

Diagnóstico de la tuberculosis

J.A. Caminero Luna*, M. Casal Román**,
V. Ausina Ruiz***, J.M. Pina Gutiérrez*** y J. Sauret Valet***

Grupo de Trabajo de la SEPAR. *Las Palmas de Gran Canaria, **Córdoba y ***Barcelona.

Introducción

La tuberculosis (TB), la enfermedad que mayor número de muertes ha ocasionado en toda la historia de la humanidad, continúa causando estragos, a pesar de encontrarnos muy próximos al año 2000. En la actualidad, sigue siendo la enfermedad infecciosa más importante. Se calcula que en el mundo están infectados por *Mycobacterium tuberculosis* unos 1.700 millones de habitantes, lo que representa la tercera parte de la población mundial. Este reservorio condiciona que se produzcan anualmente entre 8 y 10 millones de casos nuevos de enfermedad, con una prevalencia aproximada de 16-20 millones de enfermos. Además, debido a que la tasa de disminución de los casos nuevos de TB es más baja que la tasa de aumento de la población, es probable que, actualmente, existan más tuberculosos que en 1882, año en el que Robert Koch descubrió el bacilo¹. Estos datos son aún más alarmantes si se tiene en cuenta que cada año mueren en el mundo de TB más de 3 millones de personas. Además, un nuevo aliado, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), va a dificultar aún más su erradicación. Este nuevo patógeno ha interferido el curso que desde hace más de 100 años había tomado la TB hacia su autoeliminación y va a magnificar y hacer pagar los errores cometidos por los distintos países, sobre todo los del tercer mundo, que apenas han disminuido sus tasas de infección en los últimos 50 años.

Aunque otras micobacterias diferentes de *M. tuberculosis* fueron ya reconocidas muy poco tiempo después de que se descubriera el bacilo tuberculoso², hasta la década de los cincuenta no fueron reconocidas como causantes de enfermedad. En la actualidad, con el advenimiento de la epidemia del sida, su importancia como patógenos oportunistas se ha incrementado considerablemente. La mayoría de estas micobacterias se encuentran en el medio ambiente y tienen escasa capacidad patógena, hecho por el cual han encontrado un excelente aliado en el VIH³.

En España no existen cifras oficiales fiables sobre el estado de la enfermedad y de la infección tuberculosa, pero datos aproximativos indican que la prevalencia de la infección a los 6 años es cercana al 1%, cifra que se eleva al 3,5-4% a los 14 años de edad. La tasa anual de casos nuevos de enfermedad debe de ser cercana a 40 por cada 100.000 habitantes^{4,5}. Es obvio que, en nuestro país, también va a tener un efecto considerable la infección por el VIH, efecto que ya es evidente en el incremento real del número total de enfermos.

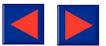
Si tuviéramos que extraer 3 grandes conclusiones de la situación actual de la TB, la primera de ellas sería negativa y tendría que hacer relación a los aspectos epidemiológicos que hemos mencionado. La segunda estaría en relación con los importantes logros terapéuticos conseguidos en los últimos 50 años, que la ha llevado a ser una enfermedad prevenible y curable. Sin embargo, la tercera conclusión vuelve a ser pesimista, al analizar los escasos avances conseguidos en el campo del diagnóstico de esta enfermedad en el presente siglo.

Al analizar el diagnóstico de la TB debe tenerse en cuenta que es tan importante diagnosticar la infección como la enfermedad, ya que ambas sólo son dos pasos sucesivos de la agresión que *M. tuberculosis* efectúa al organismo humano e implican, por tanto, actitudes terapéuticas que, bien en forma de profilaxis o de tratamiento, deben ser valoradas por igual.

Por todo lo expuesto previamente, el Área Científica de "Tuberculosis e Infecciones Respiratorias" (TIR) de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) consideró necesario revisar todos los métodos diagnósticos existentes en la actualidad en TB (tanto los convencionales como las nuevas técnicas), así como realizar unas recomendaciones sobre los que se deben utilizar en cada situación y su auténtica validez.

Transmisión y patogenia

La transmisión de *M. tuberculosis* es un claro ejemplo de infección adquirida por vía aerógena. En casi todos los casos la infección tuberculosa se adquiere por la inhalación de bacilos tuberculosos contenidos en peque-



ñas partículas aerógenas (1-5 μ) capaces de alcanzar el alveolo⁶. Para considerar a un paciente infeccioso por vía aerógena, éste debe padecer TB pulmonar y aerosolizar partículas que contengan bacilos en su interior. Una vez que las secreciones respiratorias se expelen desde la nariz o la boca, su contenido acuoso se evapora muy rápidamente, dejando tan sólo un pequeño residuo de material sólido, el núcleo goticular, en cuyo interior existen muy pocos microorganismos infectantes. Estos núcleos goticulares pueden mantenerse y transportarse por el aire durante un largo período de tiempo.

Un único bacilo en un diminuto núcleo goticular es más peligroso que un gran número de bacilos en una partícula aerógena de mayor tamaño, porque esas grandes partículas no permanecen aerosolizadas y, si se inhalan, se depositan en las paredes de la tráquea y del resto de la vía aérea superior. Allí son atrapadas en la capa de moco y eliminadas hacia la orofaringe, desde donde bien son deglutidas, o bien expectoradas⁶. Los microorganismos depositados en la piel o las mucosas intactas no invaden los tejidos y, por tanto, no son infectantes⁷.

El potencial de infectividad de un paciente con TB depende, fundamentalmente, de 4 factores: 1) severidad y frecuencia de la tos⁸; 2) carácter y volumen de las secreciones⁹; 3) número de bacilos de la fuente de infección (los pacientes con baciloscopia positiva son los más infectantes)⁹, y 4) uso de la quimioterapia (después de 2 semanas de tratamiento, se produce una reducción en el número de bacilos cercana al 99%¹⁰). Además, existen otros factores que pueden influir en la transmisión, como son los factores ambientales (ventilación de la habitación del enfermo, uso de mascarillas por el paciente, etc.)⁷, y los condicionantes de la exposición (cercanía al enfermo y tiempo)¹¹.

Además de la vía aerógena, existen otros infrecuentes mecanismos de transmisión, como son la vía digestiva (fundamentalmente en la enfermedad por *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium avium-intracellulare*¹²), la vía urogenital, la vía cutaneomucosa y la rara vía transplacentaria.

Cuando una persona se infecta por *M. tuberculosis*, desencadena en su organismo una respuesta inmunitaria, mediada por células, que se desarrolla en un tiempo que oscila entre 2 y 10 semanas y se revela por la aparición de una reacción tuberculínica positiva. Los macrófagos en primera instancia y los linfocitos T después consiguen, en la mayoría de los casos, detener la multiplicación de los bacilos, aunque, en un pequeño porcentaje de infectados (5%), esta inmunidad será insuficiente para impedir el desarrollo de la enfermedad y se producirá la denominada TB primaria. Además, aun en el caso de que se consiga controlar la infección inicial, no todos los bacilos de la población inicial son destruidos, sino que algunos de ellos son capaces de persistir intracelularmente en estado de latencia y, por ello, en otro 5% de los infectados, tras el paso de meses o años, se producirá la enfermedad por reactivación endógena o TB posprimaria.

No todas las personas corren el mismo riesgo de desarrollar enfermedad tuberculosa. A la cabeza de los

factores de riesgo se sitúa la infección por el VIH, aunque también hay que mencionar por su importancia la silicosis, la diabetes mellitus, las enfermedades y fármacos inmunosupresores, la terapéutica prolongada con corticoides, la gastrectomía y los estados de desnutrición. La susceptibilidad también está incrementada en los cinco primeros años de vida, en la pubertad y adolescencia y en la edad avanzada⁷.

Hasta el advenimiento de la epidemia del sida, algunos aspectos de la epidemiología y patogenia de la enfermedad producida por micobacterias ambientales oportunistas (MAO) eran desconocidos, pero estas enfermedades no se consideraban contagiosas de persona a persona¹³. Hoy parece aceptado que la puerta de entrada de *M. avium-intracellulare*, en los pacientes infectados por el VIH, es el tracto gastrointestinal, por el elevado número de estas micobacterias encontradas en heces y la frecuente afección intestinal hallada en los enfermos de sida y con esta infección oportunista¹². Sin embargo, a pesar de que con la llegada de la epidemia del sida se ha incrementado notoriamente el número de enfermos afectados de estas micobacteriosis, aún quedan muchos hechos que determinar en cuanto al curso de la infección, el modo de transmisión y la patogenia de estas enfermedades^{12,13}.

Diagnóstico de la infección tuberculosa

El diagnóstico de la infección tuberculosa se basa en el resultado de la prueba de la tuberculina (PT). Ésta pone de manifiesto un estado de hipersensibilidad del organismo frente a las proteínas del bacilo tuberculoso, que se adquiere, la mayoría de las veces, después de una infección producida por *M. tuberculosis*, aunque también puede ser ocasionado por vacunación BCG o por infección por MAO^{14,15}. Con la PT se pone de manifiesto una respuesta inmunológica mediada por células, que da lugar a una reacción inflamatoria con una importante infiltración celular en la dermis, lugar donde es depositada la tuberculina. Esta respuesta se puede detectar mediante una induración visible y palpable de la zona cutánea donde se practicó la prueba. Se puede acompañar de edema, eritema y a veces vesiculación, necrosis y linfadenitis regional^{14,15}.

Para la realización de la PT deben utilizarse 2 unidades de tuberculina PPD RT-23 o 5 unidades de PPD CT-68¹⁶⁻¹⁸, ambas dosis bioequivalentes a 5 unidades de PPD-S, tuberculina que fue preparada en 1939 por Seibert y que en 1951 fue aceptada como estándar internacional¹⁹. Cualquier otro tipo de tuberculina o dosis debe desaconsejarse. La PT está indicada en todas las situaciones en que interese confirmar o descartar la infección tuberculosa (tabla I), y no existen contraindicaciones para la misma. Debe practicarse, por su reproducibilidad y precisión, según la técnica de Mantoux, que consiste en la administración de la tuberculina por vía intradérmica en la cara anterior del antebrazo (aunque también se puede aplicar en la cara posterior) lejos de las venas y en piel libre de lesiones. Se utilizará una jeringuilla graduada en décimas de cc, con una aguja corta y biselada (27 G). Para tener la seguridad de que la



TABLA I
Indicaciones de la prueba de la tuberculina

<p>Convivientes y contactos íntimos de enfermos tuberculosos</p> <p>Personas cuya radiografía de tórax presente imágenes compatibles con tuberculosis no evolutiva</p> <p>Personas con sospecha clínica y/o radiológica de padecer enfermedad tuberculosa</p> <p>Personas que si están infectadas tienen un especial riesgo para el desarrollo de enfermedad tuberculosa, destacando las siguientes situaciones:</p> <p>Infección por VIH</p> <p>Adictos a drogas por vía parenteral</p> <p>Silicosis</p> <p>Diabetes mellitus insulínica</p> <p>Enfermedades inmunodepresoras: leucosis, linfoma y otras neoplasias</p> <p>Terapia inmunosupresora prolongada</p> <p>Desnutrición: síndromes de malabsorción, gastrectomía, derivación intestinal</p> <p>Alcoholismo</p> <p>Insuficiencia renal crónica. Hemodiálisis</p> <p>Personas que si están infectadas son de riesgo social y epidemiológico si desarrollan una TB activa:</p> <p>Cuidadores de guarderías infantiles</p> <p>Profesores de niños y jóvenes</p> <p>Personal sanitario (tocología, pediatría, ancianos, inmunodeprimidos)</p> <p>Personal de prisiones</p> <p>Otras profesiones o actividades con riesgo social</p> <p>Marginados sociales</p> <p>Estudios epidemiológicos y control de programas antituberculosos</p>
--

dosis ha sido administrada intracutáneamente, deberá aparecer un ampolla pálida que persista algún tiempo después de la inyección^{14,15}.

La lectura se realizará a las 72 horas, midiendo en milímetros la induración que se obtenga en la zona de la inyección y haciendo la medición según el diámetro transversal al eje longitudinal del antebrazo. Sólo hay que medir los límites de la induración y, si sólo hay eritema sin induración, el resultado se registrará como 0 mm^{14,15}. En el caso de que la lectura no se pueda realizar a las 72 horas, también será válida si se efectúa antes de los 7 días.

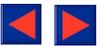
Se considerará que una PT es positiva cuando presente una induración ≥ 5 mm, límite aceptado actualmente para nuestro país^{16,17}. En los pacientes que hayan sido vacunados con BCG (existen en España más de 14 millones²⁰), este antecedente debe ser tenido en cuenta. En tal caso, no se puede discernir con seguridad absoluta si la reacción es debida a infección por *M. tuberculosis* o es un recuerdo de la vacuna²¹.

En todos los vacunados habrá que tener en cuenta la prevalencia de infección del colectivo al que pertenece la persona investigada^{15,22}. Así, si el vacunado es un conviviente o contacto frecuente de un enfermo bacilífero, la probabilidad de que su respuesta a la PT con induraciones de diámetro ≥ 5 mm signifique infección tuberculosa natural es de hasta el 70% (valor predictivo positivo)²¹. De esta forma, se acepta que en vacunados la respuesta a la PT con induraciones ≥ 5 mm debe ser significativa de infección por *M. tuberculosis* en convi-

vientes y contactos frecuentes de enfermos tuberculosos bacilíferos, en personas cuya radiografía de tórax ofrezca imágenes compatibles con TB no evolutiva, en infectados por el VIH (o con factores de riesgo para infección por el VIH) y en silicóticos. Si el vacunado no se encuentra en ninguna de estas circunstancias, se valorará individualmente cada caso, teniendo en cuenta (sin que nunca se pueda descartar que se deba a la BCG) que a mayor diámetro de la induración obtenida, más probabilidad de que la causa de la respuesta a la PT sea la infección tuberculosa natural, en especial si la induración supera los 15 mm de diámetro^{21,22}. Igualmente, la vesiculación y la necrosis tienen que valorarse como indicativas de que el origen de la respuesta a la PT es la infección tuberculosa. Aparte de la vacunación BCG y de la posible infección por MAO, puede haber otras causas excepcionales de falsos positivos en la PT, como son las transfusiones sanguíneas de donantes con hipersensibilidad tuberculínica a receptores no sensibilizados, la rotura de alguna pequeña vénula al practicar la PT con el consiguiente hematoma y la contaminación de la punción con microorganismos de la piel y acceso de los mismos a la dermis con posterior desarrollo de reacción inflamatoria²³. Por su parte, los resultados falsos negativos se pueden deber a las circunstancias señaladas en la tabla II. Además, es necesario recordar que tras la infección por *M. tuberculosis* han de transcurrir de 2 a 12 semanas para que los linfocitos T sensibilizados hayan pasado al torrente circulatorio y puedan reconocer la tuberculina depositada en la dermis. Durante este tiempo, aunque exista infección, no se obtiene respuesta a la PT^{14,15}. En el recién nacido no se puede detectar la positividad de una PT hasta las 8-12 semanas de vida en algunos casos y hasta los 6 meses en la totalidad²³. También hay que destacar que la capacidad de respuesta a la tuberculina no permanece invariable durante toda la vida, ya que, aunque no llega a desaparecer, se puede debilitar con el tiempo. Así, la PT puede llegar a dar un resultado imperceptible en pacientes de edad avanzada que se infectaron en su juventud^{14,15,23} o en vacunados no infectados por *M. tuberculosis*, teniendo en cuenta que en este último supuesto la respuesta se debilita más rápidamente. En estos casos, para detectar el denominado efecto *booster* (empuje) se volverá a practicar una nueva prueba 7-10 días después, y será el resultado de esta segunda PT el que indique si la persona investigada ha presentado o no reacción^{14,15,24}.

El efecto *booster* consiste en la estimulación de una sensibilidad tuberculínica debilitada (no ausente) por la tuberculina empleada en la PT cuyo resultado es aparentemente negativo. Tras esta PT, la capacidad de respuesta de la tuberculina estimulada se pone de manifiesto al cabo de una semana y puede persistir 2 o más años, por lo que una nueva PT realizada en este tiempo puede dar lugar a una falsa conversión.

La conversión tuberculínica consiste en la detección de un resultado de la PT ≥ 5 mm en una persona que previamente no había presentado respuesta a la tuberculina. Este hecho supone la adquisición de la infección tuberculosa si previamente se ha descartado el citado



efecto *booster*^{14,15,24}. En un paciente no infectado, la práctica repetida de la PT no induce sensibilidad tuberculínica.

Actitud a adoptar ante una prueba de la tuberculina negativa

Sin antecedentes de vacunación con BCG: *a)* en menores de 55-65 años se aceptará el resultado como negativo y al sujeto como no infectado, y *b)* en mayores de 55/65 años se repetirá la PT 7-10 días después de la primera y el resultado será el que se acepte.

Con antecedentes de vacunación con BCG: *a)* sin tener en cuenta la edad se repetirá 7-10 días después de la PT aceptando el resultado de esta segunda prueba.

Diagnóstico de la enfermedad tuberculosa

Para el diagnóstico de certeza de enfermedad tuberculosa es absolutamente necesaria la obtención de un cultivo que demuestre el crecimiento de colonias de *M. tuberculosis*. Por ello, se deben realizar todos los esfuerzos posibles para obtener las muestras oportunas y absolutamente todas ellas deben ser procesadas para baciloscopia y cultivo.

Sin embargo, a pesar de todos los esfuerzos, en ocasiones no es posible conseguir la confirmación bacteriológica del diagnóstico de enfermedad tuberculosa^{25,26}. En estos casos, el juicio diagnóstico que va a avalar una conducta terapéutica específica se ha de fundamentar en el conjunto de datos clínicos, radiológicos y de laboratorio que concurren en el enfermo. Los patrones de decisión ante una sospecha de TB pulmonar quedan recogidos en la figura 1.

Valoración clínica

Las manifestaciones clínicas de la TB no permiten diferenciarla con precisión de otras enfermedades broncopulmonares. El comienzo es, la mayoría de las ocasiones, insidioso y poco alarmante, por lo que pueden pasar varios meses hasta que se llegue al diagnóstico de certeza. De ahí la importancia de que el médico ponga en marcha las exploraciones complementarias ante la más mínima sospecha, a veces incluso en sujetos asintomáticos (contactos, inmunodeprimidos, etc.).

La primoinfección acostumbra ser subclínica o dar síntomas inespecíficos (tos, febrícula, etc.). La persistencia de síntomas respiratorios en el niño durante más de diez o quince días hace aconsejable practicar radiografía de tórax, en especial si se acompañan de manifestaciones sistémicas o extrapulmonares (anorexia, pérdida de peso, eritema nudoso).

La TB del adulto tiene también con frecuencia un comienzo solapado en forma de tos, expectoración mucopurulenta, sudación nocturna, cansancio fácil, etc., aunque en algunas ocasiones el inicio es agudo, con fiebre alta, escalofríos, expectoración hemoptoica o hemoptisis franca. En tales casos, el diagnóstico suele ser más temprano, pero no existe una correlación entre la extensión y gravedad de las lesiones y la magnitud o aparato-

TABLA II
Falsos negativos de la prueba de la tuberculina

1. Causas relacionadas con la persona a quien se le practica la prueba de la tuberculina
 - Infecciones:
 - Virales: VIH, sarampión, parotiditis, varicela
 - Bacterianas: fiebre tifoidea, brucelosis, tos ferina, lepra, tuberculosis masiva o diseminada, pleuritis tuberculosa
 - Fúngicas: blastomicosis
 - Vacunaciones con virus vivos: sarampión, parotiditis, varicela
 - Alteraciones metabólicas: insuficiencia renal crónica
 - Factores nutricionales: depleción proteica severa
 - Enfermedades de los órganos linfáticos: linfomas, leucemia linfocítica
 - Sarcoidosis
 - Corticoterapia y otros tratamientos farmacológicos inmunosupresores
 - Edad: recién nacidos y ancianos con sensibilidad disminuida
 - Situaciones de estrés: cirugía, quemados, enfermedad mental, etc.
2. Causas relacionadas con la técnica de la prueba
 - Tuberculina empleada: almacenamiento inadecuado (exposición a la luz y calor); diluciones inapropiadas; desnaturalización química (pasadas de fecha de caducidad); adsorción (parcial control con Tween 80)
 - Método de administración: inyección de cantidad insuficiente; administración tardía una vez extraída del vial con permanencia prolongada en la jeringa; inyección demasiado profunda de manera que no resulte intradérmica; inyección muy superficial con formación de una vesícula de paredes delgadas y fácil rotura con la consiguiente pérdida del líquido administrado; inyección próxima a área inflamada y vascularizada por la que puede difundir la tuberculina y no quedar localizada en el sitio donde se administró
 - Lectura del resultado: inexperiencia; error en la lectura o en su registro

idad de los síntomas²⁷. Una forma especial de comienzo es la neumonía tuberculosa, ya que puede aparentar el síndrome clínico-radiográfico de la neumonía bacteriana.

La TB miliar plantea a veces el problema de diagnóstico diferencial con la fiebre de origen desconocido, pues en el período inicial hay casos en los que no es visible el patrón radiográfico de afectación intersticial. Las diseminaciones pulmonares extensas cursan con disnea progresiva e insuficiencia respiratoria, que puede abocar en los casos graves, al distrés respiratorio del adulto.

Un aspecto especial a considerar es el de los sujetos infectados a la vez por *M. tuberculosis* y por VIH. En la TB de los enfermos portadores de anticuerpos frente al VIH, sin inmunodeficiencia desarrollada, los síntomas suelen ser similares a los observados en los demás pacientes, pero en el enfermo inmunodeprimido por sida el cuadro clínico inicial acostumbra a ser inespecífico, con predominio de síntomas generales (fiebre nocturna, astenia, pérdida de peso, adenopatías periféricas, etc.)²⁸. En un elevado porcentaje de casos, la reacción a la tuberculina es negativa (en los sujetos VIH positivos sin sida, el porcentaje oscila del 30 al 50% de los casos)²⁹.

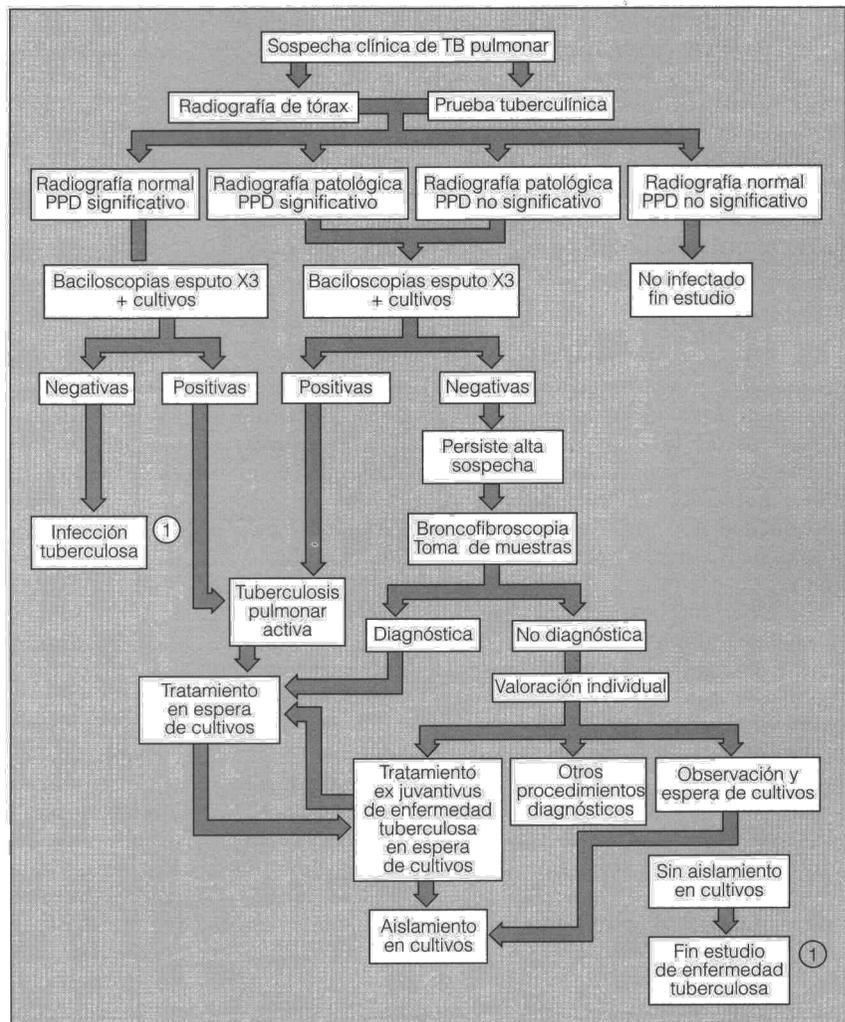
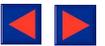


Fig. 1. Patrones de decisión ante una sospecha clínica de tuberculosis pulmonar.

Otra característica diferencial es la rápida diseminación de la enfermedad y la elevada tasa de localizaciones extrapulmonares, que llega en algunas series hasta el 60%.

La exploración física no acostumbra a ser de gran ayuda en el diagnóstico etiológico, ya que muchas veces es en apariencia normal. No obstante, debe realizarse siempre de manera sistemática y buscar algunos signos de valor orientativos³⁰. En ocasiones es posible auscultar crepitantes en el espacio infraclavicular o en la zona interescapulovertebral, en relación con lesiones exudativas y cavitarias. En las diseminaciones broncogénas se oyen estertores bronquiales (roncus, subcrepitantes, etc.) uni o bilaterales como en otras afecciones broncopulmonares no específicas.

Cuando hay afectación pleural, la semiología es la típica del derrame: matidez a la percusión, ausencia de vibraciones vocales, disminución o abolición del murmullo vesicular, soplo pleural, etc.

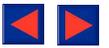
Se ha de explorar con especial atención la posible existencia de signos y localizaciones extratorácicas³¹, tales como eritema nudoso, adenopatías y fístulas cervicales y submaxilares, fístulas de ano, afectación osteo-

articular, etc. Cuando el enfermo presenta disfonía, conviene practicar laringoscopia indirecta y, si se sospecha diseminación hematógena, exploración del sistema nervioso (en particular los signos meníngeos) y examen del fondo de ojo. La hematuria sin dolor cólico y la piuria con orina "estéril" hacen aconsejable investigar una posible TB renal.

El estudio analítico habitual tampoco ofrece datos característicos³². Es frecuente observar una moderada anemia e hipoproteinemia, sobre todo si la evolución es prolongada, como en cualquier otra enfermedad consuntiva. A consecuencia de ello, la velocidad de sedimentación acostumbra a estar acelerada pero, en general, no suele exceder los 50-60 mm a la primera hora.

En las formas agudas y febriles puede haber leucocitosis más o menos intensas con neutrofilia, aunque es más frecuente la linfocitosis, en especial en las formas subagudas y crónicas.

En bastantes casos se observa al inicio (antes de empezar el tratamiento) un discreto trastorno de la función hepática (elevación de transaminasas y/o GGT), que la mayoría de las veces no se debe a infiltración del hígado.



do, sino al síndrome tóxico o a la frecuente asociación de la TB con el alcoholismo.

Las concentraciones séricas de urato están elevadas en el 80-90% de los enfermos en tratamiento con pirazinamida, por interferencia del fármaco en el mecanismo de secreción tubular del ácido úrico. Algunos casos de TB diseminadas graves pueden cursar con hiponatremia e hipocloremia por síndrome de secreción inadecuada de hormona antidiurética.

Técnicas de imagen

La TB, tanto la pulmonar como la extrapulmonar, no presenta ningún signo radiológico patognomónico. Así, aunque existan lesiones radiológicas altamente sugestivas de TB (cavitaciones de lóbulos superiores) y se acompañen de una situación epidemiológica favorable, nunca se debe admitir el diagnóstico de esta enfermedad con un simple estudio radiológico, y éste sólo indicará que se deben realizar estudios microbiológicos.

Tampoco el pronóstico y la respuesta al tratamiento se pueden valorar decisivamente por la evolución radiológica, puesto que la regresión de las lesiones puede producirse en un período de entre 3 y 9 meses, y puede haber un incremento paradójico de las lesiones en el primer mes del tratamiento, sin que ello suponga un fracaso de la medicación. Por ello, a todo paciente con TB sólo estará indicado realizarle dos estudios radiográficos, uno de ellos al inicio y el otro al finalizar la terapéutica. No deben solicitarse radiografías en cada una de las revisiones.

Sin embargo, a pesar de lo expuesto, hay que reconocer que en la TB pulmonar la principal sospecha diagnóstica se fundamenta en una radiología sugestiva, al ser ésta una técnica que, en esta localización, tiene pocos falsos negativos. Es, por tanto, una técnica sensible pero inespecífica. Tan sólo en algunas formas de TB primaria, y a menudo en infectados por el VIH severamente inmunodeprimidos, se pueden encontrar radiografías de tórax normales.

La tuberculosis primaria, cuando se manifiesta radiográficamente, suele ser como infiltrado alveolar, con o sin adenopatías hiliares o mediastínicas, o bien como afectación ganglionar sin lesión parenquimatosa. Además, también se pueden encontrar radiografía de tórax normal, consolidación pulmonar, adenopatías (generalmente unilaterales), cavitación (rara y de forma aislada), derrame pleural (más frecuente en jóvenes y adolescentes) e, incluso, atelectasia de determinados lóbulos por compresión de adenopatías mediastínicas (más frecuente en niños y adolescentes)³³.

En el caso de la tuberculosis posprimaria o de reactivación³³, la afectación parenquimatosa pulmonar es un hallazgo constante en esta fase de la enfermedad y se localiza, con mayor frecuencia, en los segmentos apical y posterior de los lóbulos superiores o en el apical del inferior. También pueden encontrarse tuberculomas (nódulos de diferente tamaño) con variaciones en su morfología y de localización preferente en los lóbulos superiores. La cavitación es frecuente (45-60%) así como la

diseminación broncogena a otras áreas del pulmón. El derrame pleural también es frecuente.

Es necesario tener en cuenta que en ocasiones la radiografía puede poner de manifiesto una consolidación parenquimatosa indistinguible de una neumonía de otra etiología, hecho que puede conllevar un retraso diagnóstico, sobre todo si la presentación clínica es abrupta y no larvada.

A veces es necesario realizar radiografía de tórax en hiperlordosis para visualizar mejor pequeñas lesiones en ambos vértices pulmonares.

La tuberculosis miliar puede ser una manifestación, tanto de enfermedad primaria como posprimaria. El patrón radiográfico típico lo constituyen múltiples nódulos finos, de tamaño inferior a 3 mm, generalmente más profusos en lóbulos inferiores y para cuya visualización es de gran utilidad la identificación del espacio retrocardíaco en la radiografía lateral³³. Es necesario conocer que estos nódulos finos pueden persistir en el tiempo, incluso después de haber curado la enfermedad.

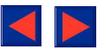
Las manifestaciones radiográficas pulmonares de la MAO son muy parecidas a las de la TB cuando afectan a huéspedes inmunocompetentes. La única diferencia que parece encontrarse es la ausencia de lesiones sugestivas de TB primaria y que algunas de estas infecciones por MAO pueden presentarse como nódulos pulmonares solitarios³⁴.

Por lo que se refiere a la radiología de la TB en los infectados por el VIH, la expresión de las distintas imágenes va a depender del grado de inmunodepresión que padezca el enfermo. Si ésta no es severa y el enfermo había sido infectado en el pasado, lo más normal es que ocurra una reactivación endógena de estos bacilos y se producirán las lesiones típicas de la TB posprimaria. Si, por el contrario, la inmunodepresión es severa, cualquier exposición a una fuente de contagio, e incluso, una reactivación endógena, no encontrará apenas oposición por parte de las defensas del organismo y se producirán, predominantemente, las lesiones típicas de la TB primaria, con frecuente afección linfática y diseminaciones hematógenas. En este último caso son frecuentes las radiografías de tórax normales y la participación extrapulmonar.

Para una valoración más correcta del mediastino es de gran utilidad la tomografía computarizada que, además, será útil para localizar los territorios afectados accesibles a punción diagnóstica en los casos dudosos. Salvo en casos muy excepcionales, no está indicado realizar tomografía computarizada en el diagnóstico de la TB.

Prueba de la tuberculina

Ante la sospecha de enfermedad tuberculosa que no ha podido ser confirmada bacteriológicamente, la PT puede ser de gran ayuda, sobre todo en determinadas situaciones. Así, el mayor valor de esta prueba en el diagnóstico de TB activa se obtiene en los niños, entre los que la prevalencia de infectados es baja, de manera que un paciente con una PT positiva y clínica sospechosa tiene muchas probabilidades de padecer la enfermedad



tuberculosa. También puede resultar de gran ayuda en los pacientes infectados que pertenecen a los colectivos de alto riesgo de padecer TB (infectados por el VIH, silicóticos, diabéticos, usuarios de drogas por vía parenteral, personas con enfermedades inmunosupresoras, con desnutrición, sometidas a terapia inmunosupresora prolongada, etc.). Estos dos grupos son los que aportan a la PT el mayor valor predictivo positivo en el diagnóstico de enfermedad (probabilidad de que un sujeto con Mantoux positivo padezca una TB activa)³⁵⁻³⁷.

El hecho de encontrarnos con un resultado negativo en la PT no tiene por qué excluir el diagnóstico de enfermedad tuberculosa, ya que el paciente puede encontrarse en alguna de las situaciones que pueden deprimir la respuesta a la tuberculina (tabla II), entre las que se incluyen la TB diseminada y la TB pleural. También debe tenerse en cuenta que, a excepción de los infectados por el VIH, es en los pacientes de edad avanzada en los que es más frecuente que la PT sea negativa.

Diagnóstico microbiológico

*Toma de muestras*³⁸⁻⁴⁰. La normativa que debe seguirse para la recogida de muestras se resume en las siguientes recomendaciones:

1. Las muestras deben recogerse siempre que sea posible, antes de iniciar la quimioterapia.
2. El enfermo ha de ser instruido sobre la forma más adecuada de recoger el esputo y sobre la importancia de que el material no sea saliva ni secreciones rinofaríngeas. Si tiene dificultad para expectorar, se puede intentar obtener esputo inducido mediante *clapping* y/o aerosol con suelo fisiológico.
3. Se informará al paciente supuestamente bacilífero sobre la conveniencia de recoger las muestras en espacios abiertos o en habitaciones bien ventiladas, lo más alejado posible de otras personas.
4. Los esputos y la orina deben enviarse en frascos limpios de vidrio o plástico de boca ancha y tapón a rosca hermético.
5. Es aconsejable realizar un estudio seriado para obtener mayor rentabilidad (como mínimo tres esputos u orinas obtenidos en días sucesivos).
6. Una vez recogida la muestra, la enfermera identificará el envase con los datos personales del paciente antes de su envío al laboratorio.
7. Las muestras se remitirán inmediatamente después de su obtención al laboratorio. Si por alguna causa el traslado se demora, han de guardarse en el frigorífico.
8. Cuando la muestra se obtiene mediante manipulación directa (punción de abscesos, LCR, biopsias, etc.), es preciso observar la más rigurosa asepsia en la técnica y colocar el material en un envase estéril.
9. Siempre que se practique una biopsia de cualquier órgano por sospecha de TB, deberá remitirse un fragmento al laboratorio de microbiología y otro al de anatomía patológica. La muestra destinada a estudios microbiológicos debe enviarse sin fijar, con unas gotas de agua destilada para evitar su deseca-

ción y con arreglo a las normas señaladas en los puntos 7 y 8.

10. Cuando el enfermo no expectora, la broncofibroscopia es la técnica de elección, ya que permite realizar broncoaspirados selectivos, lavado broncoalveolar y biopsia de las lesiones bronquiales, siendo su rentabilidad superior a la del aspirado gástrico en ayunas. Estas muestras deben remitirse y ser procesadas en el laboratorio inmediatamente. El anestésico local presente en las mismas, generalmente lidocaína, tiene un efecto inhibitor sobre las micobacterias en pocas horas y puede ser causa de cultivos falsamente negativos si se difiere su procesamiento.
11. Si se trata de pacientes VIH positivos con sospecha de tuberculosis pueden remitirse al laboratorio gran número de muestras (heces, esputos, broncoaspirados, lavados broncoalveolares, ganglios linfáticos, biopsias de tejidos, LCR, muestras de orina, etc.). Para la toma y envío de estas muestras al laboratorio se atenderá a las recomendaciones señaladas antes. En caso de síndrome febril persistente y sospecha de infección diseminada por micobacterias, no debe renunciarse nunca a la práctica de 1 o 2 hemocultivos (véase el subapartado Nuevos métodos de cultivo). La sangre se obtendrá, previa desinfección adecuada de la piel, por punción venosa estéril y se inocularán 5-10 ml en un frasco de hemocultivo especial para micobacterias o en un tubo estéril que contenga un anticoagulante y saponina para lisis-centrifugación.

*Técnicas de diagnóstico microbiológico directo*³⁸⁻⁴⁰. Para el diagnóstico de la enfermedad tuberculosa no basta con la utilización de la radiología, la prueba de la tuberculina o la observación de bacilos ácido-alcohol resistentes mediante examen microscópico directo. Esta última técnica, aun siendo de las tres la mejor, posee importantes limitaciones.

El diagnóstico microbiológico de la tuberculina se basa en tres etapas sucesivas:

1) Demostración de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en preparaciones teñidas mediante la técnica de Ziehl-Neelsen o la variante de tinción con fluorocromos.

2) El aislamiento de *M. tuberculosis* y otras micobacterias en cultivo puro y la posterior identificación de especie o patogrupo.

3) En determinados casos, éste se completa con el estudio de sensibilidad in vitro a los fármacos antituberculosos (antibiograma).

Las técnicas disponibles para el diagnóstico de la TB por métodos directos se exponen en la figura 2, donde además se detallan las que se deben utilizar dependiendo del nivel del laboratorio.

Niveles de los servicios de laboratorio para el estudio de las enfermedades producidas por micobacterias^{39,40}. De acuerdo con las necesidades señaladas anteriormente, los laboratorios de microbiología pueden

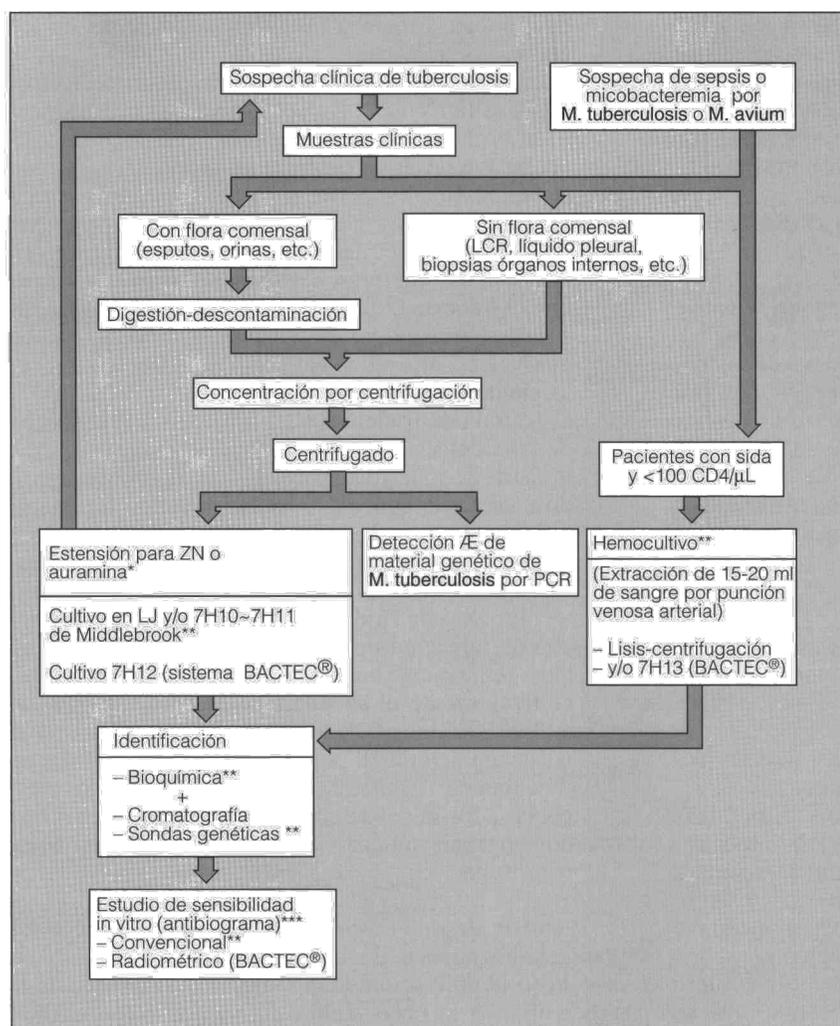


Fig. 2. Técnicas disponibles para el diagnóstico de la tuberculosis por métodos directos. CD4: subpoblación linfocitaria T CD4; 2N: baciloscopia directa por el método de Ziehl-Neelsen; LJ: cultivo de la muestra en medio de Löwenstein-Jensen; PCR: reacción en cadena de la polimerasa. *Técnicas exigibles a laboratorios nivel I. **Técnicas exigibles a laboratorios nivel II. Sólo es necesario que asuman la identificación bioquímica o genética de *M. tuberculosis*. Las técnicas no señaladas con asterisco son exigibles exclusivamente a laboratorios de nivel I. ***Exclusivamente cuando está indicado.

ofrecer tres categorías principales de servicios en relación con las micobacterias, a saber:

Nivel I. Recogida y transporte de muestras.

Examen microscópico de frotis en busca de BAAR.

Nivel II. Los mismos del nivel I, más el aislamiento e identificación de *M. tuberculosis*.

Nivel III. Todas las de niveles inferiores más la identificación de todas las MAO.

Los estudios de sensibilidad in vitro pueden efectuarse en el nivel II y son inexcusables en el nivel III.

A los laboratorios de nivel III deben asignárseles, además, funciones docentes de control de calidad y deben estar en condiciones de poder asumir y evaluar las nuevas técnicas de diagnóstico microbiológico.

Tinción y examen microscópico³⁹. El hallazgo de bacilos ácido-alcohol resistentes en extensiones teñidas y examinadas al microscopio es la primera evidencia de la presencia de micobacterias en una muestra clínica. Es el procedimiento más fácil y rápido que se puede efectuar, y aporta al clínico una confirmación preliminar del diagnóstico.

La técnica clásica de Ziehl-Neelsen o sus variantes y la tinción con fluorocromos (auramina) son igualmente eficaces y se basan en el mismo principio. La ventaja de la fluorescencia es su mayor rapidez (en ella la observación se realiza sin inmersión y con un campo de observación más amplio con lo que se gana tiempo); por esta razón, está justificada en aquellos laboratorios que realizan más de diez exámenes microscópicos cada día.

Para la correcta realización e interpretación de los resultados de un examen microscópico directo deben tenerse en cuenta los siguientes hechos: a) La ácido-alcohol resistencia es una propiedad común a todas las especies del género *Micobacterium* y no sólo de *M. tuberculosis*. b) La no observación de BAAR en una muestra clínica no descarta el diagnóstico de TB, ya que es una técnica de sensibilidad limitada. Se estima que la concentración más baja de microorganismos que se puede detectar mediante examen microscópico es de 10⁴/ml de muestra. c) Al informar los resultados del examen microscópico, el microbiólogo debe proporcionar al clínico una estimación aproximada del número de BAAR detectados. La reducción del número de bacilos emitidos por el enfermo orienta sobre la eficacia del tra-

tamiento siempre que se acompañe de una mejoría de sus síntomas clínicos. d) Cuando los pacientes bacilíferos son tratados con regímenes de primera elección suelen negativizar sus esputos a partir de las 2-3 semanas de tratamiento. No obstante, en algunos pacientes se negativizan antes los cultivos que las baciloscopias, esto es debido a que los bacilos que se siguen eliminando están lo suficientemente lesionados por el tratamiento para que no sean capaces de desarrollarse en los cultivos. Esto da lugar a lo que se llaman “falsos positivos” de la baciloscopia (examen microscópico positivo con cultivo negativo o “bacilos inviábiles”). A pesar de la “positividad” de la baciloscopia, estos pacientes no suelen tener capacidad contagiante.

*Cultivo de las micobacterias*³⁹⁻⁴¹. Todas las muestras clínicas sospechosas de contener micobacterias se deben sembrar (tras su adecuada digestión y descontaminación, si fueran necesarias) en medios de cultivo adecuados por las siguientes razones: 1. Los cultivos son mucho más sensibles que los exámenes microscópicos, al punto que pueden detectar una cantidad tan pequeña como 10 bacterias por ml de muestra clínica digerida y concentrada. 2. El aislamiento en cultivo puro es necesario para poder identificar la especie de las cepas aisladas. 3. Si la baciloscopia es un índice de la eficacia del tratamiento, el cultivo permite asegurar la negativización y curación del paciente.

*Digestión y descontaminación de muestras*⁴⁰. Es un paso previo al cultivo del que dependen en gran medida los resultados de éste.

La mayor parte de las muestras clínicas contienen gran cantidad de microorganismos de la flora comensal que crecen con mayor rapidez que *M. tuberculosis*, que tiene un tiempo de generación de 18-24 h. Es necesario eliminar de la muestra estos microorganismos contaminantes que impedirían el desarrollo de las micobacterias. También es importante conseguir la licuefacción de los restos orgánicos (tejidos, moco, suero y otros materiales proteináceos) que rodean a los microorganismos, para que los agentes descontaminantes puedan destruir las bacterias no deseadas. Así, sobrevivirán las micobacterias y podrán tener acceso a los nutrientes del medio. Las micobacterias son más resistentes a los ácidos y bases fuertes que otros microorganismos, lo que permite utilizar con éxito estas técnicas de digestión-descontaminación. Pero si éstas no se utilizan adecuadamente pueden afectar también la viabilidad de las micobacterias presentes en la muestra y dar lugar a falsos cultivos negativos (por exceso de descontaminación) o a un número elevado de contaminaciones (por defecto de descontaminación).

Medios de cultivo y condiciones de incubación. Disponemos de diferentes tipos de medios adecuados para el aislamiento de micobacterias a partir de muestras clínicas. Los más utilizados son los que tienen como base el huevo (Löwenstein-Jensen, Colestos, etc.) y los semi-sintéticos con agar (7H10 y 7H11 de Middlebrook).

Algunas micobacterias, muchas de ellas relacionadas con el sida, tales como *M. haemophilum*, *M. malmoen-*

se, *M. genavense* y *M. avium subsp. paratuberculosis*, exigen suplementar los medios de cultivo con factores de crecimiento especiales (hemina, sangre, micobactina o citrato amónico férrico, etc.)⁴².

La incubación de los medios sembrados en una atmósfera enriquecida con un 5-10% de CO₂ favorece el crecimiento de *M. tuberculosis*. Cualquiera que sea el medio de cultivo utilizado, el tiempo transcurrido entre la recepción de la muestra y la emisión del resultado suele ser de 3 a 6 semanas.

El número de colonias obtenidas por cultivo se debe cuantificar de alguna manera en el momento de emitir el informe al clínico.

Nuevos métodos de cultivo^{40,42-44}. La búsqueda de técnicas más rápidas y sensibles de cultivo ha permitido introducir en los laboratorios clínicos: 1) los métodos radiométricos (sistema BACTEC®); 2) medios de cultivo bifásicos (MB-Septi-Check®), y 3) técnicas adecuadas para aislar micobacterias de la sangre (hemocultivo).

1) *Métodos radiométricos (sistema BACTEC®)*^{40,44}. Detectan automáticamente el crecimiento micobacteriano midiendo la cantidad de ¹⁴CO₂ producido por la metabolización de sustratos (ácidos grasos) marcados con ¹⁴C. Se utilizan viales que contienen 4 ml de medio 7H12 de Middlebrook que admiten inóculos de hasta 0,4 ml.

En relación a los sistemas tradicionales de cultivo el sistema BACTEC® tiene las siguientes ventajas:

a) Ahorro de tiempo (15-20 días) en la detección del crecimiento.

b) Mayor sensibilidad, tanto para el aislamiento de *M. tuberculosis* como de otras micobacterias.

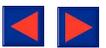
c) Posibilidad de identificar *M. tuberculosis* en 4-5 días y de realizar antibiogramas a los fármacos de primera elección (incluyendo la pirazinamida) en tiempos medios de 3-6 días, en lugar de los 21-42 días que exigen los métodos convencionales.

El principal inconveniente del sistema BACTEC® reside en tener que trabajar con ¹⁴C, lo que requiere disponer de los permisos necesarios para la manipulación y almacenamiento de este compuesto.

Para laboratorios de nivel II y III el sistema BACTEC® es hoy día, sin duda, el avance diagnóstico más contrastado y útil en micobacteriología clínica.

Para tratar de eliminar el uso de ¹⁴C se trabaja actualmente en técnicas que permiten detectar el crecimiento micobacteriano mediante fluorimetría. Los medios que se están probando llevan incorporado un compuesto de rutenio que emite fluorescencia detectable a medida que disminuye la tensión parcial de O₂ del medio como consecuencia del metabolismo microbioano. Esta medición del crecimiento por fluorimetría sustituirá en un próximo futuro a los métodos radiométricos.

2) *Medios de cultivo bifásicos no radiométricos (MB-Septi-Check®)*^{40,43,45}. Hace unos años se introdujo en el mercado un sistema bifásico para el cultivo de micobacterias (MB-Septi-Check®), con el que se pretendía obtener una rapidez y sensibilidad similares a las del BACTEC® sin necesidad de utilizar isótopos radiacti-



vos. Se trata de frascos que contienen 20 ml de caldo 7H12 a los que puede anexionarse a la parte superior un dispositivo que contiene diferentes medios sólidos. Este sistema presenta algunas ventajas sobre el BACTEC®, ya que, al permitir utilizar inóculos de siembra mayores, posee una sensibilidad algo superior a la de aquél. Además, ofrece la posibilidad de disponer de un crecimiento sobre la fase sólida que puede utilizarse para practicar pruebas de identificación sin necesidad de realizar resiembra adicionales, lo que facilita además la detección de cultivos mixtos. Los principales inconvenientes del MB-Septi-Check® son los siguientes: la detección del crecimiento es más lenta que con el BACTEC®, no permite realizar estudios de sensibilidad in vitro y falla con frecuencia el sistema de identificación presuntiva de tuberculosis que lleva incorporado en su fase sólida. A pesar de esto, merece ser considerado como sistema alternativo al BACTEC® en los laboratorios de nivel II o III que no posean instalación radiactiva.

3) *Técnicas de hemocultivo para micobacterias*⁴⁶⁻⁴⁸. El notable incremento de las infecciones diseminadas por *M. avium-intracellulare* y *M. tuberculosis* en pacientes con sida ha estimulado la introducción de técnicas que permiten la detección de micobacterias en sangre. De entre estas técnicas las más eficaces son las de lisis-centrifugación y las radiométricas.

Ambas tienen una sensibilidad similar. La principal ventaja de la lisis-centrifugación es que permite cuantificar el número de bacterias por mililitro de sangre y controlar seriadamente la eficacia del tratamiento administrado. Por el contrario, la siembra directa de la sangre en medio 13A y el control posterior por el sistema radiométrico evitan muchas manipulaciones peligrosas, que son obligadas en la técnica de lisis-centrifugación.

Su uso está indicado en pacientes con sida con linfocitos CD4 por debajo de 50 y fiebre de origen desconocido.

Identificación de las micobacterias. Técnicas bioquímicas^{39,41}. La identificación de *M. tuberculosis* puede realizarse mediante pruebas bioquímicas sencillas. Las cepas de *M. tuberculosis* son niacinas positivas, reducen nitratos a nitritos y poseen una catalasa termolábil. Por lo demás, cualquier estrategia de identificación que pretenda ir más allá de la simple separación de *M. tuberculosis* del resto de micobacterias exige la práctica de pruebas de identificación que sean capaces de aportar un mínimo de 10-20 rasgos diferenciales, lo que no está al alcance de muchos laboratorios.

Las evidentes limitaciones de las técnicas de identificación bioquímica estándar (complejidad, lentitud y falta de reproducibilidad) han estimulado el desarrollo de técnicas de identificación rápidas alternativas: técnicas de identificación cromatográfica y sondas genéticas.

*Cromatografía*⁴⁹. Las micobacterias se caracterizan por poseer una pared celular extraordinariamente rica en lípidos. Algunos de estos lípidos (como los ácidos micólicos) son característicos de este género, encontrándose además diferencias cuantitativas y cualitativas en la composición lipídica de las diferentes especies.

Entre los lípidos micobacterianos más estudiados por

su valor taxonómico destacan los ácidos micólicos y otros ácidos grasos de la pared celular. Los ácidos micólicos pueden separarse con relativa facilidad en su forma de ésteres metílicos por cromatografía en capa fina (CCF) en gel de sílice. El estudio de los ácidos micólicos por CCF separa las micobacterias en grupos y la identificación definitiva se lleva a cabo por cromatografía de gases (CG).

Estas técnicas se pueden utilizar en laboratorios de nivel III con experiencia en las mismas.

Sondas genéticas^{40,50,51}. Una sonda es un reactivo biológico constituido por un fragmento de ADN que posee una secuencia de bases complementaria a la del genoma de un microorganismo. Las sondas están marcadas con diversos indicadores fáciles de detectar: isótopos radiactivos (sondas calientes) o sustratos cromógenos (sondas frías).

Cuando se libera el ácido nucleico de un microorganismo y después se desnaturaliza el ADN liberado (se separan las dos hebras que forman la molécula de ADN por procedimientos físicos [-T^o 90 a 140 °C-]), la sonda es capaz de fijarse (hibridarse) con su fragmento homólogo, si existe. La hibridación de la sonda a su fragmento homólogo se detecta fácilmente gracias al marcador que se ha incorporado. Actualmente disponemos de sondas frías (Gen-Probe®, Syngene®) para identificación de *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* y *M. gordonae*. No existen sondas comercializadas para el resto de especies de micobacterias.

Entre las principales ventajas de las sondas genéticas hay que destacar la sencillez de su manipulación, que permite su adaptación a cualquier laboratorio. El principal inconveniente es su coste. Es una tecnología muy utilizada en la actualidad en laboratorios de nivel II.

*Estudios de sensibilidad in vitro*⁴⁰. Los estudios de sensibilidad in vitro de *M. tuberculosis* pueden realizarse directamente a partir de la muestra recibida en el laboratorio, cuando en ella se observan abundantes bacilos en el examen microscópico (método directo) o a partir de un cultivo en fase exponencial de crecimiento (método indirecto).

Los métodos estandarizados para el estudio de sensibilidad in vitro de *M. tuberculosis* son: el de las proporciones y diluciones múltiples de Canetti, el de la concentración absoluta de Meissner y el del nivel de resistencias de Mitchison; todos ellos en medio de Löwenstein-Jensen. Los Center for Diseases Control de Atlanta (EE.UU.) recomiendan el método de las proporciones, pero en medio semisintético 7H10 de Middlebrook.

Actualmente pueden realizarse estudios de sensibilidad por técnica radiométrica (BACTEC®) utilizando una variante simplificada y adaptada del método de las proporciones de Canetti.

El laboratorio debe informar al clínico acerca de la cuantía del crecimiento que se ha producido en los medios con fármacos antituberculosos en comparación con los medios sin fármaco. En un antibiograma realizado adecuadamente, el control tendrá colonias contables, y

el recuento de colonias en el medio con fármaco y en el control permitirá calcular la proporción de bacilos resistentes en la población total y expresada como porcentaje. En general, cuando el 1% o más de la población bacilar se hace resistente a la concentración crítica de un fármaco, entonces el agente no es, o pronto no será, útil para continuar el tratamiento porque la población resistente será predominante en poco tiempo.

El tiempo de lectura de un antibiograma en medio de Löwenstein-Jensen es de 4-5 semanas, en medios semi-sintéticos (7H10 o 7H11 de Middlebrook) de 2-4 semanas y en el BACTEC® de 5-8 días.

*Diagnóstico serológico*⁵²⁻⁵⁷. Diversos factores han contribuido a que en los últimos años se haya avanzado extraordinariamente en el diagnóstico serológico de la TB, sobre todo porque se ha trabajado con técnicas más sensibles y con antígenos purificados más específicos. Desde el punto de vista de la técnica, el enzoinmunoanálisis (ELISA) parece ser el que ofrece mejores perspectivas en la actualidad, al ser una técnica rápida, automatizable, que proporciona resultados reproducibles y con la que se trabaja con sensibilidades óptimas.

Por su parte, los antígenos purificados que mejor se conocen y con los que más se ha trabajado en los últimos años son los de naturaleza proteica y lipídica.

Los datos disponibles en el momento actual indican que para el diagnóstico de la enfermedad en la práctica clínica, utilizando técnica de ELISA con los mejores antígenos disponibles, se necesita una especificidad próxima al 100% que garantice buenos valores predictivos de la prueba. Para ello es necesario adoptar puntos de corte iguales a la media de los obtenidos en sueros de personas normales más tres desviaciones estándares, caso en el que la sensibilidad no suele ser superior al 50%. En el momento actual, pese a los indudables progresos realizados en este campo, desconocemos aún la dinámica de aparición y vida media de las inmunoglobulinas en el curso de la TB, así como también qué antígenos pueden ser de mayor utilidad. Tampoco conocemos por qué algunos pacientes con TB activa no tienen concentraciones detectables de anticuerpos en el momento de diagnosticarse la enfermedad. Hasta que estas cuestiones no estén completamente aclaradas, el diagnóstico serológico de la TB no puede recomendarse para uso general.

*Nuevas técnicas de diagnóstico microbiológico. Ampliación enzimática del ADN mediante PCR*⁵⁸⁻⁶⁰. Desde su introducción en 1985, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite sintetizar por vía enzimática millones de copias de un fragmento específico de ADN, se vislumbró como una técnica que podía revolucionar por su rapidez y sensibilidad el diagnóstico de las enfermedades infecciosas.

La extraordinaria sensibilidad de esta técnica es a la vez su principal atractivo e inconveniente ya que la contaminación de la muestra con una sola copia de la secuencia a ampliar es suficiente para dar lugar a un falso positivo. Por otro lado, la presencia de inhibidores enzimáticos en determinadas muestras clínicas, así como su laboriosidad y costes en espacio y equipos, ha impedido

durante algunos años, a pesar de los excelentes resultados obtenidos en estudios de investigación preliminares, su introducción en la práctica clínica para el diagnóstico de la tuberculosis. Ha sido necesario que las grandes compañías multinacionales del mundo de los reactivos de laboratorio introdujeran en el mercado equipos más o menos sofisticados y reactivos de gran calidad que simplifican, facilitan o automatizan las reacciones de amplificación, para que esta tecnología pueda ser aplicada con las debidas garantías en el diagnóstico de la tuberculosis.

El sistema Amplicor TB® (Roche Diagnostic Systems) se ha introducido recientemente en el mercado y ya está preparado para su presentación en su versión totalmente automatizada (Cobas Amplicor®). En este sistema se amplifica por PCR un fragmento del gen que codifica para el ARN ribosómico 16S, posteriormente se hibrida el producto amplificado a una sonda marcada enzimáticamente y la detección del producto amplificado se realiza mediante una reacción colorimétrica. Evaluada en dos estudios recientes en su versión no automatizada, esta prueba ha resultado tener una sensibilidad del 66-82% y especificidades del 99-100% en muestras respiratorias. Los valores predictivos positivos y negativos oscilan entre 91-100% y 97-98%, respectivamente. En estudios preliminares de evaluación en muestras clínicas diferentes a las respiratorias, el sistema Amplicor TB® tiene una eficacia mucho menor. Los inhibidores de la ADN polimerasa presentes en algunas muestras clínicas pueden ser causa de falsos negativos.

Dentro de lo que se han dado en llamar técnicas de amplificación de segunda generación, el sistema Gen-Probe Amplified MTD® (Gen-Probe, Inc., USA), diseñado inicialmente también para trabajar con muestras respiratorias, se ha adaptado recientemente para ser utilizado en líquidos estériles, aspirados gástricos, orinas, sangre y otras muestras clínicas. De los sistemas actualmente comercializados, es el que ha sido más evaluado y del que se dispone de mayor experiencia clínica. En el sistema Gen-Probe Amplified MTD® se amplifica ARNr 23S mediante la síntesis de cADN y ARN, utilizando una mezcla enzimática compuesta principalmente por transcriptasa inversa y ARN polimerasa. La utilización de una diana de amplificación particularmente abundante como es el rARN aumenta el rendimiento del proceso de amplificación de los ácidos nucleicos y los hace resistentes a la amplificación de errores de transcripción que pueden tener lugar en los primeros ciclos de amplificación. La utilización de ARN, mucho más lábil que el ADN, y un único tubo de reacción para cada muestra durante todo el proceso, previene el riesgo de contaminación por amplicones. Este proceso de amplificación isotérmico y autocatalítico permite amplificaciones del orden de millones de veces en una incubación de 2h a 42 °C. La detección de las secuencias diana en los amplicones tiene lugar mediante una sonda específica de ADN marcada con éster de acridina quimioluminiscente. Un proceso químico selectivo, Prueba de Protección de la Hibridación (HPA), permite distinguir las sondas hibridadas sin uti-

lizar complejos métodos físicos de separación. El resultado final es una prueba de sensibilidad superior al cultivo y exquisita especificidad, que no requiere instalaciones o instrumentación sofisticada y que puede llevarse a cabo en la rutina de la mayoría de laboratorios clínicos, permitiendo la realización de 50 muestras clínicas en menos de 5 horas. Debido a que la presencia de rARN en las células se cuenta por miles de copias, la probabilidad de iniciar una amplificación correcta es mucho más elevada que en aquellas pruebas en las que se utiliza como diana una o escasas copias de ADN. En la práctica, los principales inconvenientes de esta técnica son la posibilidad real de contaminación por amplicones por defectos de manipulación y que aún no disponemos de ellas en su versión completamente automatizada.

Los progresos en este campo han sido espectaculares en los últimos años y están a punto de introducirse en el mercado nuevos sistemas de amplificación de segunda generación: Q β replicasa (Galileo-Probe Amplification[®], Gene-Trak), Nasba[®] Amplification System (Organon Teknika N.Y.), Strand Displacement Amplification[®] (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems), etc. Todos estos nuevos sistemas, y otros que seguramente se irán introduciendo en los próximos años, pueden incluso superar la eficacia diagnóstica de los sistemas actualmente comercializados.

En nuestra opinión, el futuro inmediato en este campo va a depender de que las grandes compañías mundiales líderes del sector, que disponen de excelentes equipos de investigación, sean capaces de poner en nuestras manos una técnica de amplificación automatizada de alto rendimiento, totalmente automatizada, que sea capaz de detectar simultáneamente *M. tuberculosis* y los principales patógenos respiratorios en la misma muestra clínica y que pueda ofrecerse a un coste relativamente moderado.

Técnicas microbiológicas como ayuda en la epidemiología de la tuberculosis^{61,62}. Tradicionalmente el estudio de la epidemiología de la tuberculosis se ha visto dificultado por la ausencia de marcadores de cepa adecuados. Así, el único marcador utilizado hasta fechas recientes, el estudio de la susceptibilidad a micobacteriófagos, presenta limitaciones importantes derivadas de su bajo poder discriminativo. En la actualidad, la aplicación a la epidemiología de las técnicas moleculares permite establecer con precisión las cepas circulantes en una población. Se han utilizado la macrorrestricción genómica seguida de electroforesis con alternancia de campos, los patrones de restricción-hibridación con sondas complementarias de secuencias repetidas en el genoma de *M. tuberculosis* o el polimorfismo de amplificados por PCR.

De todos estos marcadores el más utilizado, por su gran poder discriminativo, ha sido el estudio del polimorfismo de restricción-hibridación utilizando la secuencia de inserción IS6110. Existe un protocolo estandarizado que permite comparar los resultados entre distintos laboratorios y establecer bancos de datos a gran escala. Este marcador puede utilizarse para: a) Co-

nocer el patrón epidemiológico general en una población; b) en el control de epidemias; c) en la diferenciación de las recidivas de las reinfecciones exógenas, y d) en el estudio de contaminaciones cruzadas en el laboratorio.

El genoma de *M. tuberculosis* contiene, en general, un elevado número de copias de IS6110, entre 5 y 20, localizadas en posiciones variables a lo largo del cromosoma debido a su capacidad de transposición. Por ello, las cepas no relacionadas epidemiológicamente presentan patrones de restricción-hibridación propios y, por lo tanto, un elevado grado de polimorfismo. Contrariamente, las cepas relacionadas muestran patrones idénticos, pudiendo establecerse fácilmente una relación de clonalidad. No ocurre lo mismo en el caso de cepas sin ninguna copia de IS6110 en su cromosoma o con un número muy reducido de copias integradas, normalmente, en posiciones constantes. En estos casos es necesario diferenciar las cepas no relacionadas epidemiológicamente mediante otros marcadores moleculares que ofrezcan un mayor grado de polimorfismo.

Diagnóstico anatomopatológico

En algunas ocasiones la TB se diagnostica por la existencia de granulomas tuberculosos en especímenes obtenidos mediante diversas técnicas de biopsia de órganos (bronquial, pulmonar transbronquial, pulmonar por toracotomía, hepática, ganglionar, de médula ósea, etc.). En general se trata de casos de difícil interpretación con bacteriología repetidamente negativa (diseminaciones hematógenas, localizaciones extrapulmonares), o ante la sospecha de enfermedad neoplásica, de manera que el diagnóstico puede ser una sorpresa para el clínico; por ejemplo, un nódulo pulmonar solitario que resulta ser un tuberculoma⁶³.

El diagnóstico se basa en la observación de granulomas caseificantes. Sin embargo, conviene tener en cuenta que otras enfermedades pueden producir granulomas muy similares y que en los enfermos con sida es muy raro que se forme la lesión citogranulomatosa típica por el profundo trastorno inmunitario⁶⁴. Por regla general, el anatomopatólogo practica tinciones para identificar bacilos ácido-alcohol resistentes (tinción de Kinyoun) cuando observa granulomas en el examen histológico, pero, como no es un método de absoluta fiabilidad, siempre que se sospeche TB deberá enviarse una muestra de la biopsia al laboratorio de microbiología para realizar técnicas de cultivo.

Otras técnicas diagnósticas

Por su importancia hay que destacar los estudios llevados a cabo sobre el líquido pleural y demás serosas de los pacientes afectados de TB de estas localizaciones. Muchas de estas determinaciones son sólo orientativas, por lo que, a no ser que tengamos una baciloscopia positiva del esputo o del líquido pleural, para llegar al diagnóstico de TB pleural se necesitará recurrir a la realización de biopsia pleural. Las muestras obtenidas por esta técnica siempre deben ser procesadas para ba-

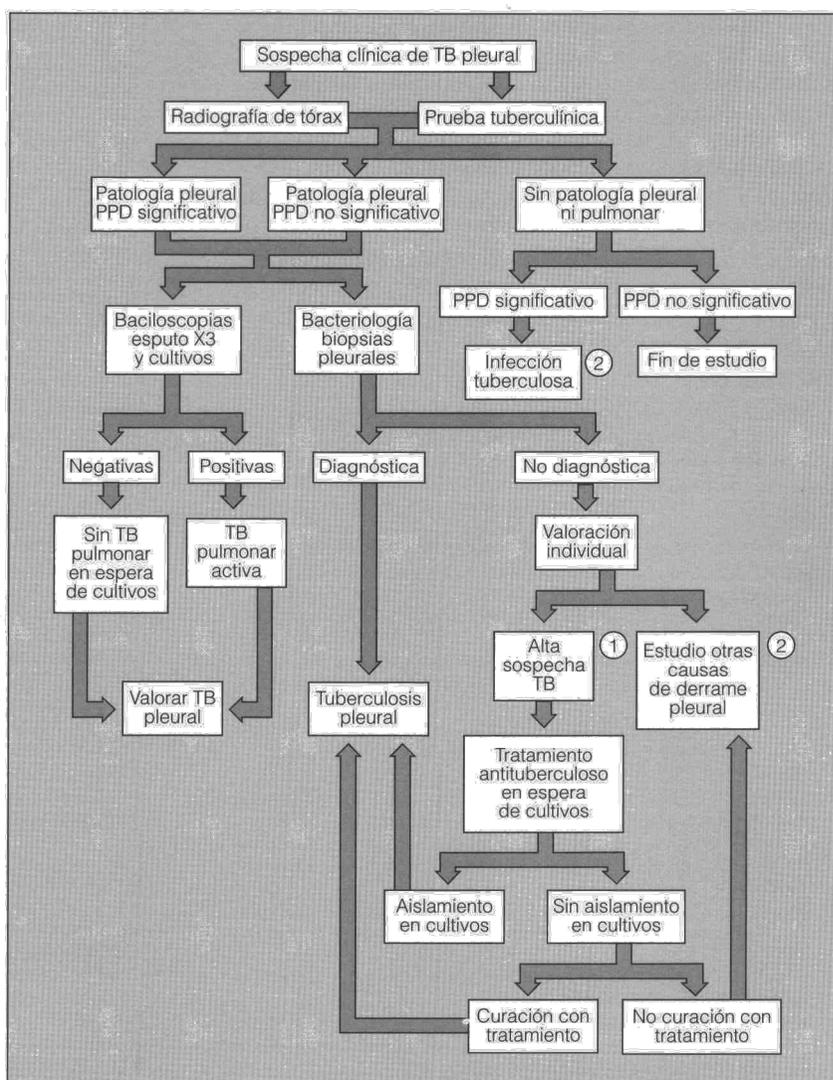


Fig. 3. Patrones de decisión ante una sospecha clínica de tuberculosis pleural.

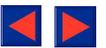
cioscopia, cultivo y estudio anatomopatológico. Los patrones de decisión ante una sospecha clínica de TB pleural se detallan en la figura 3.

El líquido de la afección de las serosas por la TB es un exudado con concentración elevada de proteínas y con una glucosa generalmente superior a 60 mg/dl (3,3 mmol/l). Las concentraciones bajas de glucosa se asocian a empiema concomitante, retraso en el diagnóstico o enfermedad avanzada con fibrosis pleural y paquipleuritis. El pH es generalmente ácido y el recuento total de leucocitos suele ser inferior a 5.000/l, siendo típico que más del 50% de éstos sean linfocitos maduros, aunque los polimorfonucleares pueden predominar en la primera fase de esta afección. Por su parte, las células mesoteliales son escasas y generalmente hay menos de 10 por cada 1.000 leucocitos. Esta ausencia de células mesoteliales se ha atribuido a la capa fibrinosa que cubre la superficie pleural y que impide que estas células se descamen⁶⁵.

La determinación en líquido pleural y demás serosas de la adenosina desaminasa (ADA) se ha mostrado muy eficaz en el diagnóstico de la TB pleural en los últimos años. Esta enzima, que interviene en el catabolismo de las purinas y cuya principal actividad fisiológica ocurre en el tejido linfoide, ha aportado una elevada sensibilidad y especificidad^{66,67}, con algunos falsos positivos en derrames metaneumónicos, empiemas, artritis reumatoide, lupus eritematoso, linfomas y mesoteliomas.

Otra prueba que se ha mostrado útil en el estudio de la TB pleural ha sido la determinación de lisozima (muramidasa) en el líquido, y sobre todo, el cociente de éste con el valor de la lisozima en suero. Así, un cociente superior a 1,2 posee también una excelente sensibilidad y especificidad, con algunos falsos positivos en el caso de empiemas y artritis reumatoide^{68,69}.

Como en el líquido pleural tuberculoso, la proporción y el número absoluto de los linfocitos T están notablemente aumentados con respecto a los que existen en

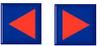


sangre; las linfocinas que éstos son capaces de producir también están incrementadas. Una de estas linfocinas, el interferón, se ha mostrado también como un parámetro útil en el diagnóstico de la TB pleural⁷⁰.

Por último, se ha demostrado que algunos marcadores tumorales como el IAP (*immunosuppressive acid protein*) y el AGP (*alpha₁-acid glycoprotein*) han dado concentraciones significativamente superiores en el líquido pleural tuberculoso que en las pleuresías neoplásicas⁷¹.

BIBLIOGRAFÍA

- Murray JF. Un programa mundial contra la tuberculosis emerge: agenda de investigaciones, incluyendo el impacto de la infección VIH. *Bol Union Int Tuberc Enf Resp* 1991; 66: 229-231.
- Timpe A, Runyon EH. The relationship of "atypical" acid-fast bacteria to human disease. A preliminary report. *J Lab Clin Med* 1954; 44: 202-209.
- O'Brien RJ, Geiter LJ, Snider DE. The epidemiology of nontuberculous mycobacterial diseases in the United States. Results from a national survey. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 1.007-1.014.
- Grupo de Trabajo Tuberculosis e Infecciones Respiratorias (TIR) de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica. Epidemiología de la tuberculosis en España. Resultados de las encuestas realizadas por el Grupo TIR en 1988. *Arch Bronconeumol* 1991; 27: 202-209.
- Caminero JA, Díaz F, Rodríguez de Castro F, et al. Epidemiología de la enfermedad tuberculosa en la isla de Gran Canaria. *Med Clin (Barc)* 1991; 87: 8-13.
- Hopewell PC. Mycobacterial diseases. En: *Textbook of Respiratory Medicine*. Murray/Nadal, eds. Filadelfia: Saunders, 1988.
- Bass JB, Farer LS, Hopewell PC, Jacobs RF, Snider DE. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 725-745.
- Ryley RL, Mills CC, O'Grady F, Sultan LU, Wittsadt F, Shivpuri DN. Infectiousness of air tuberculosis ward. *Am Rev Respir Dis* 1962; 85: 511-525.
- Clancy L. Transmisibilidad de la tuberculosis. *Bol Un Intern Tuberc Enf Resp* 1990; 65: 77-78.
- Hobby GL, Holman AP, Iseman MD, Jones JM. Enumeration of tubercle bacilli in sputum of patients with pulmonary tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1973; 4: 94-104.
- American Thoracic Society/Centers for Disease Control. Control of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1983; 94: 553-568.
- American Thoracic Society. Mycobacterioses and the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 492-496.
- American Thoracic Society. Diagnosis and Treatment of disease caused by nontuberculous Mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 940-953.
- American Thoracic Society. The Tuberculin Skin Test. *Am Rev Respir Dis* 1981; 124: 356-364.
- American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. Tuberculin Skin Test. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 723-735.
- Grupo de Trabajo sobre Tuberculosis. Consenso Nacional para el control de la tuberculosis en España. *Med Clin (Barc)* 1992; 98: 24-31.
- De March P, Espinar A, Gatón A, Pina JM, Rey R, Vidal R. Quimioprofilaxis antituberculosa. Recomendaciones SEPAR. *Arch Bronconeumol* 1992; 28: 270-278.
- Sbarbaro JA. Skin test antigens: an evaluation whose time has come. *Am Rev Respir Dis* 1978; 118: 1-7.
- Edwards PQ, Edwards LB. Story of the tuberculin test from an epidemiologic view point. *Am Rev Respir Dis* 1960; 80 (Supl. 1): 47.
- De March Ayuela P. Situación actual de la tuberculosis en España. *Med Clin (Barc)* 1991; 97: 463-472.
- Menzies R, Vissandjee B. Effect of bacille Calmette-Guérin vaccination on tuberculin reactivity. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 621-625.
- Sander DE. Bacille Calmette-Guérin Vaccinations and Tuberculin Skin Test. *Jama* 1985; 253: 3.438-3.439.
- Maxwell Caplin. The tuberculin test in clinical practice. London: Bailliere Tindall, 1980; 46-51.
- Loedi GM, Retchman LB. Tuberculin Skin Testing. En: *Tuberculosis*. Schlossberg D, ed., New York: Springer-Verlag, 1.488: 33-38.
- Anónimo. Smear-Negative Pulmonary Tuberculosis. *Tubercle* 1980; 61: 113-115.
- Hong Kong Chest Service. Tuberculosis Research Centre Madras and British Medical Research Council. A controlled trial of 2 month, 3 month and 12 month regimens of chemotherapy of sputum-smear-negative pulmonary tuberculosis. Results at 60 months. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 23-28.
- Khan MA, Kornat DM, Bachus B et al. Clinical and Roentgenographic spectrum of pulmonary tuberculosis in the adult. *Am J Med* 1977; 62: 31-38.
- Chaisson RE, Sloutkin G. Tuberculosis and human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1989; 159: 96-100.
- Vidal Pla R, De Gracia Roldán X, Arribas AJ. Tuberculosis en la infección por VIH: patogenia, clínica y diagnóstico. *Arch Bronconeumol* 1992; 28: 39-44.
- Sauret Valet J, Hernández Flix S. Enfermedades por micobacterias. En: *Neumología*. Benlloch E, ed. Madrid: SANED 1992; 167-200.
- Rieder HL, Snider DE, Cauthen GM. Extrapulmonary tuberculosis in the United States. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 347-351.
- American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 725-735.
- López Facal P. Técnicas de imagen en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. En: *Tuberculosis*. Caminero Luna JA, ed. Madrid: Gráficas Letra S.A. 1992; 87-104.
- Fletcher R, Fletcher SW, Wagner EH. Epidemiología clínica. Barcelona: Ed. Consulta, 1989; 41-74.
- Stead WW, Dit AR. Epidemiology and host factors. En: *tuberculosis*. Schlossberg D, ed. Nueva York: Springer Verlag, 1988: 1-13.
- Comstock GW, Livesay VT, Woolpert SF. The prognosis of a positive tuberculin reaction in childhood and adolescents. *Am J Epidemiol* 1974; 99: 131-138.
- Stead W, Lofgren JP. Medical perspective does the risk of tuberculosis increase in old age? *J Infect Dis* 1983; 147: 951-955.
- Casal M. Mycobacterium tuberculosis. En: *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Perea E, ed. Barcelona: Ediciones Doyma, 1992; 754-766.
- Jenkins PA, Casal M, David H et al. Diagnostic and public health mycobacteriology. London: Bureau of Hygiene and Tropical Diseases, 1991.
- Roberts GD, Koneman EW, Kim YK. Mycobacterium. En: *Manual of Clinical Microbiology*, Balows A, ed. Washington DC: American Society of Microbiology, 1991; 304-339.
- Casal M. Microbiología clínica de las enfermedades por micobacterias. Córdoba: Edit. Universidad de Córdoba, 1991.
- Wayne LG, Sramek HA. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clin Microbiol Rev* 5: 1-25.
- Ausina V. Actualidad de la tuberculosis. Una visión crítica de las nuevas técnicas diagnósticas. *Enf Infec Microbiol Clin* 1992; 10: 249-254.
- Casal M. Sistema radiométrico semiautomático (BACTEC 460 TB) para microbiología clínica de tuberculosis y micobacteriosis. *Enf Inf Microbiol Clin* 1987; 5: 46-51.
- Casal M, Gutiérrez J, Ruiz P, Font P. Evaluación preliminar de un nuevo sistema de cultivo bifásico (MB-Check®) para el aislamiento de micobacterias. *Rev Esp Microbiol Clin* 1989; 715-717.
- Kiehn TE, Cammarata R. Comparative recoveries of *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* from Isolator lysis-centrifugation and BACTEC 13A blood culture systems. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 760-761.
- Kiehn TE, Gold JWM, Brannon P, Timberger RJ, Armstrong D. *Mycobacterium tuberculosis* bacteremia detected by the Isolator lysis-centrifugation blood culture system. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 647-648.
- Jackson K, Sievers A, Dwyer B. Effect of agitation of BACTEC 13A blood cultures on recovery of *Mycobacterium avium* complex. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1.801-1.803.



49. Luquin M, Ausina V, López F et al. Evaluation of practical chromatographic procedures for identification of clinical isolates of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 120-130.
50. Peterson EM, Lu R, Floyd C, Nakasone A, Friedly G, De la Maza L. Direct identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* from amplified primary cultures in BACTEC media using DNA probes. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1.543-1.547.
51. Goto M, Shmichi O, Okuzumi K, Kimura S, Shimada K. Evaluation of acridinium-ester-labeled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium intracellulare* complex in culture. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2.473-2.476.
52. Papa F, Lazslo A, David HL, Daffé M. Serological specificity of *Mycobacterium tuberculosis* glycolipids. *Acta Leprol* 1989; 7 (Supl. 1): 98-101.
53. Caminero JA, Rodríguez de Castro F, Carrillo T, Díaz F, Rodríguez JC, Cabrera P. Diagnosis of pleural tuberculosis by detection of specific IgG anti antigen 60 in serum and pleural fluid. *Respiration* 1993; 60: 58-62.
54. Charpin D, Herbault H, Gerandan M. Value of ELISA using A60 antigens in the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 380-384.
55. Casal M, Solís F, Linares MJ, Arias MC, Redondo J, Puig C. The use of ELISA with antigen 60 in a serological study of human tuberculosis. *Eur J Med* 1993; 2: 318.
56. Ausina V, Luquin M. Diagnóstico de la tuberculosis por serología: situación actual y perspectivas futuras. *Arch Bronconeumol* 1990; 26: 166-171.
57. Caminero JA. Diagnóstico serológico de la tuberculosis y otras micobacteriosis. *Med Clin (Barc)* 1990; 94: 187-195.
58. Pao CC, Yen TSB, You JB, Maa JS, Fiss EM, Chang CH. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1.877-1.880.
59. Thierry D, Brisson-Noël A, Lévy-Frébault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *M. tuberculosis* insertion sequence IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2.673-2.688.
60. Hermans PWM, Schuitema ARL, Van Soolingen D et al. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1.204-1.213.
61. Ross BC, Raios K, Jackson K et al. Identification of genetically distinct subspecies of *Mycobacterium kansasii*. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2.930-2.933.
62. Ross BC, Raios K, Jackson K et al. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as epidemiological tool. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 942-946.
63. Sauret J, Peralta E, León C et al. Biopsia pulmonar en el diagnóstico de la tuberculosis. *Med Clin (Barc)* 1986; 86: 215.
64. Thenor CP, Hoppewell PC, Elías D et al. Human immunodeficiency virus infection in tuberculosis patients. *J Infect Dis* 1990; 162: 8-12.
65. Caminero JA. Tuberculosis pleural. *Med Clin (Barc)* 1990; 94: 384-388.
66. Ocaña J, Martínez-Vázquez JM, Segura RM, Fernández de Sevilla T, Capdevila JA. Adenosine deaminase in pleural fluids. Test for diagnosis of tuberculous pleural effusions. *Chest* 1983; 84: 51-53.
67. Martínez JM, Ocaña K. Eficacia diagnóstica de la adenosina deaminasa (ADA) en las serositis tuberculosas. *Enf Infec Microbiol Clin* 1989; 7: 72-77.
68. Vereá HR, Masa JF, Domínguez L, Pérez J, Martín MT, Fontán MD. Meaning and diagnosis value of determining the lysozyme level of pleural fluid. *Chest* 1987; 91: 342-345.
69. Petterson T, Klockars M, Hellstron PE, Froseth M. Lysozyme in pleural effusions. *Chest* 1988; 92: 220-221.
70. Shimokata K, Kawachi H, Kishimoto H, Maeda F, Ito Y. Local cellular immunity in tuberculosis pleurisy. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126: 822-824.
71. Niwa Y, Kishimoto H, Shimokata K. Carcinomatous and tuberculous pleural effusions. Comparisons of tumors markers. *Chest* 1985; 87: 351-355.