



DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS POR SEROLOGIA: SITUACION ACTUAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS

V. Ausina y M. Luquin

Departamento de Microbiología. Hospital de la Sta. Creu i Sant Pau.
Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona

Nuevas técnicas diagnósticas para una vieja enfermedad

A diferencia de lo conseguido en quimioterapia, en el diagnóstico de la tuberculosis no se han producido cambios de relativa importancia hasta la última década. Las técnicas de diagnóstico directo de uso tradicional en micobacteriología han tenido, desde siempre, importantes limitaciones. Por un lado, la escasa sensibilidad de las técnicas de examen microscópico (Ziehl-Neelsen o su variante de tinción por fluorocromos) y por otro, el obligado tiempo de espera (a veces varios meses) que exige el cultivo en medios convencionales (Löwenstein-Jensen o semisintéticos con agar tipo 7H10 de Middlebrook).

El retraso en el desarrollo de técnicas más rápidas y sensibles que las tradicionales se ha debido probablemente, no solo a razones de tipo técnico más o menos insuperables hasta fechas recientes, sino también a que la tuberculosis, como en otras enfermedades infecciosas de marcado carácter social, las prioridades no han sido las mismas en los países técnicamente avanzados que en los países en vías de desarrollo¹. En los primeros, al ser la tuberculosis una enfermedad en franco declive no ha existido una presión excesiva para desarrollar técnicas de diagnóstico más eficaces que las tradicionales; se ha considerado que el número de enfermos que podrían beneficiarse de ellas sería relativamente escaso. En los segundos, aparte de carecer de la tecnología adecuada para el desarrollo de estas técnicas alternativas, la falta de recursos económicos ha determinado el establecimiento de otras prioridades, fundamentalmente la búsqueda y detección de nuevos casos mediante técnicas de examen microscópico y el establecimiento de tratamientos controlados bajo la supervisión de diferentes organismos internacionales^{2,3}.

A pesar de esto, el impacto actual de las nuevas tecnologías, la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), en el cual la tuberculosis es una de las infecciones asociadas más importantes⁴ y otros factores, han determinado que en los últimos años se haya hecho un considerable esfuerzo de inves-

tigación en la búsqueda de técnicas alternativas de diagnóstico microbiológico⁵. En este sentido, la introducción en la rutina diagnóstica de los sistemas radiométricos ha supuesto un avance importante⁶; con ellos se han venido a satisfacer algunas de las tradicionales demandas de la clínica. En estos sistemas se utiliza un medio de cultivo líquido semisintético que contiene sustratos (ácidos grasos) marcados con C^{14} y el crecimiento bacteriano se detecta midiendo automáticamente el $^{14}CO_2$ producido por el catabolismo de los mismos. La experiencia acumulada, durante los diez años en los que estos han estado introducidos en la rutina diagnóstica de algunos laboratorios clínicos, nos permite hoy poder precisar con bastante exactitud que su principal ventaja reside en la mayor sensibilidad y rapidez para detectar el crecimiento micobacteriano en relación a los medios de cultivo tradicionales⁷.

Otra ventaja de los mismos, a nuestro juicio muy importante, es la posibilidad de realizar estudios de sensibilidad *in vitro* a los fármacos antituberculosos cuyos resultados pueden obtenerse en tiempos medios de 3-6 días y tienen una excelente correlación con los obtenidos por métodos estándar⁸. Un avance reciente del sistema ha sido la incorporación de un medio líquido específicamente diseñado para el aislamiento de micobacterias de la sangre⁹.

En nuestra experiencia, la sensibilidad de esta técnica de hemocultivo es similar a la obtenida con la de lisis-centrifugación, pero se evitan con ella muchas manipulaciones peligrosas e innecesarias por parte del personal técnico.

Junto a los sistemas radiométricos, las dos líneas de investigación con las que se han obtenido resultados más esperanzadores de cara a un próximo futuro son: 1) la detección directa de marcadores en nuestras clínicas y, 2) la detección de una respuesta inmune específica mediante serología. Ambas líneas de investigación se han ido desarrollando de forma paralela aunque, como puede apreciarse en la tabla I y tendremos ocasión de precisar más adelante, la serología cubre objetivos algo distintos a los de las otras técnicas.



TABLA I
Métodos rápidos de diagnóstico de la tuberculosis. Importancia e indicaciones actuales o previsibles*.

Métodos	Técnicas	Indicaciones e importancia relativa		
		Diag. precoz reactivación	Diagnóstico enfermedad	Tratamiento y control
Cultivo	Radiométricas	NA	+++	++
Detección directa de marcadores en muestras clínicas	Adenosina desaminasa (ADA)	NA	++**	NA
	Sondas genéticas	NA	+++	NA
	Inmunológicas (Detección de antígenos)	NA	++	NA
	Cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM)	NA	++	NA
Serología	Inmunológicas (Detección de anticuerpos)	+++	++	+

* Modificado de David H.L. Symposium on mycobacteria and methods for rapid diagnosis. Niza, Abril 1989.

** En determinadas formas de enfermedad tuberculosa (Ver texto).

NA: No aplicable.

Dentro de los métodos destinados a la detección de marcadores en nuestras clínicas, se han desarrollado dos tipos diferentes de técnicas de diagnóstico directo. En uno de ellos se utilizan técnicas sencillas que permiten establecer un diagnóstico presuntivo de determinadas formas de tuberculosis mediante determinación cuantitativa de adenosina desaminasa (ADA), una enzima derivada del metabolismo de las purinas, que está aumentada en los líquidos con abundantes linfocitos de la pleuritis, pericarditis, peritonitis y meningitis tuberculosas^{10,11}. En el otro, se trata de obtener un diagnóstico rápido y definitivo de enfermedad tuberculosa detectando antígenos específicos de *M. tuberculosis* mediante técnicas inmunológicas¹², lípidos parietales género o especie-específicos mediante cromatografía de gases asociada a espectrometría de masas (CG-EM)^{13,14} o fragmentos específicos de cDNA por hibridación (sondas genéticas)¹⁵. Todas estas técnicas constituyen campos de gran actividad investigadora en la actualidad y, aunque no existe una introducción decisiva de ninguna de ellas en la rutina diagnóstica, poseen teóricamente un gran potencial y, a corto o medio plazo, podrían ser de gran ayuda en el diagnóstico rápido de la tuberculosis.

Desde el descubrimiento del bacilo de la tuberculosis, hace ahora más de un siglo, han habido centenares de intentos de desarrollar pruebas diagnósticas basadas en la detección de respuestas inmunes (anticuerpos) específicas. En la mayoría de casos, técnicas que parecían prometedoras en estudios preliminares se mostraron decepcionantes en la práctica clínica¹⁶. Sin embargo, en los últimos años se ha progresado extraordinariamente en el conocimiento de la compleja estructura antigénica de *M. tuberculosis* y en la preparación de antígenos purificados específicos^{17,18}. Con la utilización de estos antígenos en técnicas de enzimoanálisis (ELISA) se ha conseguido discriminar mejor entre pacientes y controles sanos tuberculín positivos, constituyendo esta la línea que parece más esperanzadora dentro de la investigación de una prueba inmunológica útil para el diagnóstico de la tuberculosis activa¹⁶.

Condiciones y exigencias de la serología en el diagnóstico de la tuberculosis^{18,19}

El objetivo principal de la serología en la tuberculosis es diagnosticar la enfermedad durante el período de tiempo que va desde el inicio del proceso de reactivación hasta la aparición de los síntomas clínicos. Así, si dispusiéramos de una prueba serológica lo suficientemente sensible y específica para ser aplicada en el diagnóstico de rutina de la tuberculosis, nos ofrecería las siguientes ventajas: por un lado, sería la única prueba diagnóstica entre las existentes con la que se podría realizar una búsqueda indiscriminada de casos, ya que su positividad sería independiente de la presencia o no de bacilos en las muestras y permitiría también un diagnóstico de la tuberculosis pulmonar en sus fases iniciales (tabla I). Por otro lado, podría ser útil en el diagnóstico de las formas de tuberculosis con examen microscópico negativo, principalmente en las formas de tuberculosis extrapulmonar. Finalmente, podría utilizarse como técnica de diagnóstico rápido en todas las formas de enfermedad tuberculosa. No cabe duda que una prueba diagnóstica de tal naturaleza sería de extraordinario interés clínico y epidemiológico. No obstante, dado que un resultado positivo de la misma condicionaría un tratamiento específico de varios meses de duración, el valor predictivo positivo (VPP) de esta debería ser muy alto y esto exigiría una elevada especificidad para cualquier prueba positiva¹².

Cuando se evalúa una prueba serológica para el diagnóstico de una enfermedad como la tuberculosis, los valores predictivos de la misma tienen gran importancia y estos varían con la prevalencia de la enfermedad en la población estudiada. Para determinada sensibilidad y especificidad de la prueba, una prevalencia baja determina pocos resultados falsos negativos y así se obtienen buenos valores predictivos negativos (VPN). De igual forma, una prevalencia elevada determina más resultados positivos verdaderos y por tanto, un mejor VPP. Cuando la prevalencia de la enfermedad es baja, el VPP está muy influenciado por



la especificidad de la prueba. Si la especificidad es muy alta, se reduce el número de falsos positivos y mejora el VPP¹⁸. Dicho en otras palabras, incluso con especificidades "aceptables", en poblaciones con baja prevalencia el número de reacciones falsamente positivas puede superar incluso las verdaderas reacciones positivas.

Esto es particularmente importante en aquellas pruebas en las que como el ELISA no existe una clara separación entre resultados positivos y negativos, sino que estos se dan dentro de una amplia gama de valores numéricos. Por el contrario, en esta misma situación el VPN no está muy influenciado por la especificidad de la prueba¹⁸. Esto es así, porque los resultados falsos negativos serán solo una fracción muy pequeña del total de los negativos obtenidos.

Las consideraciones y valoraciones que hacemos a continuación referidas a progresos y expectativas del diagnóstico serológico de la tuberculosis las haremos tomando en consideración todas estas premisas.

Importancia de la técnica y de los antígenos utilizados

En el diagnóstico serológico de una enfermedad infecciosa, y esto es también válido para la tuberculosis, la técnica utilizada tiene gran influencia en la sensibilidad de la prueba y el tipo de antígeno en la especificidad.

El primer estudio sobre diagnóstico serológico de la tuberculosis fue publicado por Arloing y Courmant en 1898, solo 16 años después del descubrimiento del bacilo de la tuberculosis por Robert Koch. En este estudio inicial y mediante técnica de aglutinación, un 57 % de los pacientes con tuberculosis pulmonar y un 11 % de los controles sanos o con otras enfermedades dieron resultados positivos. Desde entonces, han sido evaluadas numerosas técnicas serológicas (hemaglutinación, fijación de complemento, inmunodifusión, inmunofluorescencia, radioinmunoanálisis, etc.). Por diversas razones, no siempre exclusivamente relacionadas con la técnica sino también con el tipo de antígenos utilizados, los índices de falsa positividad o negatividad eran excesivos para que estas técnicas pudieran utilizarse en el diagnóstico de rutina. En 1976, Nassau et al²⁰ utilizaron una prueba de enzimoimmunoanálisis (ELISA) para detectar anticuerpos específicos frente a un antígeno crudo de *M. tuberculosis* y posteriormente Zeiss et al²¹, Kalish et al²² y otros^{23,24}, continuaron los estudios utilizando como antígeno PPD. Desde entonces, esta técnica ha sido utilizada por numerosos investigadores que, empleando una gran variedad de antígenos, han obtenido resultados de considerable interés. Daniel y Debanne¹⁸ han revisado y analizado recientemente de forma crítica los principales trabajos publicados que han utilizado esta técnica. Por las razones que a continuación señalamos, el ELISA parece ser la técnica serológica que ofrece mejores perspectivas. Se trata de una técnica rápida, sencilla, automatizable y que proporciona resultados reproducibles. Con ella se trabaja con sen-

sibilidades óptimas, similares a las del RIA, sin la hipoteca del costoso instrumental e instalación que exige esta última. No obstante, a diferencia de otras pruebas serológicas cuyos resultados son positivos o negativos a determinadas diluciones de suero y su interpretación no plantea dificultades, en las pruebas de ELISA en las que los resultados vienen dados por un valor numérico, es necesario elegir un punto límite para separar positivos de negativos y esto plantea, con frecuencia, bastantes dificultades¹⁸.

Utilizando esta técnica y trabajando con antígenos proteicos para la determinación de anticuerpos de la clase IgG, se obtienen sensibilidades entre 0,5-0,6 en áreas con baja prevalencia de tuberculosis y de 0,7-0,8 en países de alta prevalencia^{12,25}. Estas diferencias de sensibilidad están relacionadas probablemente con la extensión y cronicidad de la enfermedad en el momento de realizar el diagnóstico²⁶. Diversos autores han coincidido en señalar que la detección de anticuerpos de la clase IgM e IgA es mucho menos útil, fundamentalmente por razones de baja sensibilidad²⁷.

Por desgracia, la respuesta inmune humoral durante las infecciones bacterianas determina un aumento del título de anticuerpos frente a muy diversos determinantes antigénicos del organismo responsable. Los anticuerpos variarán en cuanto a especificidad desde los que son específicos de especie bacteriana hasta los que son compartidos con bacterias totalmente distintas. Además, la respuesta de cada individuo frente a los diferentes componentes antigénicos del microorganismo puede ser variable debido a factores tales como el control genético, la cantidad del antígeno y, fundamentalmente las infecciones previas por microorganismos del medio ambiente.

Como ya hemos señalado en otro lugar, el diagnóstico serológico de las enfermedades micobacterianas, y de la tuberculosis de forma particular, la especificidad es de extraordinaria importancia. La estructura antigénica de *M. tuberculosis* es enormemente compleja^{17,27} y la mayoría de reacciones inespecíficas a los antígenos micobacterianos se debe a que estos microorganismos contienen antígenos comunes a otras especies y géneros bacterianos. El hombre y los animales tienen contactos repetidos con micobacterias ambientales, y es más que probable que de estos resulten respuestas inmunológicas a diferentes determinantes antigénicos y niveles bajos de anticuerpos frente a los mismos. Si se quiere desarrollar una prueba serológica que sea realmente útil en el diagnóstico de rutina de la tuberculosis, en el sentido que se ha señalado anteriormente, debe conseguirse que las preparaciones antigénicas utilizadas sean especie-específicas y lo más purificadas posible; es decir, que estas no contengan o no permitan el reconocimiento de epitopos compartidos por microorganismos ambientales.

En serología de tuberculosis se han utilizado múltiples tipos de preparaciones antigénicas, desde extractos celulares complejos hasta reactivos altamente purificados. Los antígenos que mejor se conocen y con los que más se ha trabajado en los últimos años son los de naturaleza proteica. Una observación interesan-



te es que la especificidad de los mismos parece estar asociada a proteínas de bajo peso molecular, estables al calor y de elevada movilidad electroforética. Estas pequeñas proteínas están presentes en los preparados de PPD y como han sugerido Moulton et al²⁸ y Nagai et al²⁹ pueden ser responsables de la especificidad en las pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada. Varios autores han logrado purificar proteínas específicas de *M. tuberculosis*, la mayoría de ellas con actividad tuberculínica^{30,34}. Recientemente se ha podido determinar la secuencia de aminoácidos de alguna de ellas^{35,36}, e incluso se han obtenido de forma sintética³⁷. La mayoría de estas investigaciones han estado orientadas a la obtención de proteínas purificadas para pruebas cutáneas que pudieran reemplazar al PPD y la utilidad potencial de muchos de estos antígenos en pruebas serológicas no ha sido estudiada o esta no ha sido tan satisfactoria como se esperaba¹⁹.

Los antígenos proteicos más evaluados como reactivos en pruebas serológicas son los antígenos 5 y 6, purificados por cromatografía de afinidad en un proceso extraordinariamente laborioso por el grupo de Daniel et al³⁸. La utilización de estos antígenos en técnicas de ELISA ha proporcionado resultados francamente interesantes en formas de tuberculosis extrapulmonar^{39,40} y en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar en áreas de alta prevalencia de enfermedad tuberculosa^{25,41,42}. Así, en Argentina, Ballestrino et al²⁵ utilizando antígeno 5 consiguieron sensibilidades de 0,64 y especificidades de 1,0, trabajando con diluciones de suero de 1:80. Sin embargo, no se han logrado resultados óptimos que permitan utilizarlos, como sería deseable, en zonas de baja prevalencia de tuberculosis en pruebas serológicas de screening o en pacientes con lesiones pulmonares mínimas^{18,42}. Este hecho, unido a la laboriosidad de su obtención, ha sido absolutamente determinante de que no se decidiera su obtención a gran escala con fines de comercialización. En poblaciones con prevalencia similar, utilizando la misma técnica y PPD como antígeno, la sensibilidad obtenida oscila alrededor de 0,72 y la especificidad no es nunca superior a 0,84 en grandes series^{12,18,19}. Esta baja sensibilidad del PPD suele proporcionar, en determinados grupos de población, valores predictivos muy desfavorables.

Los antígenos de naturaleza polisacárida y lipídica de la pared celular de *M. tuberculosis* también han sido muy investigados en los últimos años. Los primeros (arabinogalactanos y arabinomananos) están presentes también en las tuberculinas OT y PPD y aunque son capaces de inducir una respuesta inmune humoral, su estructura química es común a muchos actinomicetos aerobios, particularmente las cadenas laterales de arabinosa del arabinomanano que son los mayores determinantes antigénicos. Esto comporta problemas de especificidad y limita su utilidad en el diagnóstico serológico^{12,18}.

Reggiardo et al^{43,45} utilizando tres antígenos glicolipídicos diferentes, en técnicas serológicas de hemaglutinación pasiva y ELISA, lograron discriminar aceptablemente los individuos infectados de los grupos de

control. Pero ha sido realmente durante los últimos cinco años cuando se ha trabajado activamente en la caracterización y purificación de antígenos lipídicos especie-específicos en *M. leprae*, *M. Kansasi* y *M. tuberculosis*⁴⁶⁻⁴⁹. Estos antígenos están situados en la superficie celular y son muy inmunógenos⁴⁷; estructuralmente poseen una parte lipídica que está unida por un residuo fenólico a un trisacárido⁴⁶. De la cepa Canetti de *M. tuberculosis* se han extraído seis fracciones glicolipídicas diferentes; dos de estas son glicolipídicos fenólicos⁵⁰. El componente mayoritario es un triglicósil-fenotiocerol-dimicocerosato (PGL-Tb1) y el segundo un monoglicósil-diacil-fenotiocerol, idéntico al micósido B de *M. bovis*. Al igual que ha sucedido en el caso de la lepra^{46,47}, trabajando con PGL-Tb1 en técnica de ELISA para detección de anticuerpos de la clase IgG, se han obtenido resultados preliminares de extraordinaria sensibilidad y especificidad^{50,52}. Es necesario aún confirmar estos resultados en series con grupos de control amplios y bien seleccionados, así como también en poblaciones con alta y baja prevalencia de tuberculosis. Igualmente es necesario evaluar comparativamente otros antígenos lipídicos, tales como los sulfolípidos I y IV, que han sido purificados y han empezado a utilizarse recientemente como antígenos en el diagnóstico de esta enfermedad.

Evaluación crítica de las pruebas comercializadas

Recientemente se ha comercializado un ELISA (Anda-tb, Anda Biologicals, Strasbourg, Francia) para detectar en suero anticuerpos antimicobacterias de la clase IgG⁵³. En esta prueba se utiliza el denominado antígeno A60, que representa el componente termoes estable más importante de la tuberculina vieja de Koch (OT) y del derivado proteico purificado (PPD). Está localizado en el citoplasma y la membrana celular y es de naturaleza lipopolisacárida y lipoprotéica⁵³. Ha sido purificado por cromatografía de afinidad y es fácilmente extraíble a gran escala, lo que sin duda ha facilitado su explotación a nivel industrial. Se trata de un antígeno común a diferentes especies del género *Mycobacterium*. El análisis crítico de los primeros resultados obtenidos^{54,55} con la utilización de este antígeno no pueden considerarse excesivamente optimistas. Incluso con niveles de especificidad algo superiores a los que suelen obtenerse con la utilización de antígenos crudos y PPD, los niveles de sensibilidad y valores predictivos de la prueba no permiten recomendarla con niveles de seguridad diagnóstica aceptables en las formas de tuberculosis más difíciles de diagnosticar por otros métodos, ni tampoco como técnica de screening en la población general, especialmente en áreas de baja prevalencia. Limitaciones estas que son también comunes, como ya ha sido señalado, a otros antígenos de naturaleza protéica.

Consideraciones finales. Resumen y conclusiones

Diversos factores han contribuido a que en los últimos años se haya avanzado extraordinariamente en el diagnóstico serológico de la tuberculosis. Lo que pare-



cía muy difícil de conseguir hace tan solo una década, es un objetivo realmente alcanzable a corto plazo. Una prueba serológica que tenga que asumir de forma positiva las deficiencias de las técnicas de diagnóstico tradicionales y ser aceptada universalmente debe permitir diagnosticar la tuberculosis de reactivación en sus fases iniciales, las tuberculosis pulmonares con baciloscopia negativa, las formas de tuberculosis extrapulmonar y la tuberculosis infantil. Dado que la tuberculosis es una enfermedad que suele presentarse precozmente en el curso del SIDA, es lógico suponer que el diagnóstico serológico también puede ser útil en estos enfermos.

De las múltiples técnicas evaluadas, el enzimoanálisis cumple los principales requisitos (sencillez, sensibilidad, reproductibilidad y bajo coste) exigibles a una prueba diagnóstica que tiene que utilizarse a gran escala, especialmente en países en vías de desarrollo donde se concentra el mayor contingente de enfermos tuberculosos.

Como se ha señalado repetidamente a lo largo de esta exposición, en serología de tuberculosis la especificidad de la prueba es esencial para obtener buenos valores predictivos y aquella depende del tipo de antígenos utilizados. Aunque los mejores resultados en grandes series se han obtenido cuando se han utilizado antígenos proteicos purificados, hay diferencias notables entre poblaciones con baja y alta prevalencia de tuberculosis. En el primer caso, los resultados obtenidos no pueden considerarse óptimos. Este hecho, unido a las dificultades técnicas de su obtención a gran escala, han sido determinantes de la búsqueda de antígenos alternativos. La única prueba comercializada hasta el momento actual (Anda-tb^R), en la que se utiliza un antígeno de naturaleza lipopolisacárida y lipoproteica, no parece mejorar los resultados obtenidos utilizando antígenos proteicos purificados (antígenos 5 y 6). La purificación de antígenos lipídicos, especialmente glicolípidos fenólicos especie-específicos (PGL-Tb1), ha supuesto un avance reciente muy importante. En pruebas de ELISA utilizando estos antígenos se han obtenido resultados francamente optimistas, aunque estos exigen confirmación en series mucho más amplias en las que los grupos control estén perfectamente definidos; estos deben incluir inexcusablemente y como mínimo, vacunados con BCG y tuberculín positivos sin enfermedad activa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fine P. Leprosy and tuberculosis-an epidemiological comparison. *Tubercle* 1984; 65: 137-154.
2. International Union Against tuberculosis/World Health Organization Study Group. Tuberculosis Control: Report of a Joint IUAT/WHO Study Group. Geneva, World Health Organization, 1982.
3. American Thoracic Society: Treatment of tuberculosis and tuberculosis infection in adults and children. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134: 355-363.
4. Sunderam G, McDonald RJ, Maniatis T et al. Tuberculosis as a manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *JAMA* 1986; 256: 362-366.
5. Starke JR. Modern approach to the diagnosis and treatment of tuberculosis in children. *Ped Clin North Am* 1988; 35: 441-464.
6. Heifets LB. Rapid automated methods (BACTEC system) in clinical mycobacteriology. *Semin Respir Infect* 1986; 1: 242-249.
7. Ausina V, Matas JM, Luquin M et al. Evaluación de un método radiométrico semiautomatizado (BACTEC 460TB) en el diagnóstico de la tuberculosis. *Enf Inf Microbiol Clin* 1984; 6: 236-241.
8. Laszlo A. Intralaboratory comparison of drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by BACTEC and conventional methodology. *Can J Microbiol* 1985; 31: 957-960.
9. Witebsky FG, Keiser JF, Conville PS et al. Comparison of BACTEC 13A medium and Du Pont Isolator for detection of mycobacteremia. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1.501-1.505.
10. Ocaña I, Martínez-Vazquez JM, Segura RM et al. Adenosine deaminase in pleural fluids. Test for diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Chest* 1983; 84: 51-53.
11. Ribera E, Martínez-Vazquez JM, Ocaña I et al. Activity of adenosine deaminase in cerebrospinal fluid for the diagnosis and follow-up of tuberculosis meningitis in adults. *J Infect Dis* 1987; 155: 603-607.
12. Daniel TM. Antibody and antigen detection for the immunodiagnosis of tuberculosis: Why not? What more is needed? Where do we stand today? *J Infect Dis* 1988; 158: 678-680.
13. Brooks JB, Daneshvar MI, Fast DM et al. Selective procedures for detecting femtomole quantities of tuberculostearic acid in serum and cerebrospinal fluid by frequency-pulsed electron capture gas-liquid chromatography. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 1.201-1.206.
14. Frech GL, Chan CY, Cheung SW et al. Diagnosis of pulmonary tuberculosis by detection of tuberculostearic acid in sputum by using gas-chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring. *J Infect Dis* 1987; 156: 356-362.
15. Pao ChC, Shyh-Shyan L, Shaw-Yun W et al. The detection of mycobacterial DNA sequences in clinical specimens with cloned *Mycobacterium tuberculosis* DNA as probes. *Tubercle* 1988; 69: 27-36.
16. Anónimo. Pruebas inmunológicas para la tuberculosis. *Lancet* (Ed. Cast) 1983; 3: 217-218.
17. Coates ARM, Hewitt J, Allen BW et al. Antigenic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* detected by means of monoclonal antibodies. *Lancet* 1981; 2: 167-169.
18. Daniel TM, Debanne SM. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 1.137-1.151.
19. Krambovitis E. Serodiagnosis of tuberculosis in perspective. *Serodiagnosis and Immunotherapy* 1987; 1: 1-19.
20. Nassau E, Parsons ER, Jhonson GD. The detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Tubercle* 1976; 57: 67-70.
21. Zeiss CR, Radin RC, Williams LE et al. Detection of immunoglobulin G antibody to purified protein derivative in patients with tuberculosis by radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1982; 15: 93-96.
22. Kalish SB, Radin RC, Phair JP et al. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay technique in the differential diagnosis of active pulmonary tuberculosis in humans. *J Infect Dis* 1983; 147: 523-530.
23. Tandon A, Saxena RP, Saxena KC et al. Diagnostic potentialities of enzyme-linked immunosorbent assay in tuberculosis using purified tuberculin antigen. *Tubercle* 1980; 61: 87-89.
24. Viljanen MK, Eskola J, Tala E. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to purified protein derivative of tuberculin (PPD). *Eur J Respir Dis* 1982; 63: 257-262.
25. Ballestrino EA, Daniel TM, de Latini MDS et al. Serodiagnosis of pulmonary tuberculosis in Argentina by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of IgG antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 and tuberculin purified protein derivative. *Bull WHO* 1984; 62: 755-761.
26. Stavri D, Niculescu D, Fuiorea I et al. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with staphylococcal protein A-horseradish peroxidase conjugate and exocellular native proteic antigens in an attempt to be used as a diagnostic tool in pulmonary tuberculosis. *Arch Roum Pathol Exp Microbiol* 1985; 44: 229-237.
27. Daniel TM, Janicki BW. Mycobacterial antigens: a review of their isolation, chemistry, and immunological properties. *Microbiol Rev* 1978; 42: 84-112.
28. Moulton RG, Dietz TM, Marcus S. Isolation of specific and nonspecific components from purified protein derivative. *Am Rev Respir Dis* 1972; 106: 213-218.



29. Nagai S, Nagasuga T, Matsumoto J et al. Isolation of tuberculin skin test reactive proteins from heated culture filtrate of *Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv. *Am Rev Respir Dis* 1974; 109: 17-28.
30. Yamamura Y, Onoue K, Azuma I. Chemical and immunological studies of peptides and polysaccharides from tubercle bacilli. *Ann NY Acad Sci* 1968; 154: 88-97.
31. Kuwabara S. Purification and properties of tuberculin-active protein from *Mycobacterium tuberculosis* J Biol Chem 1975; 250: 2.556-2.562.
32. Gupta KC, Landi S. Isolation of tuberculin peptides from tuberculin purified protein derivat (PPD). *Can J Microbiol* 1978; 1.242-1.249.
33. Nagai S, Matsumoto J, Nagasuga T. Specific skin-reactive protein from culture filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 1981; 31: 1.152-1.160.
34. Ma Y, Daniel TM. Immunochemical analysis of tuberculin purified protein derivative with special reference to United States Japan antigen 7. *J Infect Dis* 1983; 148: 500-509.
35. Kuwabara S, Tsumita T. Primary structure of tuberculin-active protein from tubercle bacilli (letter). *Jpn J Exp Med* 1974; 44: 129-132.
36. Kuwabara S. Amino acid sequence of tuberculin-active protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 1975; 250: 2.563-2.568.
37. Savrda J. Synthesis and biological assays of a peptide from a tuberculin-active protein. *Infect Immun* 1980; 30: 686-693.
38. Daniel TM, Anderson PA. The isolation by immunoabsorbent affinity chromatography and physicochemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5. *Am Rev Respir Dis* 1978; 117: 533-539.
39. Stroebel AB, Daniel TM, Lau JHK et al. Serologic diagnosis of bone and joint tuberculosis by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Infect Dis* 1982; 146: 280-283.
40. Lau JHK, Leong JCY, Stroebel AB. A longitudinal study of antibody titres to antigen 6 in patients with bone and joint tuberculosis. *Int Orthop* 1983; 7: 205-208.
41. Ma Y, Wang YM, Daniel TM. Enzyme-linked immunosorbent assay using *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in China. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134: 1.273-1.275.
42. Benjamin RG, Daniel TM. Serodiagnosis of tuberculosis using the enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) of antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126: 1.013-1.276.
43. Reggiardo Z, Vazquez E, Schanaper L. ELISA test for antibodies against mycobacterial glycolipids. *J Immunol Methods* 1980; 34: 55-60.
44. Reggiardo Z, Vazquez E. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and hemagglutination test using mycobacterial glycolipids. *J Clin Microbiol* 1981; 13: 1.007-1.009.
45. Reggiardo Z, Middlebrook G. Serologically active glycolipid families from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Extraction, purification and immunologic studies. *Am J Epidemiol* 1975; 100: 469-476.
46. Hunter SW, Fujiwara T, Brennan PJ. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *J Biol Chem* 1982; 257: 15.072-15.078.
47. Cho SN, Yanagihara DL, Hunter SW, et al. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infect Immun* 1983; 41: 1.077-1.083.
48. Daffé M, Lanéelle MA, Lacave Ch, Lanéelle G. Monoglycosyldiacetylphenol-phthiocerol of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *Biochim Biophys Acta* 1988; 958: 443-449.
49. Papa F, Rivière M, Fournie JJ, Puzo G, David HL. Specificity of *Mycobacterium kansasii* phenolglycolipid (mycoside A) immunoserum. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 2.270-2.273.
50. Papa F, Laszlo A, David HL, Daffé M. Serological specificity of *Mycobacterium tuberculosis* glycolipids. *Acta Leprologica* 1989; 7 (suppl): 98-101.
51. Torgal-García J, David HL, Papa F. Preliminary evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* phenolglycolipid antigen in the serologic diagnosis of tuberculosis. *Ann Inst Pasteur* 1988; 139: 289-294.
52. Martin-Casabona N, González Fuente T, Arcalis Arce L et al. Evaluation of a phenolglycolipid antigen (PGL-Tb1) from *M. tuberculosis* in the serodiagnosis of tuberculosis: comparison with PPD antigen. *Acta Leprologica* 1989; 7 (suppl 1): 89-93.
53. Cocito C, Vanlinden F. Preparation and properties of antigen 60 from *Mycobacterium bovis* BCG. *Clin Exp Immunol* 1986; 66: 262-272.
54. Daza RM, Portero MF, Dámaso D et al. Determinación, en nuestro medio, del valor umbral de anticuerpos frente al antígeno 60 de micobacterias por un método ELISA. *Rev Esp Microbiol Clin* 1988; 651-654.
55. Máttar S, Broquetas J, Sauleda J et al. Detección de anticuerpos IgG con el método ELISA en pacientes tuberculosos utilizando el antígeno 60. *Rev Esp Microbiol Clin* 1989; 97-102.