAT, en la resta d'antígens trobem una major especificitat detectant IgA que detectant IgG. Cal destacar l'elevada especificitat dels tests CF/IgA i SL-I/IgA quan s'estudiaren sèrums de malalts amb altres pneumònies, per comparació a la resta de tests (taula 2 de l'article V).

Una altra dada que vam extreure d'aquest estudi és la poca utilitat serodiagnòstica de la detecció d'IgM enfront d'aquests glicolípidis, tal com s'observa a la figura 1 de l'article V. En tots els test basats en glicolípidis s'obtingueren sensibilitats per sota del 31% (taula 2 de l'article V). Aquest resultat l'han observat també altres autors utilitzant antígens proteics o semipurificats (Turner, 1994; Gupta, 1995). Escollint un punt de tall elevat (taula 1 de l'article VI), només entre un i tres sèrums dels 52 malalts tuberculosos produïren una resposta d'anticossos IgM alta (taula 3 de l'article VI).

D'altra banda, vam observar diferències en la reactivitat segons la immunoglobulina detectada. En general, amb IgG i IgA obtinguérem valors d'OD de fins a 1,2 (figura 1 de l'article V); en canvi, amb IgM únicament vam trobar títols similars amb les DAT; a la resta d'antígens, els valors d'OD es troben entre el 0,4 i 0,5.

Fins ara havíem analitzat els resultats obtinguts amb el grup d'adults, però un dels grups més problemàtics en el diagnòstic de la TB són els nens (Khan i Starke, 1995). En aquest grup, la resposta més elevada la vam trobar amb el test DAT/IgM, amb una sensibilitat del 16,6% i una especificitat del 87,5%. En general, cap dels tests avaluats va ser capaç de discriminar entre els nens PPD positius i els malalts amb TB. Cal destacar la reacció del CF enfront de l'IgM en la detecció de nens PPD infectats (reaccionaren 4 sèrums dels 14 PPD-positius). Ajustant el punt de tall en el grup de nens, arriben a reaccionar el 50% de PPD-positius, i no reacciona cap dels altres grups de nens, de control o amb TB. Aquestes dades corroboren els estudis previs utilitzant altres antígens en què s'analitza la població pediàtrica (Simonney, 2000; Bothamley, 1995; Turneer, 1994). Així, fins el moment no s'ha trobat cap antigen útil com a eina serodiagnòstica per a nens amb TB.

Una vegada analitzades les dades obtingudes tant en adults com nens, una manera de millorar els resultats d'especificitat podia ser ajustant el punt de tall obtingut per a cada test (Chiang, 1997). Així doncs, escollint, per exemple, la mitjana més dues vegades la desviació estàndard de tota la població de control, arribem a obtenir una especificitat de prop del 94%, amb una sensibilitat del 58% per al test SL-I/IgA en la població d'adults. Aquest test es mostra com el millor dels 12 tests basats en glicolípid estudiats per a la població adulta. En canvi, en el cas de la població pediàtrica, ni ajustant el punt de tall s'aconseguia millorar els resultats dels tests.

C.2.1 Preabsorció d'IgG sèrica

Un cop analitzada la resposta humoral enfront dels glicolípid purificats, vam intentar millorar la sensibilitat dels tests basats en la detecció d'IgM i IgA. Així, vam realitzar una preabsorció de la IgG sèrica, utilitzant un reactiu comercial (bioMérieux), i vam tornar a analitzar la resposta d'IgM i IgA en un total de 56 sèrums (25 de malalts amb TB pulmonar i 31 de controls).

D'aquesta manera, preteníem descartar que un excés d'IgG específiques en el sèrum estigués bloquejant la resposta d'IgM i/o IgA presents en el sèrum en menor concentració. És a dir, volíem descartar la presència de falsos negatius. A més, d'aquesta manera evitavem els falsos positius per la possible presència del

factor reumatoide. Alguns autors l'han descrita en els sèrums de malalts tuberculosos o d'altres malalties cròniques (Hassan, 1992). Aquesta immunoglobulina (IgM o IgA) es podria unir amb la IgG unida específicament als glicolípid, de manera que detectaríem anticossos IgM o IgA falsos positius.

A cap dels tests re-avaluats (DAT/IgM, DAT/IgA, TAT/IgM, TAT/IgA, CF/IgM, CF/IgA, SL-I/IgM, i SL-I/IgA). vam observar una millora en la sensibilitat. És a dir, l'haver precipitat l'IgG no va fer que més Igs dels altres tipus s'unissin específicament. Igualment no vam observar una disminució en la sensibilitat dels sèrums que havien reaccionat abans de la preabsorció de les IgG.

C.3 Resultats amb tests comercialitzats (articles I, II, III, i VI)

Per a avaluar la capacitat serodiagnòstica en el nostre àmbit de diferents tests comercialitzats hem disposat dels kits següents:

- Kits del test MycoDot™ (Dynatech Diagnostics, EUA).
- Kits del test Tuberculosis IgA EIA (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Holanda). Número de lot: 9804.
- Kits dels tests ANDA TB (Anda Biologicals, Estrasburg, França).
 - ANDA TB IgG test. Número de lot: 830
 - ANDA TB IgM test. Número de lot: 572
 - ANDA TB IgA test. Número de lot: 370
- Kits dels tests PATHOZYME (Omega Diagnostics, Alloa, Escòcia, Regne Unit).
 - PATHOZYME-TB Complex *plus*. Número de lot: 12970
 - PATHOZYME-MYCO IgG. Número de lot: 13008
 - PATHOZYME-MYCO IgM. Números de lot: 12960 i 12421
 - PATHOZYME-MYCO IgA. Número de lot: 13335

C.3.1 Antígens lipoglicans (LAM) (article I)

El LAM és un lipoglicà present a la paret de tots els membres del gènere *Mycobacterium* (apartat A.1.2.2.2). Aquest antigen és en el que es basa el test MycoDot, un DOT ràpid de dur a terme (20 minuts) en el que es detecten anticossos IgG enfront del LAM (apartat A.2.5.2.1).

Per a avaluar la capacitat serodiagnòstica d'aquest test, la població avaluada (un total de 191 mostres) fou diferent que per a la resta de kits, ja que s'hi va incloure un percentatge elevat de sèrums d'individus coinfectats pel VIH tant en el grup de malalts tuberculosos com en els controls. Així, s'estudiaren 92 sèrums de malalts amb TB activa dels qui 41 eren coinfectats pel VIH (taula 1 de l'article I), 14 malalts amb MOTT (12 coinfectats pel VIH), 49 individus sans (14 dels quals VIH positius asimptomàtics) i 36 malalts amb altres infeccions pulmonars diferents de la TB.

L'especificitat del test fou del 100%; en canvi, la sensibilitat fou només del 18,5%. Després d'estudiar detalladament la història clínica de cada malalt, vàrem observar que podíem diferenciar clarament entre la resposta d'IgG enfront del LAM d'individus amb una TB nova, dels individus amb una TB de recaiguda. Setanta un dels malalts amb TB no presentaven antecedents d'haver patit abans una TB, aquests els classificàrem com a "nova TB"; en canvi, els altres vint-i-un malalts amb TB havien patit una TB, havien rebut un apropiat tractament antituberculós però curt, i havien desenvolupat de nou una TB activa. Aquests se'ls anomenà "TB reincident". En aquest grup s'incloeren malalts en els que el tractament fou ineficaç degut a resistències o poc acompliment del tractament prescrit. Així, mentre només 7 dels 71 individus amb una nova TB reaccionaven (un 9,8%), ho feia un 47,6% d'individus amb una TB reincident (taula 2 de l'article I). La major presència d'anticossos en els individus amb una TB de recaiguda, enfront dels individus amb una nova TB, ja fou descrita per Kaplan i Chase (1980) utilitzant com a antigen filtrats de cultiu de *M. tuberculosis* H37Rv. Aquesta població, doncs, ha de ser considerada a l'hora d'avaluar un nou test serodiagnòstic perquè pot produir un biaix en els resultats de sensibilitat.

De les dades obtingudes en el grup de malalts amb una TB reincident cal destacar que van reaccionar el 100% del malalts VIH-negatius, mentre que només ho van fer un 26,6% dels coinfectats pel VIH. La majoria d'individus amb coinfecció d'ambdós patògens (un 85%) presentava un recompte de CD4 per sota de 200 cèl·lules per mm³ (taula 1 de l'article I), fet que indica un avançat estadi de la malaltia, i una subsegüent alteració de la resposta immune d'aquests pacients. Aquests resultats obtinguts en el grup de malalts tuberculosos coinfectats pel VIH coincideixen amb els descrits a la bibliografia. Així, s'han observat sensibilitats del 7%, del 11% i del 25% (Somi, 1999; Lawn, 1997; Boggian, 1996, respectivament) en el grup de malalts coinfectats pel VIH.

D'altra banda, dels pacients amb una TB recent només en reaccionà 1 dels 40 amb tinció negativa (2,5%), mentre que van reaccionar 6 dels 29 amb tinció positiva (un 20,6%). Somi *et al.* (1999) també mostraren només un 7% de sensibilitat en el grup de malalts amb TB amb tinció negativa, enfront del 26% en

els malalts tinció positiva. De manera que utilitzant el LAM com a antigen també observem una major presència d'anticossos als individus amb una major càrrega bacilar.

Aquest test, malgrat la seva elevada especificitat, la facilitat de realització i la rapidesa, no presenta un nivell de sensibilitat adient per a ser utilitzat en el nostre entorn.

C.3.2 Antígens semipurificats-sonicats

Per a la resta de tests comercialitzats vam avaluar els sèrums que s'especifiquen a la taula 15. Vàrem avaluar dos tipus de tests diferents que utilitzen com a antígen sonicats semipurificats de *M. bovis* (apartat A.2.5.1), l'ANDA-TB, que utilitza l'antigen A60 i amb el que es poden detectar IgG, IgM, i IgA, i el Tuberculosis IgA test, que utilitza l'antigen Kp-90 i que només detecta IgA.

C.3.2.1 A60

Amb els kits d'ANDA-TB vam obtenir els resultats que s'indiquen a la taula 16, i que es troben gràficament representats a les figures 17, 18 i 19 (IgG, IgM i IgA, respectivament).

Els resultats de sensibilitat obtinguts han oscil·lat entre el 32,4% i el 38,7% en els tres kits utilitzats, que s'incrementaven fins a un 65% en la detecció d'IgA en el grup de malalts amb TB pulmonar amb tinció positiva. Els resultats d'especificitat varen ser elevats en el grup de sans (entre el 86,9% i el 95,8%), però van disminuir considerablement en el grup de malalts amb altres pneumònies, en què es van obtenir valors entre el 47% i el 66,6%.

Aquest test va ser el primer dels kits comercialitzat per al serodiagnòstic de la TB, de manera que són nombrosos els estudis que avaluen la seva utilitat. Els resultats obtinguts són però, discordants (taula 10). Les dades obtingudes en aquest treball en individus sans coincideixen amb la majoria d'estudis (taula 10), malgrat que Qadri *et al.* (1992) trobaren només un 76% d'especificitat en aquest grup. L'especificitat en el grup d'individus amb altres malalties diferents de la TB se situa entre el 68% i el 98% en la bibliografia, mentre que l'obtinguda en aquest estudi fou inferior. No hi ha però, cap estudi en la bibliografia que inclogui una població únicament d'individus amb pneumònies diferents de la TB. D'altra banda, les sensibilitats dels tests van ser superiors en malalts amb tinció positiva que en els malalts amb tinció negativa i en amb TB extrapulmonar, pel tests IgG i IgA. Contràriament amb el test ANDA-TB IgM, es van obtenir sensibilitats més

elevades en malalts amb tinció negativa, tot i així la sensibilitat fou només del 55% (taula 16).

Així doncs, cap del tests ANDA-TB és capaç de discriminar entre la població de control i els malalts amb TB. No han estat útils per a ser utilitzats en el nostre entorn.

TABEL·LA 15. Sèrums de malalts amb TB i controls estudiats en cada test

Mostrars de sèrum	TB IgA AndA TB AndA TB AndA TB		TB AndA TB AndA TB AndA TB		Pachozyme- Pachozyme- Pachozyme- Pachozyme-		EiISA	
	EIA	IgG	IgM	IgA	Myco IgG	Myco IgM	Myco IgA	Glycolipids
Adults TB pulmonar	36	30	34	30	40	40	40	48
VH *	20
Adults TB extrapulmonar	31	12	32	12	12	12	12	10
VH *	3
News TB pulmonar	9	18
Altres zoonotícticas	2	2
Altres malalties respiratòries	40	15	20	15	35	35	35	90
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	9	3	4	4	8	8	8	12
<i>Coccidia sp.</i>	4	3	4	4	6	6	6	6
<i>Legionella pneumophila</i>	9	3	8	3	7	7	7	11
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	9	3	4	4	8	8	8	9
News	4
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	7	3	8	3	6	6	6	8
Peròxides varius	68	27	26	24	45	45	45	84
Adults PPD-negative	46	8	36	8	36	36	36	44
PPD-positive	8	8	8	8	8	8	8	8
News	9	14
Vaccinus	8	8	8	8	8	8	8	9
Adults	3	3	.	.	3	3	3	3
News	6
TOTAL	166	86	92	84	155	155	155	228

Figura 17. Resultats obtinguts amb el test ANDA TB/IgG

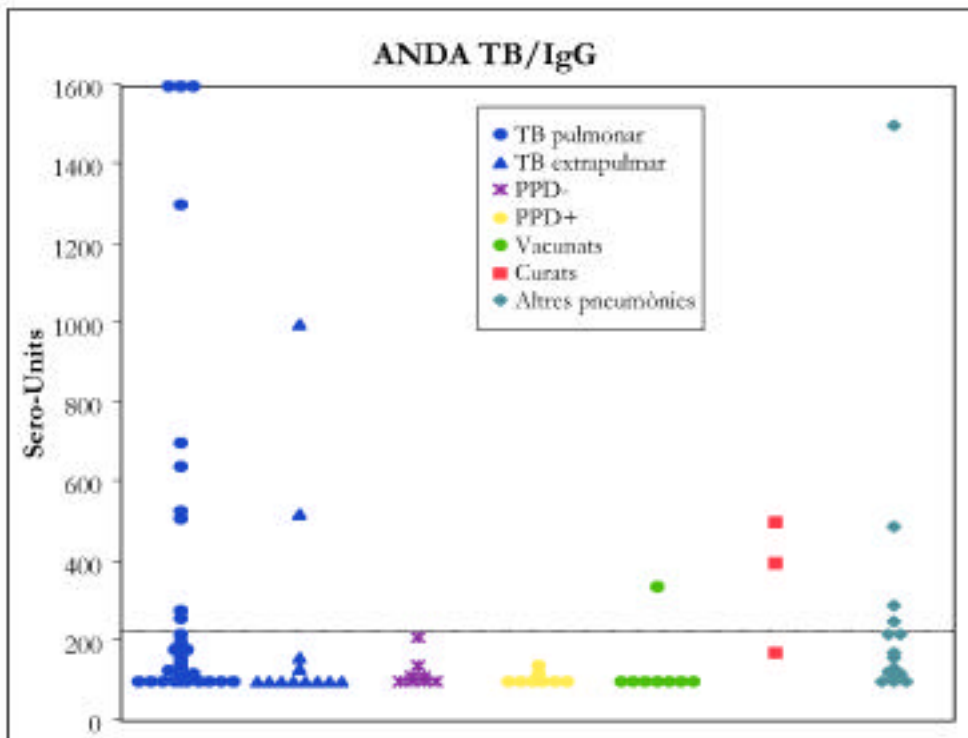


Figura 18. Resultats obtinguts amb el test ANDA-TB/IgM

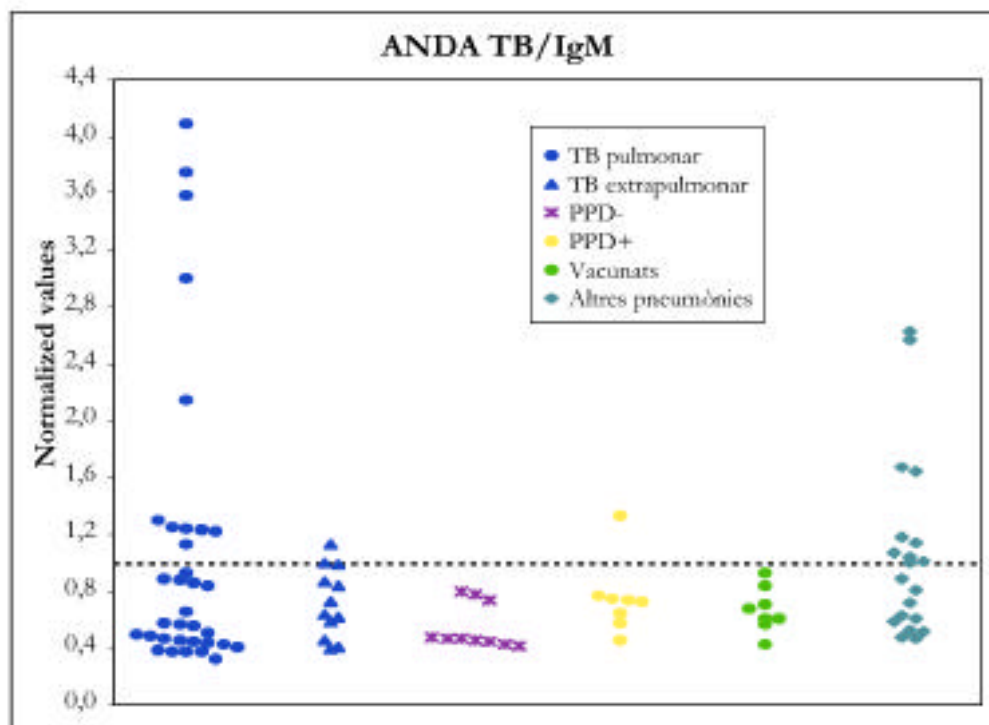
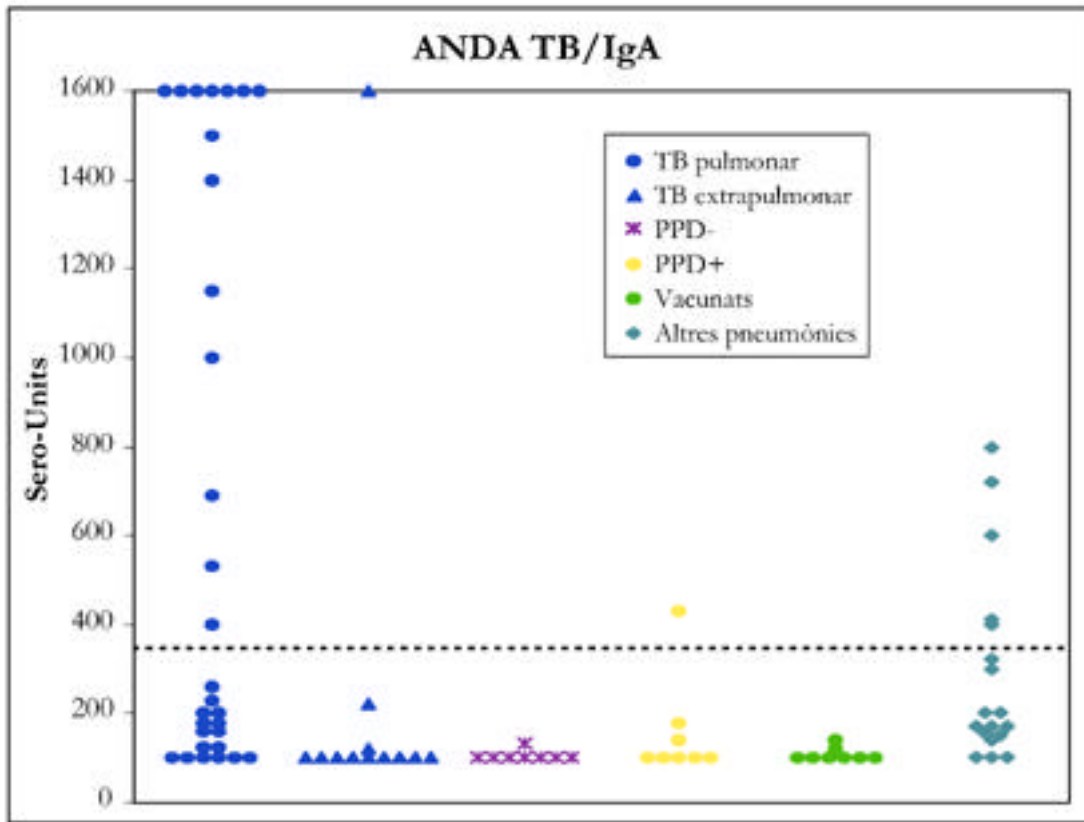


Figura 19. Resultats obtinguts amb el test ANDA-TB/IgA



TAULA 16. Resultats test ANDA TB

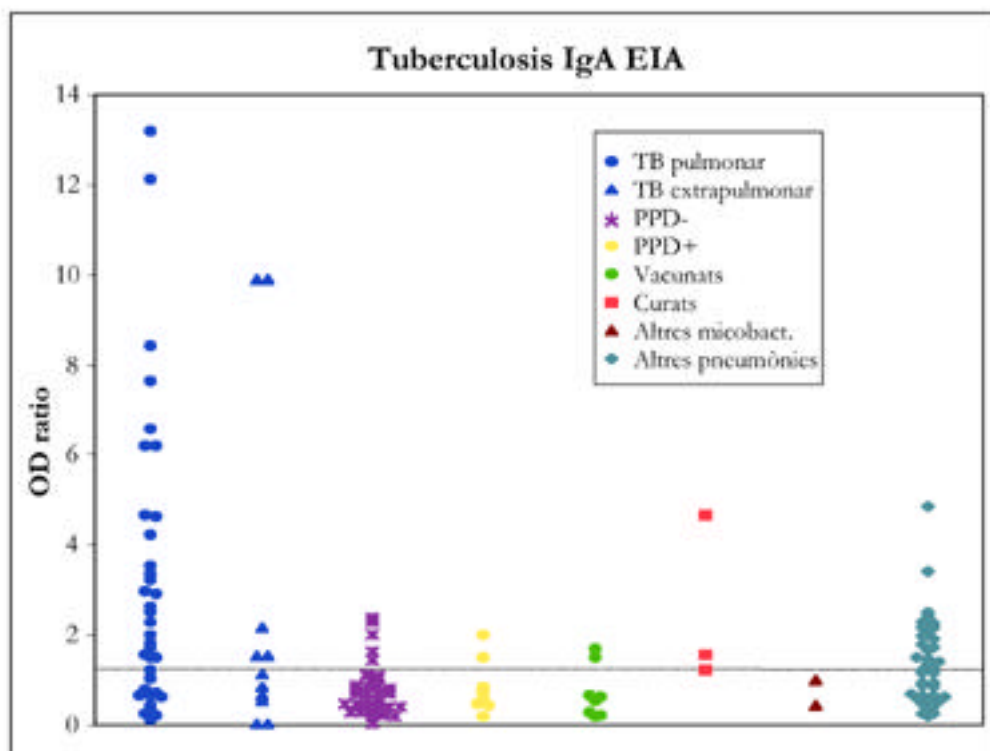
Mostres de sèrum	IgG		IgM		IgA	
	Sensib. (%)	Especif. (%)	Sensib. (%)	Especif. (%)	Sensib. (%)	Especif. (%)
Adults TB pulmonar	47,6		37,9		46,6	
Tinció positiva	64,2		30		65	
Tinció negativa	14,2		55,5		10	
Adults TB extrapulmonar	20		12,5		8,3	
Adults altres pneumònic		55,5		47		66,6
Adults sans		86,9		88,4		95,8
Vacunats		87,5		100		100
PPD-positius		100		87,5		87,5
PPD-negatius		100		100		100
Curats		0		-		-
Total	38,7	78,1	32,4	75,6	35,7	83,3

Les mostres per les que el resultat fou "equivoc" no varen ser considerades a l'anàlisi estadística. Sensib.: sensibilitat; Especif.: especificitat.

C.3.2.2 Kp-90 (articles II i III)

En el test que utilitza l'antigen Kp-90 (Tuberculosis IgA test), la sensibilitat en els grups de malalts adults amb tinció negativa i TB infantil, en què precisament seria més necessària la disponibilitat d'un test serològic és massa baixa, cosa que impedeix recomanar aquest test per al diagnòstic de la malaltia en la nostra població. S'obté un 50% en el grup d'adults amb TB extrapulmonar; un 44,4% en adults amb TB pulmonar amb tinció negativa; i un 12,5% en TB infantil (taula 1 de l'article II). D'altra banda, l'especificitat del test és massa baixa per a un test de diagnòstic. Un 52,7% de pacients amb altres pneumònies són positius pel test (figura 20; taula 1 de l'article II). Probablement, la baixa especificitat de l'antigen utilitzat sigui responsable d'aquests resultats.

Figura 20. Resultats obtinguts amb el test TB IgA test



Observant els assajos previs amb aquest test, veiem que alguns autors (Chiang, 1997; Alifano, 1998) mostren especificitats per sobre del 90%, que discrepen dels nostres resultats. En canvi els resultats obtinguts per Chiang *et al.* (1997) i Pottumarthy *et al.* (2000) sí que coincideixen amb els nostres. Analitzant les poblacions d'individus incloses a cada estudi, veiem una

correlació negativa entre la proporció d'individus inclosos amb altres pneumònies diferents de la TB i l'especificitat del test. Tots els tests avaluats han mostrat especificitats elevades en la població de control sana, les quals han disminuït en considerar la població de control de malalts afectes d'altres pneumònies. Això ens indica la importància de considerar no tan sols individus sans en la població de control (article III), sinó individus amb altres malalties infeccioses susceptibles de ser confosos amb la clínica dels malalts amb TB. Així doncs, tal com argumenten Small i Perkins (2000), cal mantenir un rigor a l'hora d'avaluar qualsevol test serodiagnòstic per a la TB. Cal incloure una població adequada per a poder valorar la capacitat d'aquests possibles nous tests (article III).

C.3.3 Antígens proteics (article VI)

Vam utilitzar quatre tests en format d'ELISA basats en l'antigen proteic 38 kDa. En un dels tests (*Complex plus*) es barreja l'antigen 38 kDa amb l'antigen 16 kDa, mentre que a la resta de kits (MYCO-IgG, IgM i IgA) es barreja amb el LAM. Tots dos antígens proteics que s'utilitzen en aquests kits no són les proteïnes natives sinó que són produïts de manera recombinant.

Els resultats obtinguts amb els sèrums utilitzats (taula 15) s'especifiquen a la taula 17 i a les figures 21, 22, 23, i 24 (*Complex* MYCO-IgG, -IgM, i -IgA, respectivament). En general s'obtenen especificitats d'entre el 78,7 i el 90,3%. En tots els tests, el grup que provoca la major disminució de l'especificitat torna a ser el de sèrums que pertanyen a malalts afectes d'altres pneumònies diferents de la TB. En els tests MYCO-IgG i MYCO-IgA també reaccionen 2 dels 3 individus amb una TB curada (taula 17, i figures 22 i 24). La sensibilitat en tots els tests és molt baixa, amb valors d'entre el 11,5 i el 38,4% (taula 17, i taula 4 de l'article VI). Altres estudis que avaluaren la capacitat serodiagnòstica d'aquests tests també trobaren resultats similars (taula 11). Així, Pottumarthy *et al.* (2000) obtingueren sensibilitats globals entre el 16% i el 55%, amb els quatre tests; i Chiang *et al.* (1997) i Grubek-Jaworska *et al.* (1997), amb el test *Complex* trobaren únicament un 40% de sensibilitat amb el punt de tall recomanat pel fabricant.

Escollint un punt de tall més discriminatiu (taula 2 de l'article VI), per tal d'incrementar l'especificitat dels tests, trobem els resultats que es representen en les taules 4, 5 i 6 de l'article VI. A partir d'aquestes taules podem extreure diferents dades. Per una banda veiem que hi ha una relació relació entre la càrrega bacteriana i la resposta humoral: en el grup de malalts amb tinció

negativa no hi ha cap sèrum que reaccioni enfront dels tests basats en antígens proteics (taula 4 de l'article VI). Pel que fa a les formes extrapulmonars només un sèrum pertanyent a un malalt amb TB disseminada reacciona enfront de 6 tests diferents. De nou, com hem trobat amb la resta de tests avaluats anteriorment, en els malalts amb tinció negativa no es detecten anticossos ni IgG, IgM o IgA, o molt pocs en comparació amb els malalts amb tinció positiva. Aquest fet torna a ser decisiu per a avaluar la utilitat del test en el serodiagnòstic de la TB, ja que en aquesta població és on tindria la màxima utilitat un test serològic.

D'altra banda veiem una heterogeneïtat en la resposta dels malalts tuberculosos (taula 4 de l'article VI). Tal com altres autors han demostrat amb altres antígens proteics (Samanich, 1998, 2000 i 2001; Lyaschenko, 1998), els malalts amb TB presenten anticossos enfront de diferents antígens. Aquesta resposta varia entre els diferents malalts, de manera que un sol antigen no arriba a proporcionar per sí mateix una sensibilitat elevada. Tal com han postulat diferents autors (Gennaro, 2000), la detecció simultània d'anticossos enfront diferents antígens purificats podria ser la solució en el serodiagnòstic de la TB (apartat C.4.2).

TAULA 17. Resultats obtinguts amb els kits Pathozyme

Mostres de sèrum	<i>Complex plus</i>		MYCO IgG		MYCO IgM		MYCO IgA	
	Sensib. (%)	Especif. (%)	Sensib. (%)	Especif. (%)	Sensib. (%)	Especif. (%)	Sensib. (%)	Especif. (%)
Adults TB pulmonar	30		45		15		40	
Tinció positiva	41,3		58,6		13,7		51,7	
Tinció negativa	0		9		18,1		9	
Adults TB extrapulmona	8,3		16,6		0		8,3	
Adults altres pneumònie		68,5		74,2		94,2		71,4
Adults sans		97,7		82,2		87,5		93,3
Vacunats		87,5		87,5		100		100
PPD-positius		100		100		87,5		87,5
PPD-negatius		100		80,7		86,2		100
Curats		100		33,3		66,6		33,3
Total	25	85	38,4	78,7	11,5	90,3	32,6	83,7

Sensib.: sensibilitat; Especif.: especificitat.

El fet d'utilitzar antígens recombinants per al serodiagnòstic de la TB també ha estat molt discutit pels diferents autors (Samanich, 2000). L'antigen 38kDa en la seva forma nativa és una lipoproteïna, que ha mostrat una elevada antigenicitat, en canvi els kits comercials en els que s'utilitza produïda de manera recombinant han mostrat una sensibilitat molt baixa (apartat A.2.5.;

taula 17). Els mateixos resultats s'han observat amb altres proteïnes (Ag85C o MPT32) quan s'han intentat detectar anticossos enfront de les seves respectives formes natives o recombinants (Samanich, 2000).

Així doncs, cap dels tests Pathozyme ha mostrat una eficàcia adient per a ser utilitzat com a eina diagnòstica en el nostre entorn.

Figura 21. Resultats obtinguts amb el test Pathozyme *Complex*

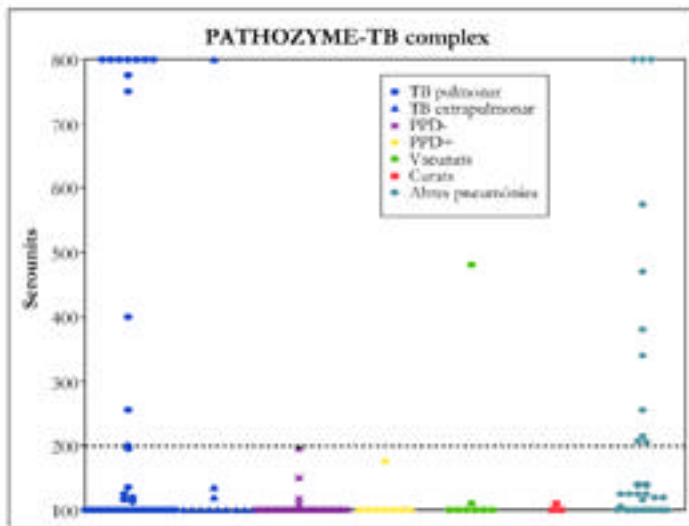


Figura 22. Resultats obtinguts amb el test Pathozyme MYCO-IgG.

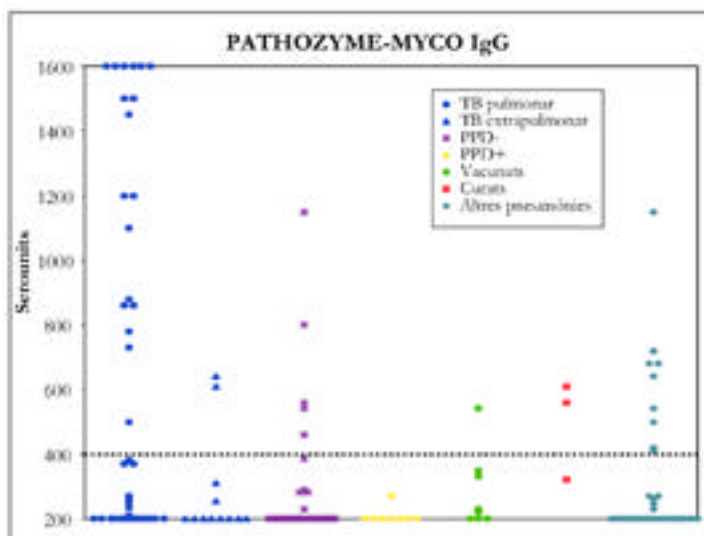


Figura 23. Resultats obtinguts amb el test Pathozyme MYCO-IgM.

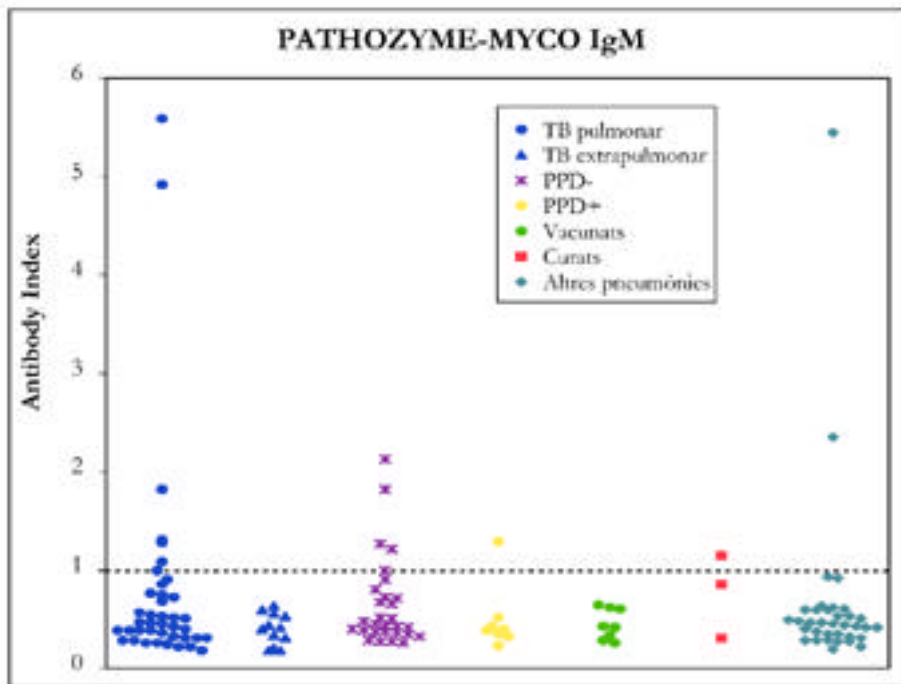
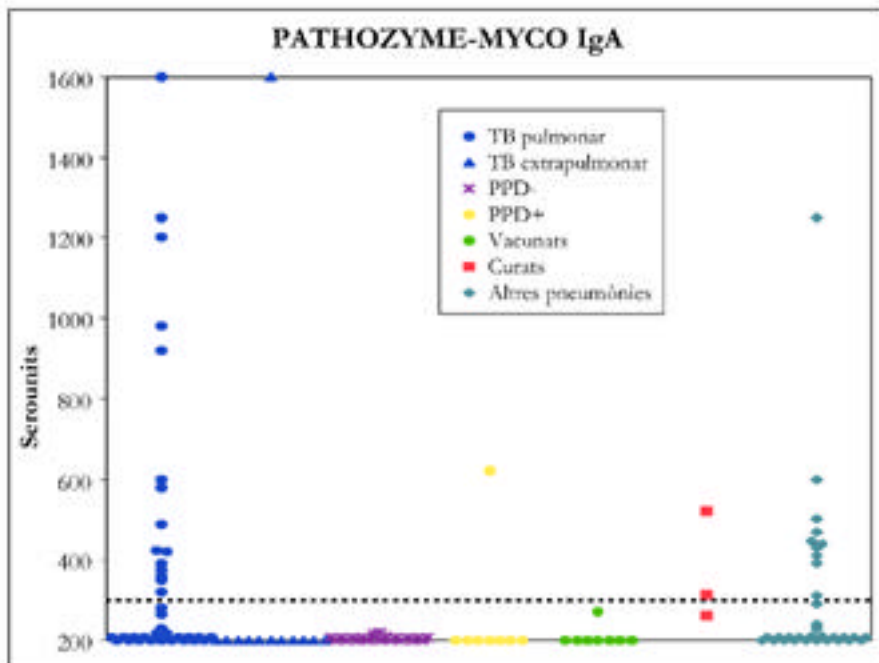


Figura 24. Resultats obtinguts amb el test Pathozyme MYCO-IgA



C.4 Combinació de tests (article VI).

C.4.1 Diferents immunoglobulines

Després d'avaluar independentment cadascun dels tests serològics, ens vam plantejar la possibilitat de combinar tests, tant entre les diferents immunoglobulines que utilitzen el mateix antigen, com els tests que utilitzen diferents antigens. Combinant la detecció de diferents immunoglobulines, s'ha descrit un increment de sensibilitat alhora que es manté l'especificitat del test (Bothanley, 1995; Gupta, 1995; Wilkins, 1998). De manera que amb els tests en què hi havia la possibilitat de detectar diferents immunoglobulines, vam analitzar les possibles combinacions, com es mostra a taules 18, 19 i 20 (kits ANDA-TB, kits Pathozyme, i ELISA amb glicolípid, respectivament).

TAULA 18. Combinacions de resultats amb els tests ANDA TB

Tipus de combinació	Sensibilitat (%)	Especificitat (%)
IgM, IgA, i IgG	19	92,3
IgA i IgG	30,9	89,7
IgM i IgA	19	89,7
IgM i IgG	28,5	84,2
IgA o IgG	45,2	76,9
IgM o IgA	52,3	74,3
IgM o IgG	52,3	71
IgM o IgA o IgG	61,9	66,6

En aquestes taules s'indica com "i", la presència de positius per als dos tests, i com a "o" la presència d'un resultat positiu en un test o en l'altre.

Combinant els resultats obtinguts d'utilitzar els diferents kits ANDA-TB, s'obté com a màxim una sensibilitat del 61,9%, però amb una especificitat de només el 66,6% (taula 18). Per una altra banda, es pot arribar a una especificitat del 92,3%, però amb una sensibilitat de només el 19%.

Tal com es pot observar a la taula 19, utilitzant la combinació de resultats dels diferents kits Pathozyme, s'obtingueren valors d'especificitat superiors al 90%, però amb sensibilitats com a màxim del 25%. Escollint una combinació que proporcionés la sensibilitat més alta, només s'aconseguí un 51,9%, i amb una especificitat corresponent de només el 62,5%.

TAULA 19. Combinacions de resultats amb els tests Pathozyme

Tipus de combinació	Sensibilitat (%)	Especificitat (%)
IgG C, IgG, IgM i IgA	5,7	98,7
IgG C, IgG, i IgM	5,7	98,7
IgG, IgM, i IgA	5,7	98,7
IgG C i IgM	5,7	98,7
IgG C, IgM, i IgA	7,6	97,5
IgM i IgA	7,6	96,2
IgG i IgM	7,6	96,2
IgG C i IgG	21,1	92,5
IgG C, IgG, i IgA	13,4	92,5
IgG i IgA	25	91,2
IgG C i IgA	15,3	88,7
IgG C o IgA	44,2	80
IgM o IgA	36,5	77,5
IgG C o IgM	30,7	76,2
IgG o IgM o IgA	46,1	73,7
IgG o IgM	42,3	72,5
IgG o IgA	46,1	71,2
IgG C o IgG	42,3	71,2
IgG C o IgM o IgA	50	68,7
IgG C o IgG o IgA	48	67,5
IgG C o IgG o IgM	46,1	65
IgG C o IgG o IgM o IgA	51,9	62,5

IgG C: Pathozyme complex; IgG: Pathozyme MYCO-IgG;

IgM: Pathozyme MYCO-IgM; IgA: Pathozyme MYCO-IgA.

Finalment, pel que fa als antígens glicolípidics, a la taula 20 podem observar els resultats obtinguts combinant simultàniament les respostes per una o més Igs enfront de cada antígen. La millor relació sensibilitat/especificitat s'obté amb SL-I/IgG i IgA, que mostra una sensibilitat del 58% i una especificitat del 90% (taula 20). Si s'incrementa el punt de tall per a ambdós tests s'arriba a una sensibilitat del 67,5 amb una especificitat corresponent del 93,7% (article V), cosa que és el millor resultat obtingut d'entre els vint-i-un tests avaluats.

Així doncs en general no s'observa una millora significativa combinant els resultats obtinguts amb les diferents immunoglobulines respecte dels tests individuals.

TAULA 20. Combinació de resultats entre cada antígen i Ig.

Tipus de combinació	Sensibilitat (%)	Especificitat (%)
DAT / IgG i IgM	9,4	100
SL-I / IgG i IgM	9,4	100
DAT / IgM i IgA	8,1	100
DAT / IgG, IgM, i IgA	6,7	100
SL-I / IgM i IgA	6,7	100
SL-I / IgG, IgM, i IgA	5,4	100
CF / IgM i IgA	1,3	100
CF / IgG, IgM, i IgA	0	100
CF / IgG i IgM	1,3	99,1
CF / IgG i IgA	25,6	98,2
TAT / IgM i IgA	20,2	98,2
TAT / IgG, IgM, i IgA	17,5	98,2
TAT / IgG i IgM	20,2	97,3
CF / IgM o IgA	35,1	94,6
SL-I / IgG i IgA	58,1	90,1
CF / IgG o IgM	55,4	87,5
CF / IgG o IgA	62,1	86,6
CF / IgG o IgM o IgA	62,1	85,7
DAT / IgG i IgA	44,5	85,7
SL-I / IgM o IgA	70,2	84,8
TAT / IgG i IgA	56,7	81,2
DAT / IgG o IgM	55,4	81,2
DAT / IgM o IgA	68,9	75,8
SL-I / IgG o IgA	89,1	75
SL-I / IgG o IgM	82,4	75
TAT / IgM o IgA	78,3	74,1
TAT / IgG o IgM	72,9	74,1
DAT / IgG o IgA	75,6	73,2
SL-I / IgG o IgM o IgA	89,1	72,3
DAT / IgG o IgM o IgA	75,6	72,3
TAT / IgG o IgA	86,4	69,6
TAT / IgG o IgM o IgA	87,8	68,7

C.4.2 Diferents antígens

Al llarg de tots els assajos que tant nosaltres com la resta d'autors han realitzat, ha quedat palès que no s'ha pogut trobar un únic antígen que proporcionés una sensibilitat de més del 80% en el diagnòstic de malalts tuberculosos (Gennaro, 2000). Els estudis realitzats en els últims anys amb antígens proteics en la seva forma nativa o recombinant han demostrat l'heterogeneïtat de la resposta dels malalts amb TB (Samanich, 2000, 2001; Moran, 2001; Lyaschenko, 1998). El fet que cada individu produeixi anticossos enfront diferents antígens s'ha atribuït a l'estat immunològic de cada individu, als diferents estadis de la malaltia, o a la diferent expressió gènica de les diferents soques de *M. tuberculosis*.

De manera que, darrerament, s'ha postulat que el desenvolupament d'un test serodiagnòstic per a la malaltia tuberculosa consistiria en la detecció simultània d'anticossos enfront diferents antígens purificats. Aquests antígens haurien de ser específics del *M. tuberculosis*. La utilització de diferents antígens permetria abarcar la detecció d'un nombre més ampli de malalts tuberculosos, que no enfront d'un únic antígen.

En aquest sentit prèviament només s'havia avaluat la combinació d'antígens utilitzant proteïnes sense que encara s'hagi trobat una combinació que proporcioni una elevada sensibilitat (Dillon, 2000; Hendrickson, 2000; Lodes, 2001). Així doncs, ens vam proposar analitzar la resposta enfront tant dels nostres antígens glicolipídics com els kits comercialitzats que utilitzaven antígens purs.

Inicialment vam escollir un punt de tall tant en els kits comercialitzats com en els test basats en antígens glicolipídics, que ens permetés obtenir resultats elevats d'especificitat malgrat el detriment en la sensibilitat de cada test (taules 1 i 2 de l'article VI). El punt de tall escollit suposava una especificitat com a mínim del 92.7% per cada test. Així doncs, vam analitzar la resposta un per un dels 135 sèrums inclosos en l'estudi.

Els resultats obtinguts es mostren a les taules 4, 5, i 6 de l'article VI. Analitzant les dades obtingudes podem extreure que la combinació del test SL-I/IgA, amb el test Pathozyme-MYCO detectant IgAs i IgGs, respectivament, millora les sensibilitats de cada test per separat, suposant un increment del 12 i 32% respectivament. Amb aquests tests s'obté una sensibilitat global del 62% amb una especificitat del 96,3%.

Aquest resultat ens indica la possible utilitat dels antígens glicolipídics en el disseny de nous tests per al serodiagnòstic de la TB, on es combinin diferents antígens tan de naturalesa proteica com glicolipídica purificats i específics de *M. tuberculosis*.

Perspectives

Fins ara, cap dels immunoassaigs desenvolupats constitueix una alternativa clara als mètodes convencionals; en general, encara presenten tota una sèrie de mancances:

- cap avantatge clar enfront del cultiu,
- sensibilitat baixa en individus amb tinció negativa, que haurien d'ésser els primers beneficiaris dels nous tests,
- poca capacitat per a distingir entre malaltia per *M. tuberculosis* i altres micobacteris, o malalts amb altres pneumònies diferents de la TB.

Els nous desenvolupaments en la recerca han d'incloure:

- la disponibilitat d'antígens molt purificats o recombinants?,
- una millora en la comprensió de la naturalesa heterotípica de la resposta humoral en la TB,
- el desenvolupament de tests multiantígens que mantinguin una especificitat elevada,
- la identificació de noves proteïnes de *M. tuberculosis* i la seva caracterització amb l'ajut de la seqüència del genoma (Cole, 1998),
- la caracterització d'antígens no proteics,
- el desenvolupament de formats de tests simples i millorats, inclosos els que accepten sang total o altres mostres recollides no invasivament.

Hi ha raons per a ser optimista sobre el futur del diagnòstic de la TB, Avenços tècnics en la genètica, la microelectrònica, la ciència dels materials, la biologia cel·lular, els fags i les nanotecnologies han iniciat una revolució en el diagnòstic de les malalties infeccioses (Perkins, 2000). Des de 1997, l'OMS ha creat la WHO Tuberculosis Diagnostic Initiative (WHO/TDR) <www.who.int/tdr>, en què 50 institucions acadèmiques i indústries s'han involucrat en el desenvolupament de noves eines diagnòstiques per a la TB. Això inclou l'amplificació d'àcids nucleics, la replicació fàgica, la detecció d'anticossos, el cultiu líquid, el reconeixement d'immunitat cel·lular, la captura d'antigen i la detecció física o química. Un dels primers objectius ha estat l'organització d'un banc d'especimens, que aquest darrer any ha recollit més de 12.000 alíquotes d'esput, sèrum, orina i saliva d'individus amb TB amb un historial clínic controlat i individus de control de sis regions geogràfiques diferents. Aquesta mobilització mostra clarament la necessitat de cercar noves eines i l'interès general per a solucionar aquest problema

<www.stoptb.org/Working_Groups/TB.Diagnostics.html>.