

Sensibilidad de los métodos baciloscopia, cultivo y ELISA para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar, en pacientes del Edo. Vargas- Venezuela

Sensitivity of Bacilloscopy, Culture and ELISA Methods to Diagnose Lung Tuberculosis, in Patients From Vargas State-Venezuela

Betancourt, J.¹; Ruiz, N.²; Cruces, P.² y Velásquez, W.³

¹Profesor ordinario de la cátedra de Bacteriología Clínica de la Escuela de Ciencias, Departamento de Bioanálisis UDO.
e-mail: jbetancourt@raudo.udo.edu.ve.
Teléfonos: 0293-4672915- 0414-3937156. ²Licenciados en Bioanálisis.
³Profesor ordinario de la cátedra de Fisiología de la UDO, Núcleo de Sucre.

Resumen

Con el objetivo de evaluar la sensibilidad en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar, a través de los métodos baciloscopia, cultivo y ELISA en pacientes sintomáticos respiratorios que acudieron a la consulta de Neumonología del Distrito Sanitario n° 6, La Guaira, estado Vargas, se llevo a cabo el presente estudio. Para tal fin, se realizaron dos extendidos de muestras de esputo, los cuales fueron coloreados por el método de Ziehl-Neelsen (Baciloscopia). Cada muestra se sembró utilizando el método propuesto por Ogawa-Kudoh. De los pacientes con muestras de esputo positiva por baciloscopia y cultivo se le tomó una muestra sanguínea para determinar anticuerpos contra *M. tuberculosis*. De las 200 muestras analizadas para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar, 20 (10,0%) resultaron positivas por el método de cultivo, sólo 11 (5,5%) resultaron sueros positivos por el método de ELISA. El cultivo, baciloscopia y ELISA presentaron una sensibilidad de 100, 65 y 55%, respectivamente. Los resultados obtenidos sugieren que el método de cultivo por Ogawa-Kudoh, es mucho más sensible; por lo tanto, este método proporciona resultados más confiables y precisos, especialmente en muestras con baja densidad de bacilos.

Palabras clave: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, sensitivity, bacilloscopy, culture, ELISA.

Recibido: 28-05-02 / Aceptado: 29-07-02

Abstract

This research was conducted with the objective of evaluating sensitivity in diagnosing lung tuberculosis, through bacilloscopy, culture and ELISA methods in respiratory symptomatic patients who attended the Neumonology Consultation Department from Sanitary District N° 6, La Guaira, Vargas State-Venezuela. To achieve this, two extended sputum samples were carried out, which were stained by the Ziehl-Neelsen method (Bacilloscopy). Each sample was sown using the method proposed by Ogawa- Kudoh. A blood sample was taken from the patients with positive sputum samples by bacilloscopy and culture methods to detect antibodies for *M. tuberculosis*. Out of the 200 samples analyzed to diagnose lung tuberculosis, 20 (10,0%) proved positive through the culture method, and only 11 (5,5%) were serum-positive by the ELISA method. The culture, bacilloscopy, and ELISA methods showed a sensitivity of 100, 65 and 55 % respectively. These results suggest that the Ogawa-Kudoh culture method is much more sensitive; therefore, this method gives more reliable and accurate results, especially in samples with low bacillus density.

Key words: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, sensitivity, bacilloscopy, culture, ELISA.

Introducción

Joklik y Col (11) describe a la tuberculosis como una enfermedad infectocontagiosa de origen bacteriano, conocida desde la antigüedad en esqueletos procedentes de la edad de piedra y en los huesos de las primeras momias egipcias, en 1882, Robert Koch reportó el aislamiento del bacilo responsable de la enfermedad, al cual llamó bacilo de la tuberculosis.

La bacteria que produce la enfermedad pertenece al género *Mycobacterium*, y se han descrito hasta 50 especies, entre las que se encuentran las micobacterias no patógenas y las patógenas como *Mycobacterium tuberculosis* y *M. bovis* (14).

M. tuberculosis es un bacilo ácido alcohol resistente que mide de 3 a 6 µm de largo y 0.3 a 0,6 µm de ancho. Son aerobios estrictos, inmóviles, no capsulados y no esporulados, lo cual se localiza preferentemente en las porciones subapicales del pulmón (24).

La tuberculosis pulmonar se adquiere por vía aérea a partir de una persona enferma que expulsa bacilos al toser, estornudar o hablar (25). Desde el punto de vista clínico la

sintomatología de la tuberculosis, se caracteriza por un comienzo lento, es frecuente encontrar debilidad, pérdida de peso, fiebre, sudoración nocturna, cefalea y tos persistente (14, 23).

Usualmente en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar las muestras más utilizadas son: esputos, lavados bronquiales, lavados bronquioalveolares, etc., las cuales presentan flora bacteriana asociada y para ello se necesita de un método de descontaminación que permita el aislamiento del bacilo tuberculoso (1, 16).

En Venezuela, la prueba diagnóstica más utilizada para confirmar la tuberculosis es el examen directo de la muestra de esputo, coloreada por el método de Ziehl-Neelsen (baciloscopia), que permite visualizar el agente debido a la ácido resistencia de las micobacterias (24). La especificidad de la baciloscopia es muy alta, pero su sensibilidad es baja en comparación con el método de cultivo (2, 3).

El diagnóstico definitivo de la tuberculosis se hace demostrando en el cultivo, la presencia de *M. tuberculosis* seguido de una identificación bioquímica. Los cultivos au-

mentan el número de nuevos pacientes diagnosticados, siendo éstos los más sensibles y específicos de todos los métodos que se conocen en la actualidad para detectar micobacterias; en general se diagnostica hasta un 30% más muestras positivas (9, 20, 25).

Actualmente, se ha desarrollado un excelente medio de cultivo llamado "Ogawa-Kudoh", el cual por ser más sencillo, menos costoso y no requerir centrifugación, puede ser implementado en cualquier laboratorio de bacteriología y en el trabajo de campo, por otra parte, posee menos etapas, lo que se traduce en una menor manipulación de las muestras y disminución del riesgo para la persona que realiza la siembra. El cultivo por "Ogawa-Kudoh", se utiliza extensamente en el Japón, el sudeste de Asia y en Colombia, aportando resultados similares a los obtenidos a través del método de Petroff con el medio de Lowestein-Jensen (26).

Según Jawetz y col. (10), el serodiagnóstico de las enfermedades bacterianas es de valor sólo en circunstancias específicas. La presencia de anticuerpos para *M. tuberculosis* puede determinarse por numerosas pruebas serológicas. La inmunidad contra infecciones por micobacterias es extremadamente compleja debido a la diversidad de factores de virulencia utilizados por dicha bacteria para su subsistencia.

Tomando en consideración que la mejor forma de prevenir la tuberculosis es interrumpir la transmisión del microorganismo mediante el diagnóstico precoz del paciente infectado, el presente estudio tiene como finalidad principal evaluar la sensibilidad en el diagnóstico de la tuberculosis, a través de los métodos baciloscopia, cultivo y ELISA, en pacientes con sintomatología respiratoria del estado Vargas.

Materiales y Métodos

Población

En la presente investigación, la población estuvo conformada por 200 individuos de ambos sexos, mayores de 15 años, que acudieron a la consulta de Neumonología del distrito sanitario n° 6 de La Guaira, estado Vargas, durante el lapso comprendido entre Febrero y Mayo de 2001. Estos individuos presentaban sintomatología respiratoria (tos durante dos o más semanas de evolución).

Recolección de las muestras

Se recolectaron dos muestras seriadas de esputo de cada uno de los 200 individuos en estudio y 20 muestras de sangre de aquellos pacientes con BK y cultivos positivos. Las muestras de esputo fueron obtenidas para cada paciente, a través de una expectoración profunda en la mañana y depositadas en un envase completamente estéril.

Las muestras de sangre fueron obtenidas asépticamente por punción venosa a nivel de la vena del pliegue del codo, utilizando una inyectora de 10 ml con aguja N° 21 x 1,5. De estas muestras, se tomaron 5 ml y se colocaron en tubos de ensayo sin anticoagulante para posteriormente separar el suero del paquete globular por centrifugación (13). Los sueros obtenidos fueron trasladados en una cava con hielo al laboratorio de tuberculosis del instituto de Biomedicina, Caracas, donde fueron congelados hasta el momento de su procesamiento.

Preparación del extendido

Una vez obtenidas las muestras de esputo, se procedió a realizar el frotis respectivo y a colorearlas utilizando el método de Zielh-Neelsen (8, 12).

Cultivo de la muestra

El cultivo de los esputos se realizó por el método de Ogawa-Kudoh, el cual consiste en homogenizar la muestra para luego tomar la partícula útil con un hisopo estéril, introduciéndolo posteriormente en un tubo de ensayo con hidróxido de sodio (NaOH) al 4% durante 2 minutos para eliminar la flora acompañante. Posteriormente se retiró el hisopo y se sembró en dos tubos con medio de Ogawa-Kudoh previamente rotulados, ejerciendo movimiento de presión y rotación. Luego se incubaron en una estufa a 37°C en aerobiosis, durante 48 horas. Posteriormente, se revisaron los tubos para verificar la evaporación del líquido, se ajustaron las tapas y se realizaron las revisiones pertinentes a los 8, 15 y 45 días hasta la observación macroscópica de las colonias. Se consideraron negativas aquellos cultivos que después de 45 días de incubación no presentaron crecimiento.

Para la identificación de *M. tuberculosis* se utilizaron como pruebas bioquímicas: la determinación de niacina, reducción de nitratos y la producción de la enzima catalasa.

Serodiagnóstico

Para la determinación de los anticuerpos contra *M. tuberculosis* se utilizó la técnica de inmunoensayo enzimático ELISA (5) a través del Kit Pathozime-TB complex Plus (Omega Diagnostic LTD). Esta se fundamenta en que los anticuerpos IgG presentes en el suero se unen a los antígenos (proteínas recombinantes de 16 y 38 kDa) adherido a la superficie de los pozos. Al adicionar un anticuerpo anti IgG marcado con una enzima conjugada (peróxidasa de rábano picante), se forma un complejo antígeno-anticuerpo-antianticuerpo, la cual se le adicionó un sustrato que es específico para la enzima. La reacción es detenida con ácido sulfúrico, produciéndose un color amarillo si la muestra contiene los anticuerpos.

Análisis de datos

Para evaluar la sensibilidad de los tres métodos utilizados para el diagnóstico de la tuberculosis se aplicó el método descrito por Pozo (19). Para comparar los resultados obtenidos de cada uno de los métodos en diagnóstico de tuberculosis se aplicó la prueba de Chi-Cuadrado a un nivel mínimo de confiabilidad del 95 % descrito por Sokal y Rohlf (22).

Resultados

La Tabla 1, indica la distribución porcentual de casos positivos según los métodos Baciloscopia, cultivo y ELISA en pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar. El mayor porcentaje de casos se ubicó en el cultivo con un 10,0% (20/200), seguido de la Baciloscopia con un 6,5 % (13/200).

La Tabla 2, señala los resultados de la distribución de casos positivos y negativos según la baciloscopia en relación al cultivo, en pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar, se observa asociación altamente significativa ($\chi^2 = 114,7^{***}$, $p < 0,001$) entre ambos parámetros evaluados.

Los resultados mostrados en la Tabla 3 indican una asociación no significativa ($\chi^2 = 2,00$ ns, $p > 0,05$) entre el método de ELISA y las Baciloscopia positivas y negativas en pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar.

La Tabla 4, muestra la comparación de la sensibilidad entre los métodos Baciloscopia y ELISA en relación al cultivo de todos aquellos pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar, observándose una mayor sensibilidad en el cultivo. Al aplicar la prueba de Chi Cuadrado, se observó una asociación altamente significativa ($\chi^2 = 177,5^{***}$; $p < 0,001$) entre la sensibilidad del cultivo con respecto a los métodos baciloscopia y ELISA.

Tabla 1 Distribución porcentual de casos positivos según los métodos de Baciloscopia, Cultivo y ELISA en pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar, de La Guaira, Edo. Vargas, Venezuela. 2001

Métodos	Nº de Casos (Total)	Porcentaje (%)
Cultivo	20 (200)	10,0
Baciloscopia	13(200)	6.5
ELISA	11(200)	5.5

F. De I.: Resultados Obtenidos de la consulta de Neumonología del Distrito Sanitario n° 6.

Tabla 3 Distribución de casos positivos y negativos según el método de ELISA en relación con las Baciloscopias positivas y negativas, en pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar de La Guaira, Edo. Vargas, Venezuela. 2001.

ELISA	BK(+)	BK(-)	Total
Positivo	7	4	11
Negativo	6	3	9

F. De I.: Resultados Obtenidos de la consulta de Neumonología del Distrito Sanitario n° 6.
 $\chi^2 = 2,00$ ns; $P > 0,05$

Discusión

En este estudio se observó que el cultivo detectó mayor número de casos positivos en relación a los métodos de baciloscopia y ELISA, hecho que pone de manifiesto que los cultivos siguen aumentando la positividad en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar.

La asociación obtenida entre los métodos baciloscopia y cultivo para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar fue altamente significativa hecho que concuerda con los reportados por algunos investigadores (7, 21). De los cultivos positivos, siete provenían de

Tabla 2 Distribución de casos positivos y negativos según la Baciloscopia en relación al cultivo en pacientes con diagnóstico pulmonar de la Guaira, Edo. Vargas, Venezuela. 2001.

Baciloscopia	Cultivo		Total
	Positivos	Negativos	
Positivos	13	0	13
Negativos	7	180	187

F. De I.: Resultados Obtenidos de la consulta de Neumonología del Distrito Sanitario n° 6.
 $\chi^2 = 114,7^{***}$; $P < 0,001$.

Tabla 4 Comparación de la sensibilidad de los métodos de Cultivo, Baciloscopia y ELISA en pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar, de La Guaira, Edo. Vargas, Venezuela. 2001

Metodo	Sensibilidad %
Cultivo	100
Baciloscopia	65
ELISA	55

F. De I.: Resultados Obtenidos de la consulta de Neumonología del Distrito Sanitario n° 6.
 $\chi^2 = 177,5^{***}$; $p < 0,001$

muestras con baciloscopia negativa, lo cual expresa la importancia de la confirmación bacteriológica por el cultivo para el diagnóstico de la tuberculosis.

La baciloscopia cumple el papel fundamental de detectar los casos bacilíferos, que son sin duda los más peligrosos como foco de infección, sin embargo, esto no significa que este examen microscópico sea el mejor método de diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis, ya que sólo cuando el número de bacilos alcanza a más de 10.000 por ml de expectoración, podríamos esperar que las baciloscopias, sean consistentemente positivas (15). También influyen en la positividad, las condiciones de conservación, el tiempo de

procesamiento y la calidad de las muestras de esputos (7).

El cultivo permite no sólo diagnosticar los casos de tuberculosis broncopulmonar, en los cuales el número de micobacterias eliminadas en las secreciones no es lo suficientemente alto como para ser puesto de manifiesto por una baciloscopia, sino también algunas formas extrapulmonares de la tuberculosis, donde constituye prácticamente el único método de diagnóstico bacteriológico. Además, es indispensable para determinar la susceptibilidad *in vitro* y la identificación bioquímica, que permiten diferenciar entre los bacilos tuberculosos y no tuberculosos (7, 17).

Al aplicar la prueba de Chi cuadrado (χ^2) entre los casos positivos y negativos según el método de ELISA en relación con las baciloscopias positivas y negativas en pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar, se observó que no hubo dependencia entre las variables estudiadas, hecho que concuerda con los expresados por (6) quienes estudiaron y evaluaron la tuberculosis pulmonar por técnicas convencionales e inmunoenzimáticas, y encontraron una asociación no significativa entre los métodos estudiados. Pudiendo deducirse que ambos métodos pueden emplearse simultáneamente en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar, siempre y cuando se tome en consideración la sensibilidad y el aspecto económico.

Una prueba de ELISA positiva, indica que el paciente presenta la enfermedad activa o existe una señal temprana de la misma, sin embargo, los ELISA negativos, pueden ser debido a que presentan un número limitado de bacilos que provocan una deficiente respuesta inmunitaria en estos pacientes, ya que es posible que estos individuos se encuentren en una etapa precoz de la enfermedad tuberculosa (13, 27).

Cuando se comparó la sensibilidad de los métodos de ELISA y baciloscopia se encontró una asociación altamente significativa entre ellos con respecto al diagnóstico de tuberculosis que fue confirmado por el método de cultivo, estos resultados concuerdan con otros estudios, donde se compararon la sensibilidad de varios métodos de ELISA usando pacientes con baciloscopias positivas y negativas, dando valores de sensibilidad mayor en las baciloscopias (18). No obstante, difiere con otros estudios realizados, donde señala que el método de ELISA es más sensible en el diagnóstico de la tuberculosis en comparación con las baciloscopias (4), esto pudo deberse a que la población estudiada por estos autores, correspondió a pacientes que en su mayoría estaban presuntamente diagnosticados y tal vez tratados terapéuticamente, es decir, eran pacientes sensibilizados inmunológicamente por el bacilo tuberculoso o quizás no han desarrollado cavidades pulmonares producto de la licuefacción del caseum, y al no ocurrir la destrucción del mismo, la eliminación de los bacilos hacia el exterior por medio de la expectoración, es poca, y por consiguiente son considerados pacientes pocos contagiosos y difícil de diagnosticar por baciloscopia, caso contrario de lo que sucede en el suero de un paciente sensibilizado por el bacilo de Koch, al emplear el método de ELISA.

Las baciloscopias de las muestras de esputo han sido adoptadas por la mayoría de los países en desarrollo como el examen bacteriológico básico empleado en salud pública, como procedimiento diagnóstico de elección en los enfermos sintomáticos respiratorios y como control del tratamiento de pacientes con tuberculosis por ser un método simple, rápido, específico, económico y de carácter semicuantitativo (7, 25).

La aplicación de la serología por ELISA permanece en principio, como un instrumen-

to para estudios epidemiológicos y para ser empleado en aquellos centros, donde se manejan grandes cantidades de muestras, más que para diagnóstico de casos de tuberculosis (3). Es por ello que el cultivo, sigue siendo el método más sensible en el diagnóstico de la TBC. Los cultivos permiten diagnosticar los casos en los que el número de micobacterias eliminadas no es lo suficientemente alto como para ser puesto de manifiesto por una baciloscopia (7).

Conclusiones

- El cultivo es el mejor método de diagnóstico de la tuberculosis pulmonar, debido a su sensibilidad.
- El estudio serológico por ELISA, empleado para el diagnóstico de la tuberculosis, no es un método útil para el diagnóstico presuntivo de este tipo de infección.
- El número de microorganismos excretados y la severidad de la enfermedad son importantes en la correlación de cultivos y extendidos positivos.

Recomendaciones

- Incrementar la integración del programa de tuberculosis al 100% de los establecimientos de Salud del Ministerio de Salud y Desarrollo Social.
- Habilitar el 100% de los laboratorios para hacer cultivo por Ogawa-Kudoh.
- Realizar cultivo a todos aquellos pacientes con baciloscopia negativa.
- Realizar el control de calidad a las tinciones empleadas por lo menos una vez a la semana.
- Crear un sistema que incluya trabajadores de salud y voluntarios capacitados para asegurar que los pacientes con tu-

berculosis terminen de percibir su medicación.

- El cultivo por Ogawa-Kudoh no sustituye al Lowestein-Jensen como herramienta para el diagnóstico de tuberculosis. Sino que es una alternativa principalmente en áreas rurales, alejadas de las grandes ciudades, que no cuentan con laboratorios bien dotados y las muestras clínicas deben ser transportadas desde lugares muy distantes.

Agradecimiento

A todos los integrantes del laboratorio de tuberculosis del Instituto de Biomedicina de Caracas, a los miembros de la Unidad de Neumonología del Distrito Sanitario n°6, La Guaira por la colaboración prestada.

Referencias Bibliográficas

- (1) Braselli, A. Tuberculosis, con especial referencia al paciente infectado por el VIH. 1999. Disponible en: <http://www.Infecto.edu.uy/español/revisión/tema1>.
- (2) Centro Panamericano de Zoonosis. Bacteriología de la Tuberculosis Humana y Animal. Rev. Panam. Salud Public. 1979; 6: 6-10.
- (3) Cocoyoa, L.; Oaxtepec, M. y Murelos, S. IV Seminario Regional de la Tuberculosis. Rev. Panam. Salud Public. 1988; 11: 16-20.
- (4) Chander, J.; Subrahmanyans, H. and Gupta, R. Sensitiviv of EIA in the diagnosis of tuberculosis using 38 Kda antigen. J. Indian. Med. Assoc. 1996; 94: 376- 378.
- (5) Cheesbrough, M. Mycobacteria. Manual for Tropical Countries. 1991; 44: 289- 311.
- (6) Deodhar, L.; Gogate, A.; Pahdi, R. and Desai, C. Standarition of dot blot immunoassay for antigen detection in cases of pulmonary tuberculosis and its evaluation with respect to the conventional techniques. J. Med. Rev. 1998; 108: 75- 79.

- (7) Flores, I.; Jaspe, G. y Rojas, Y. Evaluación del cultivo por método de Kudoh para su aplicación en el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Caracas. Universidad de Oriente. 2000: 48.
- (8) Gitui, W.; Kitui, F. and Juma, E. A comparative study on the reliability of fluorescence microscopy and Ziehl-Neelsen method in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. East. Afr. Med. J. 1993; 70: 253- 254.
- (9) Godoy, G. *Mycobacterium tuberculosis*, actualizaciones sobre su aislamiento y demostración temprana. Saber. 1996; 1: 78- 85.
- (10) Jawetz, E.; Melnick, J. and Adelberg, E. Microbiología Médica. México. Editorial “ El Manual Moderno”. 1992: 700.
- (11) Joklik, W.; Willet, H.; Amos, B. y Wilfert, C. Zinser Microbiología. Buenos Aires. Editorial Panamericana. 1994: 1696.
- (12) Koneman, C.; Graldo, B.; Naranja, N. y Camardo, D. Calidad de la Baciloscopia de Espudo en la Red de Laboratorios de Tuberculosis en Colombia. Bol. Ofic.. San. Pan. 1993; 115: 103- 109.
- (13) Krambovitis, E. Detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane antigen by enzyme linked immunosorbent assay. J. Med. Microbiology. 1986; 21: 257- 264.
- (14) Meléndez, A. Estudio comparativo entre la prueba simple a tuberculina y la prueba de interferón gamma, en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Tipificación de cepas de *M. bovis* por el Spolisotyping. Caracas-Venezuela. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. 1999: 100.
- (15) Morán, M.; Hernández, D.; Peña, P. y Gallejos, M. Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en una población seleccionada del Nor occidente de México. Rev. Panam. Salud Public. 2000; 75: 21- 23.
- (16) Niero, R. y Trujillo, L. Comparación entre los medios de Lowestein- Jensen y Ogawa en el cultivo de mycobacterias en secreciones pulmonares. Rev. Instituto de Investigaciones en Ciencias. 1995; 75: 21- 23.
- (17) Organización Panamericana de la Salud. El control de la Tuberculosis en las Americas. Rev. Panam. Salud Public. 1988; 19: 1- 8.
- (18) Pottumarthy, S.; Wells, V. and Morris, A. A comparison of seven test for serological diagnosis of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 2000; 28: 2227- 2231.
- (19) Pozo, R. La eficacia de la las pruebas diagnóstica. Med. Clin. 1988; 90: 779- 785.
- (20) Sánchez, J. Tuberculosis Pulmonar: Ayer, Hoy y Mañana. Galenes. 1997; 9: 9- 12.
- (21) Sierra, R.; Ortega; J.; Baena, J. y Ojeda, P. Tuberculosis endobronquial: experiencia en el Hospital Santa Clara de Bogotá. 1980- 1990. Neumonología. 1991; 3: 56- 61.
- (22) Sokal, R. y Rohlf, J. Biometría, principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. San Francisco, U.S.A. W. Freeman. 1979: 776.
- (23) Tuberculosis. 1996. Disponible en: <http://www.Medicinet.com/seript/main/art>.
- (24) Tuberculosis Miliar. 1999. Disponible en: <http://www.rd.yahoo.com/>.
- (25) Vásquez, F.; Guerra, D. y Brito, M. La tuberculosis pulmonar en el Hospital Dr. Domingo Guzmán Lander, Barcelona período, 1987- 1997. Tribuna Médica. 1999; 90: 32- 39.
- (26) Waard, J. Estudio de la sensibilidad del cultivo en el diagnóstico de la tuberculosis en Venezuela. Caracas-Venezuela. Instituto de Biomedicina. 1999: 32.
- (27) Young, D.; Kent, L.; Rees, A. and Jamb, J. Immunological activity of a 38 Kda protein purified from *Mycobacterium tuberculosis*. Infect and innum. 1986; 54: 177- 183.