

---

---

## **Estudio de la respuesta inmunitaria en niños Warao de comunidades con alta prevalencia de tuberculosis.**

*Nieves González<sup>1</sup>, Laura De Cubeddu<sup>1</sup>, Jacobus H. de Waard<sup>2</sup>, Cecil Fandiño<sup>3</sup>, Carlos Fernández de Larrea<sup>3</sup>, Diana López<sup>3</sup>, Aura Maldonado<sup>3</sup>, Yelka Ocaña<sup>3</sup>, Elisa Hernández<sup>3</sup>, Rhaxeda Ortega<sup>3</sup>, Jacinto Convit<sup>2</sup>, Flor H. Pujol<sup>4</sup>, Marianella Castés<sup>5</sup> y Zaida Araujo<sup>5</sup>.*

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunoematología, <sup>2</sup>Laboratorio de Tuberculosis, Instituto de Biomedicina, <sup>3</sup>Escuela de Medicina "José María Vargas". Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. <sup>4</sup>Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Microbiología y Biología Molecular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, (IVIC). <sup>5</sup>Cátedra de Inmunología, Escuela de Medicina "José María Vargas", Caracas, Venezuela.

**Palabras clave:** Warao, complemento, tuberculosis (TB), IgA, IgM, IgG, IgE, IgAs, PPD.

**Resumen.** En una población de niños Warao menores de 15 años con una tasa de prevalencia de tuberculosis (TBC) de 3190/100.000 se planteó como objetivo, estudiar ciertos parámetros de la respuesta inmunitaria en una población de 107 niños, de éstos, 32 presentaban TBC (27 PPD positivos y 5 PPD negativos) y 75 eran controles sin clínica de TBC (45 PPD positivos y 30 PPD negativos). Se evaluaron la inmunidad humoral, celular y algunos aspectos de la inmunidad innata. Entre los niños pacientes y controles, no se encontraron diferencias significativas en los componentes C3 y C4 del complemento. En cuanto a la inmunidad humoral, el grupo de pacientes presentó un alto porcentaje de niños con niveles totales de IgA e IgG elevados (13,8% y 79,3%, respectivamente) en comparación con los niños controles (0% y 69,2%). En el grupo control, un alto porcentaje de niños presentaron niveles totales de IgM e IgAs elevados (69,2% y 56,16%, respectivamente) en comparación con los pacientes (48,3% y 31,25%). El 100% de los niños presentó altos niveles séricos de IgE. Los estudios de la respuesta celular retardada mostraron que los niños de mayor edad presentaron las mayores medidas de induraciones. Los niños menores de 7 años presentaron similar reactividad positiva al PPD independientemente de la presencia o no de cicatriz de BCG. Un alto porcentaje de niños sin y con cicatriz (46,8% y 27,6% respectivamente) presentaron medidas de induraciones a la tuberculina de 0 mm. La reactividad a *Candida*

mostró un 80% de niños con estados de anergia no específica. Sin embargo, el mayor porcentaje de niños con TBC estaba vacunado y presentaba positividad a la prueba de tuberculina. En conclusión, en los niños Warao se observó un aumento en los niveles de los componentes C3 y C4 del complemento y una hipergammaglobulinemia. Los resultados de los isotipos mostraron que, la disminución de IgAs podría ser un marcador de enfermedad activa, mientras que el aumento de IgM un marcador de infección reciente. La policlonalidad fue independiente de la reactividad al PPD.

### **Study of the immune response in Warao children from an area with high prevalence of tuberculosis.**

*Invest Clín 2003; 44(4): 303 - 318*

**Key words:** Warao, complement, tuberculosis (TB), IgA, IgM, IgG, IgE, sIgA, PPD.

**Abstract.** The present study was carried out in a Warao childhood population with extremely high tuberculosis (TB) rate of 3190/100,000 in 0-15 years old children. One hundred seven serum and saliva samples were tested, 32 from patients with active TB (27 positive and 5 negative for the tuberculin skin test, TST) and 75 apparently healthy contact children (45 positive and 30 negative for the TST). The innate, immunoglobulin and cellular responses were studied. The results showed that both, patients and controls, had a high percentage of children with increased levels of complement C3 and C4 components. A high percentage of children with increased total serum IgA and IgG (13.8% and 79.3% respectively) was observed in children with TB in comparison to control children (0% and 69.2%). A high percentage of control children had increased levels of IgM and sIgA (69.2% and 56.16%, respectively) in comparison to patients (48.3% and 31.25%). Both groups showed children with increased levels of IgE. The results concerning to the cellular immune response to PPD and the BCG vaccination status showed that there was a correlation between an increase in PPD reactivity and age. The PPD reactivity in children less than 7 years old was similar and also independent of the BCG vaccination status. A significant number of children without or with scars (46.8% and 27.6%, respectively) showed induration values of 0 mm to tuberculin skin test. The *Candida* reactivity showed a high percentage of children (80%) with anergy status. In conclusion, an increase in the levels of complement components C3 and C4 and hypergammaglobulinemia was observed in Warao children, and these results were independent from PPD reactivity and BCG vaccination. The isotype results showed that the decrease in sIgA could be and active disease marker, while the increase in IgM levels could represent a marker of recent disease.

*Recibido: 29-10-2002. Aceptado: 27-05-2003*

## INTRODUCCIÓN

Los Warao constituyen el segundo grupo más numeroso entre los indígenas de Venezuela. (1, 2). De acuerdo al censo indígena venezolano del año 1992, el 85% de esta población vive en el Estado Delta Amacuro, distribuido en 250 comunidades, la mayoría de las cuales se encuentra en las riberas de los caños del Delta del río Orinoco. El aislamiento de esta población y su acceso por vía fluvial contribuyen a que los Warao vivan en precarias condiciones sanitarias, al no contar ni con agua potable ni con energía eléctrica, además de tener una inadecuada disposición de excretas. Adicionalmente, el ambiente de alta humedad en el que viven estas comunidades favorece que los Warao padezcan de muchas infecciones, algunas de las cuales han sido estudiadas como las micosis, parasitosis intestinales, desnutrición primaria, infecciones respiratorias agudas, anemia, y TBC (3-5). Dentro de esta problemática de salud, destaca por las altas tasas de morbi-mortalidad, tanto entre la población adulta como infantil, la TBC (6, 7). Para el año 1999, la tasa era de 93,2 por cada 100.000 habitantes, con 124 casos registrados. El 90% de los casos se presentó entre la población Warao, en donde la tasa llegó a ser de 450/100.000 (6). De los cuatro Municipios en los cuales está dividido el Estado Delta Amacuro, Antonio Díaz presenta la mayor tasa de prevalencia, encontrándose que en comunidades como San Francisco de Guayo y otras vecinas, con una población total de aproximadamente 2052 habitantes, de los 87 casos de tuberculosis activa diagnosticados entre los años 1999-2000, solamente 4 fueron niños, lo cual no se correlaciona con el hecho de que el 50% de la población Warao es menor de 15 años (6). Estos hallazgos nos condujeron a estudiar la prevalencia de TBC infantil en estas comunidades, encontrándose una tasa de

prevalencia de TBC en los niños menores de 15 años de 3190/100.000 (7).

Se ha establecido que tanto la respuesta inmunitaria innata como la adaptativa juegan un papel crucial en la resistencia a la infección por *M. tuberculosis* (8-11). Tradicionalmente, la inmunidad protectora a TBC ha sido atribuida a la inmunidad mediada por células T, especialmente la inmunidad mediada por células tipo Th1 (11). Sin embargo, desde 1955, Pillemer y col., describieron y pusieron en evidencia una vía de activación del complemento independiente de anticuerpos, la cual era activada por polisacáridos de alto peso molecular y por paredes celulares bacterianas (12). Adicionalmente, ha sido claramente establecido que los efectos de la deficiencia de los componentes del complemento, particularmente los componentes de la vía alterna trae como consecuencia un incremento de la susceptibilidad a la infecciones (13). La policlonalidad es un evento que ha sido descrito tanto para el estado de enfermedad activa pulmonar o extrapulmonar como de infección por *M. tuberculosis* (14-16). Recientes estudios inmunológicos y genéticos sustentan el hecho de que la inmunidad innata es relevante en la infección por *M. tuberculosis* (10, 17-22).

En vista de todos estos hallazgos, nos propusimos estudiar la respuesta inmunitaria de los niños Warao con y sin TBC con el objeto de comenzar a caracterizar el perfil inmunológico de los niños Warao. Se estudiaron los niveles de los componentes C3 y C4 del complemento, los niveles totales de las inmunoglobulinas A, G, M y E en suero así como la inmunoglobulina A secretora (IgAs) en saliva y la respuesta celular mediante la aplicación de las pruebas de tuberculina, candidina e histoplasmina; las dos primeras con el objeto de evaluar la respuesta retardada mediada por células y la última para descartar que las lesiones pato-

lógicas reveladas por radiología no fueran debidas a *Histoplasma capsulatum*. Se estudió además, la frecuencia de infecciones parasitológicas, dermatológicas y marcadores de infección viral para hepatitis B y C.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Grupos de Estudio

Se realizó un estudio de tipo descriptivo de corte transversal donde se evaluaron 1.209 niños, de los cuales se escogieron para el estudio 107 niños entre las edades de 0 hasta 15 años de 14 comunidades: Guayo, Murako, Jobure, Meregina, Koamuhó, Nabasanuka, Bonoína, Mojabaina de Nabasanuka, Mojabaina de Bonoína, Jubasujuru, Barranquita, Yarita y Corocoina correspondientes al Municipio Antonio Díaz (894 niños) y Yakariyene al Municipio Tucupita (315) del Estado Delta Amacuro (Fig. 1). El

promedio de edad fue de  $7,87 \pm 4,28$  años. Los grupos de estudio fueron clasificados en: **Grupo de Pacientes**. Niños Warao con tuberculosis activa antes de tratamiento (n=32: 15 hembras y 17 varones), de los cuales 27 fueron positivos y 5 negativos a la reacción de tuberculina. Todos los pacientes PPD negativos fueron BCG positivos por presentar la cicatriz de vacunación. **Grupo de Controles**. Niños Warao controles sin evidencia de TBC (n=75: 44 hembras y 31 varones), 45 positivos y 30 negativos a la reacción de tuberculina. De estos PPD negativos, 15 no presentaron cicatriz de BCG.

### Criterios de inclusión y exclusión para el estudio

1) Pacientes con TBC activa: niños con diagnóstico de TBC basado en criterios clínicos, epidemiológicos, bacteriológicos, radiológicos y serológicos previamente repor-

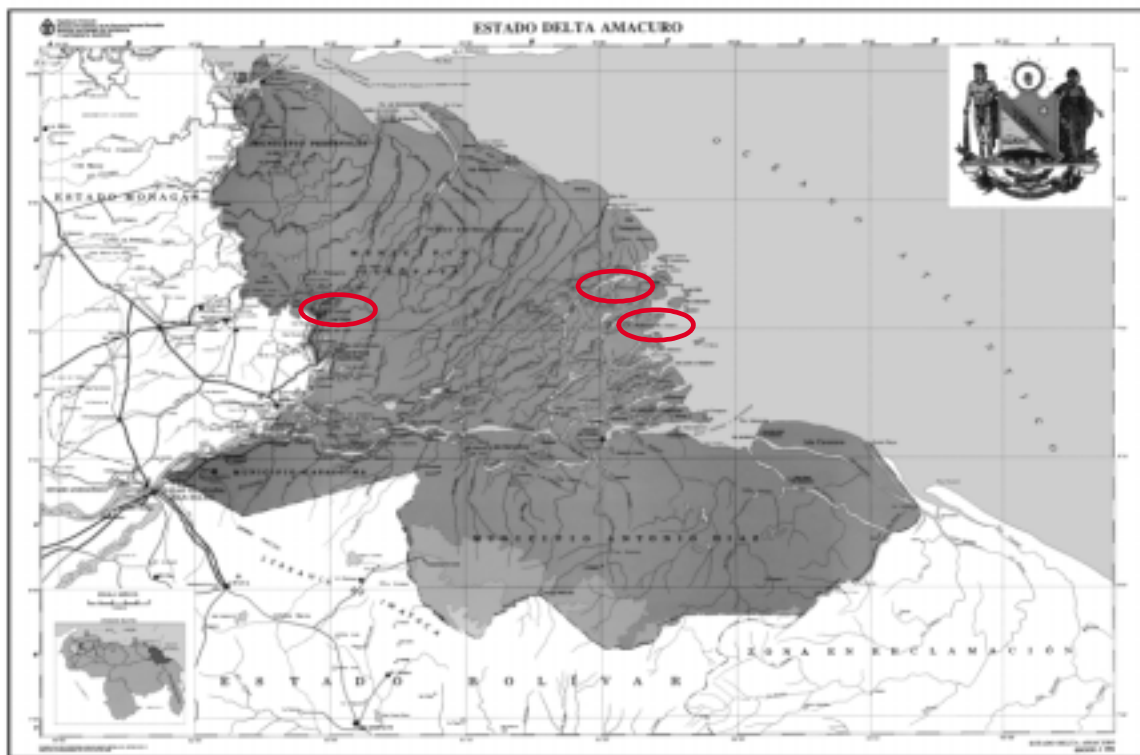


Fig. 1. Mapa del estado Delta Amacuro de Venezuela. Se muestran las comunidades estudiadas de los Municipios Tucupita y Antonio Díaz.

tados (7), con reactividad positiva o negativa a la tuberculina y con confirmación radiológica y/o bacteriológica. 2) Grupo Control: niños aparentemente sanos (contactos) positivos y negativos a la reacción de la tuberculina y sin evidencia de enfermedad a la aplicación de los criterios establecidos (7). Se excluyeron los niños sospechosos de TBC. 3) Se incluyeron en el estudio solo los niños con serodiagnóstico negativo al VIH. 4) En vista de que ha sido reportado que la población indígena venezolana es fundamentalmente del grupo sanguíneo O (23), se estudiaron sólo los niños Warao grupo de sangre O, Rh+.

**Criterios Éticos.** 1) Se incluyeron los niños tanto pacientes como controles cuyos representantes manifestaron por escrito el consentimiento de que sus hijos participaran en el estudio. 2) Autorización del estudio y aspectos éticos. Para tal fin se contó con la colaboración de intérpretes para la instrucción, interrogatorio y solicitud del consentimiento para la participación en el estudio. 3) Se les tomó muestras de sangre a los niños de 2 o más años de edad, mientras que las muestras de salivas se tomaron a los niños de 1 mes de edad en adelante. 4) El estudio contó con la aprobación de la comisión de ética del Instituto de Biomedicina, de la Dirección Regional de Salud y de la Coordinación Regional del Programa para el Control de la Tuberculosis del Estado Delta Amacuro, así como de las autoridades locales tanto indígenas, sanitarias y educativas.

#### **Pruebas intradérmicas**

Se procedió a aplicar la prueba de la tuberculina a todas las comunidades visitadas para el estudio en los menores de 15 años, según normas ya bien establecidas internacionalmente (24). Al mismo tiempo se colocó la prueba intradérmica de histoplasmina con la finalidad de descartar que la observación patológica observada en la

radiología no fuera debida a una infección por *Histoplasma capsulatum*, la cual cursa con lesiones pulmonares indistinguibles a la vista radiológica. También se aplicó la prueba intradérmica de candidina con la finalidad de descartar si los casos de no respuesta a la tuberculina son casos de anergia específica o no.

#### **Prueba intradérmica de tuberculina**

Se procedió como ha sido previamente descrito (7). Brevemente, se administró una dosis de 0,1 mL (2 TU en 0,1 mL de PPD RT23/Tween 80, Statens Seruminstitut, Copenhagen). Se realizó la lectura a las 48 horas, considerándose positiva una induración de 10 mm o más de diámetro (24).

#### **Prueba de histoplasmina y candidina**

En todos los niños estudiados se aplicó la prueba de histoplasmina y de candidina (gentilmente donada por la Dra. Mireya Mendoza del Laboratorio de Micología del Instituto de Biomedicina, UCV), se colocó una dosis de 0,1 mL de los antígenos estandarizados para el uso en humanos. La lectura se realizó a las 48 horas, siendo el punto de corte de positividad la induración igual o mayor a 5 mm de diámetro.

#### **Determinación de los componentes C3, C4 del complemento y valores totales de IgA, IgG e IgM séricas**

Los componentes C3 y C4 del complemento y las inmunoglobulinas A, G, y M séricas fueron determinados mediante la técnica de inmunodifusión radial con placas y estándares comerciales (Endoplate™, Single Radial Immunodiffusion Test Kits, Beckman Coulter™, USA). La técnica está estandarizada solo para ser realizada a los niños mayores de 7 años. Los criterios de normalidad se obtuvieron a partir de un grupo de niños criollos sanos de Caracas. Los valores normales estandarizados para las pruebas son 101-186 mg/dL y 16-47

mg/dL para los componente C3 y C4 respectivamente y 68-423 mg/dL, 844-1912 mg/dL y 50-196 mg/dL para las inmunoglobulinas A, G y M respectivamente.

#### Determinación de los niveles de IgAs en saliva

Se determinaron los niveles totales de IgAs en saliva por la técnica de ELISA. Las muestras de saliva fueron tomadas mediante un algodón que fue colocado debajo de la lengua, las muestras fueron conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de realizar su análisis. Luego de la estandarización de la técnica, la determinación de IgAs se realizó en microplacas de 96 pozos (Inmunolon) que fueron recubiertas con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el componente secretor de la IgAs (*Sigma-Aldrich*®), el cual estaba diluido en una solución salina de tapizado (solución carbonato-bicarbonato buffer pH 9,6). Las placas fueron incubadas durante toda la noche a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . Luego de lavar 5 veces las placas con una solución salina fosfato, pH 7,2 al 0,05% Tween 20 (solución de lavado) con el objeto de eliminar el anticuerpo no adherido, las placas fueron tratadas con solución de bloqueo, la cual contenía suero de caballo. Seguidamente, las placas fueron incubadas por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se añadieron las diluciones de saliva (1:100), luego de la incubación y de realizar los lavados, las placas fueron incubadas con el anticuerpo secundario, el cual está dirigido contra la cadena alfa de la IgA conjugado con peroxidasa (*anti-sIgA Sigma-Aldrich*®, Saint Louis, Missouri, USA), luego de la incubación, las placas fueron reveladas con una solución de revelado, la cual contiene 25 mL de buffer citrato, pH 5, 10 mg de orto-fenilendiamina (orto-phenylendiamine (OPD) dihydrochloride, *Sigma-Aldrich*®, Saint Louis, Missouri, USA) y 30  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , luego de una incubación de 20 minutos, la reacción

fue parada, añadiendo 50  $\mu\text{l}$  de una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . El color fue leído en un lector de ELISA (ANTHOS) a una longitud de onda de 492 nm.

#### Determinación de los niveles de IgE en suero

Los niveles totales de IgE se determinaron por la técnica de ELISA a partir de la estandarización de un método desarrollado en el laboratorio. Los sueros fueron separados de la muestra de sangre y fueron mantenidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de realizar la técnica. Luego de la estandarización de la técnica, los niveles totales de IgE fueron determinados de manera similar como fue descrito para la IgAs. Las placas fueron recubiertas con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la cadena pesada de la IgE (Anti-Human IgE, Epsilon Chain Specific, Vector Laboratories, Inc., USA) diluido en solución de tapizado carbonato-bicarbonato. La solución de bloqueo contenía Albumina Sérica Bovina. Dilución de los sueros (1:10) fueron añadidos e incubados por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . El anticuerpo secundario consistió de un anticuerpo dirigido contra la cadena epsilon de la IgE conjugada con Biotina (Anti-Human IgE, Vector Laboratories, Inc., USA), se realizó la amplificación de la reacción con estreptavidina incubando por 45 minutos, luego de finalizada la incubación, se procedió al revelado de las placas. Los valores normales son 50-200 UI/mL (Unidades Internacionales/mililitro).

#### Serología de marcadores de hepatitis viral

Se realizó la determinación del antígeno de superficie para el virus de la hepatitis B (VHB) y anticuerpos contra el virus de la hepatitis C (VHC), mediante un ELISA doble sándwich monoclonal (25) y un ELISA comercial (EQUIPAR HCV Ab, Equipar, Saronno, Italia) respectivamente.

### Evaluación coproparasitológica y dermatológica

Para la evaluación coproparasitológica, se realizaron exámenes de heces a las comunidades visitadas, incluidos los niños en estudio, buscando confirmar la alta prevalencia de infecciones parasitarias intestinales en esta población. Se procedió a la toma de una sola muestra de heces por razones logísticas, la cual fue conservada en formaldehído, y examinada por el método de Kato-Katz en el Laboratorio de Geohelmintiasis del Instituto de Medicina Tropical, de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela (UCV).

Para la evaluación dermatológica de las comunidades estudiadas, se realizó consulta médica general incluyendo la consulta dermatológica.

### Análisis estadístico

El análisis estadístico utilizado para comparar la significancia de las diferencias fue el método de la prueba exacta de Fisher y Ji Cuadrado. A los resultados expresados como el promedio  $\pm$  la desviación estándar se les hizo la comparación por la prueba de "t" de student.

## RESULTADOS

### Reactividad celular retardada

En la Tabla I se muestra el total de los niños agrupados de acuerdo a los siguientes grupos etarios: 0-11 meses, 1-3 años, 4-6 años, 7-10 años y 11-15 años y a la presencia o no de cicatriz de BCG. Los resultados mostraron que, de los 107 niños, 31 (28,9%) no tenían cicatriz de BCG y 76 (71%) tenían cicatriz a consecuencia de una vacunación previa.

La Tabla II muestra el porcentaje de niños con reactividad positiva a la tuberculina, según grupo etario. Se encontró un porcentaje de niños con PPD positivo de 59,8% y de 40,2% con PPD negativo. Se observa

**TABLA I**  
PRESENCIA DE CICATRIZ  
EN LOS NIÑOS,  
SEGÚN EL GRUPO ETARIO

| Grupos Etarios | Presente/Total | (%)  |
|----------------|----------------|------|
| 0-11 (meses)   | 1/5            | 20,0 |
| 1-3 (años)     | 6/14           | 42,8 |
| 4-6 (años)     | 15/23          | 65,2 |
| 7-10 (años)    | 25/32          | 78,1 |
| 11-15 (años)   | 29/33          | 84,8 |
| Total          | 76/107         | 71,0 |

**TABLA II**  
POSITIVIDAD A LA PRUEBA  
DE LA TUBERCULINA EN LOS NIÑOS,  
SEGÚN GRUPO ETARIO

| Grupos Etarios | PPD+ /Total | (%)  |
|----------------|-------------|------|
| 0-11 (meses)   | 0/5         | 0    |
| 1-3 (años)     | 9/14        | 64,3 |
| 4-6 (años)     | 10/23       | 43,5 |
| 7-10 (años)    | 23/32       | 71,9 |
| 11-15 (años)   | 22/33       | 66,7 |
| Total          | 64/107      | 59,8 |

que los niños de mayor edad presentaron las mayores medidas de induraciones, (7-10 años y 11-15 años, 71,9% y 66,7% respectivamente) (Tabla II). El mayor porcentaje de niños con PPD positivo se encontró en el grupo de los niños de 7-10 años (71,9%). En cuanto a los niños con reactividad negativa al PPD se observó que, el porcentaje de niños negativos estuvo entre el 11,63% y 30,2%, este último porcentaje se observó en el grupo etario de los niños de 4-6 años de edad.

En la Tabla III se muestran los resultados de los mismos grupos etarios y la distribución de las lecturas del diámetro de las induraciones a la tuberculina (0-5, 6-9, 10-15 y 16-20). El mayor porcentaje de niños con lecturas de induraciones positivas al

**TABLA III**  
 PORCENTAJE DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS MEDIDAS DE INDURACIÓN A LA TUBERCULINA,  
 SEGÚN EL GRUPO ETARIO

| Grupos Etarios | Induraciones (%) |        |          |          |
|----------------|------------------|--------|----------|----------|
|                | 0-5 mm           | 6-9 mm | 10-15 mm | 16-20 mm |
| 0-11 (meses)   | 12,2             | 0      | 0        | 0        |
| 1-3 (años)     | 12,2             | 0      | 19,4     | 6,9      |
| 4-6 (años)     | 31,7             | 0      | 16,7     | 13,8     |
| 7-10 (años)    | 21,9             | 0      | 30,6     | 41,4     |
| 11-15 (años)   | 21,9             | 100    | 33,3     | 37,9     |
| Total          | 38,3             | 0,93   | 33,6     | 27,1     |

PPD mayores de 10 mm y principalmente mayores de 16 mm se observó en los grupos etarios a partir de los 7-10 años (41,4%) (Tabla III). Se observó que 42 niños presentaron medidas de induraciones entre 0-9 mm (39,3%), es decir tuvieron una reactividad considerada negativa al PPD. De estos, 36 no presentaron ninguna medida de induración (85,7%), es decir tenían medidas de 0 mm (41,7% no presentaban cicatriz de BCG y 58,3% si la presentaban). Entre los niños del grupo de 4-6 años se encontró el mayor porcentaje de niños con medidas de induraciones de 0-5 mm (31,7%). Cuando se compararon los pacientes sin y con cicatriz de BCG, los primeros presentaron una media de induración al PPD de  $15,29 \pm 3,20$  mm, mientras que en los niños con cicatriz de  $12,49 \pm 7,39$  mm. Sin embargo, entre los niños controles se encontró que los niños vacunados presentaron  $9,37 \pm 7,46$  mm de induración en comparación con los niños no vacunados  $5,35 \pm 7,44$  mm (datos no mostrados).

#### Reactividad a la prueba de la candidina

Se encontró que un 80% de los niños tuberculina anérgicos (0 mm), fueron también candidina negativos. Esta asociación fue estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ).

#### Reactividad a la prueba de la histoplasmina

La especificidad del diagnóstico de TBC fue corroborada por la negatividad encontrada a la reacción de la histoplasmina en todos los niños pacientes.

#### Valores de los componentes C3 y C4 del complemento

El porcentaje de niños con concentraciones elevadas de los componentes C3 y C4 del complemento tanto del grupo de pacientes como de controles se muestran en la Fig. 2. Ambos grupos presentaron un porcentaje similar de niños con niveles aumentados tanto del componente C3 como C4 del complemento. Para el componente C3, se observó un porcentaje de 24,1% con niveles aumentados en el grupo de los pacientes y de 30,7% en los controles. Entre los pacientes un porcentaje de 3,4% presentó niveles disminuidos de este componente (datos no mostrados). Para el componente C4, se observó un porcentaje de 10,3% y 12,5% de niños con niveles aumentados en el grupo de pacientes y controles respectivamente. Entre los controles se encontró un porcentaje de 4,1% con niveles disminuidos de este componente (datos no mostrados). No se obtuvo significancia para ninguno de los



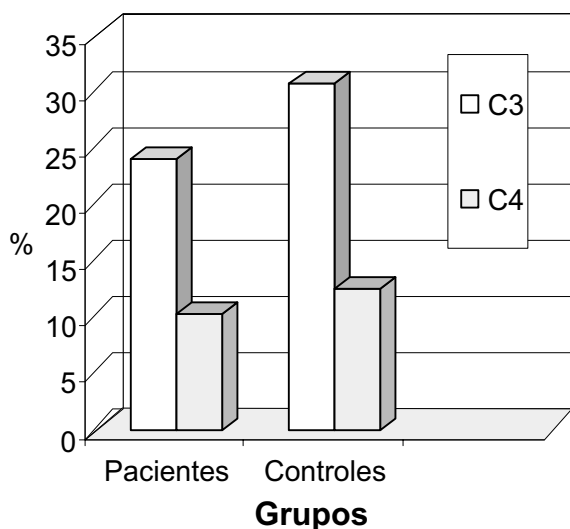


Fig. 2. Porcentaje de niños con valores elevados de los componentes C3 y C4 del complemento.

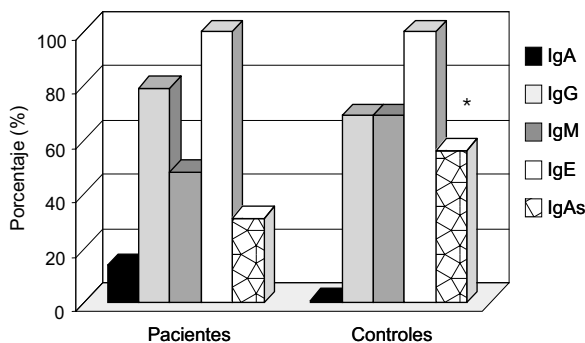


Fig. 3. Fig. 3. Porcentajes de niños con niveles totales de inmunoglobulinas (A, G, M, E y A secretora) elevados.

casos. Cuando los resultados son expresados en términos de concentración se observaron valores de  $172,1 \pm 41$  y  $171,21 \pm 38,22$  para el componente C3 en los niños pacientes y controles respectivamente, para el componente C4,  $33,64 \pm 9,51$  para los pacientes y  $37,25 \pm 14,11$  para los controles. No se encontró diferencia significativa entre los grupos.

### Determinación de los valores totales de inmunoglobulinas

El resultado de los porcentajes de niños con aumento de los valores totales de las diferentes inmunoglobulinas estudiadas se muestran en la Fig. 3. Para la IgA, se encontró un alto porcentaje de niños pacientes (13,8%) con niveles por encima de los normales en comparación con el grupo control donde no hubo niños con niveles de IgA total (0%). Para la IgG, se encontró igualmente que el grupo de los pacientes presentó el mayor porcentaje de niños (79,3%) con aumento de los niveles totales de esta inmunoglobulina. En el grupo control, el porcentaje fue de 69,2%. Para la IgM, contrariamente a lo encontrado para la IgA e IgG, el grupo que presentó el mayor porcentaje de niños con niveles totales de IgM elevados fue el grupo control, 69,2%; mientras que para el grupo de pacientes fue de 48,3%. No se encontró diferencias significativas entre estos porcentajes.

Entre el grupo de niños pacientes, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de niños con niveles totales de IgG elevados (79,3%) en comparación con IgM (48,3%) y con IgA (13,8%) ( $p < 0,02$ ). Cuando los resultados son expresados en términos de concentración se observaron valores para la IgA, IgG e IgM de  $274 \pm 72$ ,  $2203 \pm 363$  y  $200,9 \pm 42,6$ , respectivamente para el grupo de los niños pacientes, mientras que para los controles de  $278,42 \pm 76,5$ ,  $2039,25 \pm 267,7$  y  $215 \pm 43,4$  respectivamente.

### Determinación de los niveles IgE en suero

Ambos grupos de niños en estudio presentaron un 100% de niños con los niveles totales de IgE elevados (Fig. 3). Los valores para el grupo de niños pacientes se encontraban entre 1.210-34.230 UI/mL, con un promedio de  $9.970 \pm 14.640$  de desviación estándar. Los valores para el grupo control

estuvieron entre 2.110-24.710 UI/mL, con un promedio de  $11.058 \pm 7.309$  de desviación estándar. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos por lo grande de la desviación estándar.

### Determinación de los niveles de IgAs en saliva

El porcentaje de niños con los niveles totales de IgAs aumentados se muestra en la Fig. 3. El punto de corte (0,621 de densidad óptica) se calculó a partir de los valores totales de IgAs de una población de niños normales que no pertenecían a la zona en estudio y no presentaban reactividad a la tuberculina. Los resultados mostraron que entre los grupos de niños en estudio, fueron los controles quienes presentaron un porcentaje alto de niños con niveles totales de IgAs elevados (56,16%) en comparación con los niños pacientes que presentaron un porcentaje de 31,25%, ( $p < 0,001$ ).

### Serología de marcadores de hepatitis viral

El estudio se realizó en 25 niños, de los cuales 14 pertenecían al grupo de niños pacientes y 11 al grupo control. No se encontró positividad en ningún caso ni para anticuerpos anti-hepatitis C ni para el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.

### Evaluación coproparasitológica y dermatológica

La Fig. 4 muestra los resultados de los estudios parasitológicos realizados. El 28% de los niños estaban parasitados con protozoarios, el 11% con helmintos, el 14% presentó coinfección parasitaria y el 46% no estaba parasitado (Fig. 4a). La incidencia de infección de los parásitos más frecuentemente encontrados se muestran en la Fig. 4b. *Trichuris trichiura* y *Entamoeba coli* fueron los parásitos más prevalentes entre los helmintos y los protozoarios respectivamente.

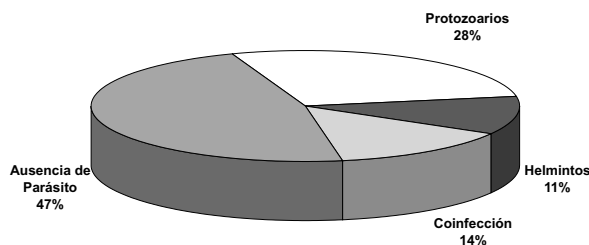


Fig. 4a. Porcentaje de parasitosis.

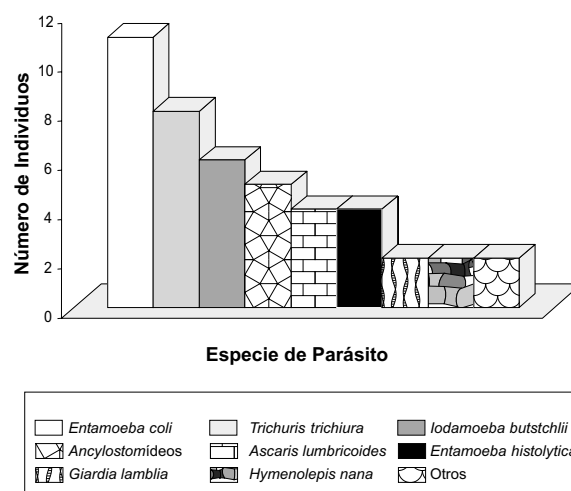


Fig. 4b. Frecuencia de infecciones parasitarias.

La evaluación clínica dermatológica mostró que impétigo, escabiosis, prurigo, tiña y pediculosis del cuero cabelludo estaban entre las afecciones patológicas más frecuentes.

### DISCUSIÓN

Los resultados mostraron un alto porcentaje de niños con elevados niveles de los componentes C3 y C4 del complemento entre los grupos de pacientes y controles, sin diferencias significativas de los niveles de estos componentes entre los grupos estudiados. Se encontró también que un porcentaje menor de niños presentó disminución de ambos componentes, un 3,4% de niños pacientes presentó niveles disminuidos del componente C3, mientras que en los ni-

ños controles 7,6% mostró la disminución para el componente C4. Desde el momento que se conoce que la respuesta humoral primaria requiere de varios días para que tenga lugar, durante los estados tempranos de defensa del huésped contra una infección, los mecanismos de la inmunidad innata durante cualquier infección incluyendo la infección por *M. tuberculosis* son de extrema importancia, especialmente, los mecanismos de activación del complemento independientes de los anticuerpos, los cuales se establecen durante las etapas precedentes de la fase aguda de la respuesta inmunitaria (10, 13, 17-21, 26). Existe controversia en la literatura en cuanto a la importancia relacionada a la protección que el complemento tiene frente a las infecciones. En relación con este aspecto, recientemente, se ha reportado que el complemento no tiene un rol importante en la TBC al no mediar la fagocitosis de *M. avium* por los macrófagos murchisoni (27). Sin embargo, en el humano, el papel importante que tiene el complemento durante la TBC ha sido puesto en evidencia a través de la purificación y la identificación de complejos inmunológicos, compuestos de inmunoglobulinas, complemento y antígeno de *M. tuberculosis*. El aumento significativo de los componentes C3 y C3d se ha encontrado relacionado con el aumento de complejos inmunitarios en pacientes con TBC no tratados, sugiriéndose que la activación del complemento por estos complejos previene que la TBC conlleve una patología mediada por complejos inmunitarios como es conocido que ocurre en diferentes enfermedades (26, 28, 29). El papel de protección que pudiera tener el complemento en la población estudiada, no es fácil de establecer en vista de que no hay estudios realizados sobre este aspecto en otras comunidades infantiles indígenas de Venezuela. En nuestro estudio, la tendencia parece ser que los niños aunque tengan o no TBC presentan altos niveles de C3 y C4,

lo cual puede ser atribuido a una adaptación que protege a esta población indígena frente a las malas condiciones de salubridad que existen y que condiciona a los altos niveles de infecciones a diferentes agentes que se observan desde temprana edad en estas comunidades.

La respuesta inmunitaria humoral se caracteriza por una diversidad de isotipos, con diferentes funciones efectoras, en particular la activación del complemento, la unión a los fagocitos y a las células asesinas a través de los receptores Fc. Los anticuerpos de las tres clases de Inmunoglobulinas (IgA, IgG e IgM) son los componentes de la respuesta humoral madura, siendo los anticuerpos de las clases IgG los más importantes en la mayoría de las infecciones (14). En los niños Warao se observa una hipergammaglobulinemia que está dirigida principalmente hacia la producción de casi todos los isotipos, IgG, IgM, IgA, IgE e IgAs. Sin embargo, mientras los pacientes producen altos niveles de IgG e IgA sérica, los controles producen IgAs e IgM. La policlonalidad es un evento que ha sido descrito tanto para el estado de enfermedad activa pulmonar o extrapulmonar como de infección por *M. tuberculosis* (14-16, 30). Se ha sugerido que la presencia de niveles elevados de IgM está asociada a infección reciente, pero la IgG y especialmente IgG1 al estado de enfermedad activa, ésta última se encuentra aumentada aún después del tratamiento (16, 30). Los niveles de IgA se han reportado variables durante la enfermedad por TBC (15, 16, 31). Estos reportes están en concordancia con nuestros resultados, los altos niveles de IgM en los niños controles pueden correlacionarse con una infección reciente en comparación con los niños pacientes, quienes presentaron el mayor porcentaje de niños con altos niveles de IgG. La policlonalidad estuvo presente para el isotipo IgAs en los niños controles. Este isotipo que está entre los principales mecanismos responsables de la inmuni-

dad de las mucosas, está disminuido en un alto porcentaje de los niños pacientes. En nuestro caso, la disminución de este isotipo podría estar asociado igualmente que el aumento de IgG al estado de enfermedad activa como ha sido reportado (31-34).

No se encontró positividad en ningún caso ni para anticuerpos anti-hepatitis C ni para el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, sin embargo, la incidencia de la infección frecuente con *Trichuris trichuris* y *Entamoeba coli* entre muchos otros parásitos, así como la presencia en estos niños de impétigo, escabiosis, prurigo, tiña (micosis superficiales) y pediculosis del cuero cabelludo entre las afecciones dermatológicas hacen pensar que contribuyen a disparar respuestas policlonales como mecanismos inmunitarios de defensa, no solo relacionados con la síntesis de inmunoglobulinas si no también en cuanto a la síntesis de los diferentes componentes del complemento, entre ellos, los componentes C3 y C4 como se encontró en los niños Warao de las diferentes comunidades estudiadas. En concordancia con nuestros resultados están los hallazgos encontrados por otros autores en otras comunidades Warao (5).

El hecho de que se encontró que un alto porcentaje de niños sin o con cicatriz de BCG presentaron medidas de induraciones de 0 mm de diámetro a la reacción de la tuberculina, sugiere que la vacunación con BCG no necesariamente indujo un estado de inmunidad en estos niños vacunados. Sin embargo, no se puede descartar los estados de anergia, como fue el caso en nuestro estudio, donde encontramos que un 80% de los niños presentaron estados de anergia no específicos. En relación con estos hallazgos, en la población indígena Yanomami, se encontró una alta prevalencia de TBC activa y de anergia a la tuberculina (35). Por otro lado, parecería que además, la vacunación no contribuye al desarrollo de una respuesta de reactividad positiva al

PPD, ya que el porcentaje de niños con reactividad positiva fue similar en los niños con y sin cicatriz de BCG, principalmente entre los 0-10 años de edad, luego de esta edad, un alto porcentaje de los niños con cicatriz de BCG son los que tienen una mayor reactividad al PPD. Se ha reportado que la vacunación con BCG puede tener una influencia sobre esta reactividad solo hasta los primeros años de edad (35-37), por lo que factores tales como, una mayor exposición a la infección al vivir en comunidades que tienen alta prevalencia de TBC entre la población adulta. En concordancia con esta idea, está el hecho de que encontramos que los niños de mayor edad presentaron las medidas de induraciones más grandes.

Existen controversias en la literatura en cuanto a la medida de induración y la positividad a la infección por *M. tuberculosis*. La Academia Americana de Pediatría (American Academy of Pediatrics (AAP)), tiene establecido que si no hay riesgo de infección para niños menores de 4 años, 15 mm de induración debe ser el valor aceptado como positivo de infección. Si hay riesgo de infección, el valor aceptado está entre valores de induración de 5-10 mm (36, 38). Esta misma Academia al igual que la Academia Americana de Tórax (American Thorax Association) acepta un máximo de induración de 10 mm asociados a la vacunación, sin embargo, algunos aceptan valores de 12-15 mm (36). Por otro lado, se reporta que el efecto de la vacunación con BCG desaparece a los 3 a 4 años luego de la vacunación (36). El mayor porcentaje de niños con TBC estaban vacunados y presentaban positividad a la prueba de tuberculina, implicando esto, que desarrollaron una respuesta de inmunidad celular específica. Apoyando nuestros hallazgos, están los estudios realizados en los Yanomami, otra población indígena, en la cual se demostró que esta población tiene una alta sensibilidad de padecer TBC incluso en los indíge-

nas vacunados con BCG (35). Sin embargo, existen reportes que muestran que en poblaciones no indígenas sin TBC e inmunizados con BCG, se incrementa significativamente la probabilidad de tener una reacción positiva a la tuberculina (37-40). Teniendo en cuenta que se ha estimado que el riesgo de desarrollar enfermedad después de la infección por *M. tuberculosis* es de 5-10% en adultos, 15% en adolescentes, 24% en niños entre 1 a 5 años y 43% en niños menores de 1 año (41), nuestros resultados sugieren que se debe alcanzar al menos un 90% de cobertura de vacunación con BCG en todas las poblaciones rurales, incluyendo la población Warao, en donde se observó que esta está por debajo de este porcentaje.

Otro parámetro que se estudió y que está íntimamente relacionado con un estado que predispone a contraer infecciones incluyendo la infección por *M. tuberculosis*, es la desnutrición, la cual es frecuente encontrar en poblaciones rurales. El estudio se realizó a los niños no tuberculosos, en vista de que se tiene el conocimiento de que en los niños no existen signos físicos o síntomas que indiquen de manera concluyente la presencia de TBC; esto debido principalmente al hecho de que los niños no expectoran con facilidad, lo cual no permite obtener una buena muestra de esputo; generalmente el motivo de consulta más importante es, un inadecuado progreso de peso, pérdida de peso por más de cuatro semanas, la cual se acompaña generalmente con una disminución de actividad y ánimo, basándose el diagnóstico en criterios clínicos no siempre bien definidos y en ensayos terapéuticos. Se realizó la medición de talla y peso, calculando posteriormente el índice de masa corporal. Los estudios antropométricos mostraron que a excepción de 3 de los 5 niños lactantes, no se encontraron niños desnutridos (datos no mostrados), pensamos que la razón de la desnutrición de es-

tos niños es que eran hijos de madres con TBC que se encontraban clínicamente muy afectadas. El estado de desnutrición de cualquier población indígena de Venezuela es difícil de interpretar, en vista de que no existen las tablas de referencia para esta población. Los resultados de la evaluación antropométrica se interpretaron en base a las tablas de crecimiento y desarrollo establecidas por Fundacredesa en niños criollos (4). Adicionalmente, se ha reportado que la falta de una ingesta de 100% de energía en las comunidades Warao, conlleva a deficiencias en el crecimiento de estos indígenas en aproximadamente la mitad de todos los niños (5).

Finalmente, podríamos concluir que en los niños Warao con y sin TBC se observa un perfil inmunitario caracterizado por un aumento en los niveles de los componentes C3 y C4 del complemento, por una hipergammaglobulinemia que está dirigida hacia la producción de los isotipos IgG, IgA, IgM, IgAs e IgE, que es independiente de su reactividad al PPD. La IgAs parece ser marcador del estado de enfermedad activa, mientras que la IgM un marcador de infección reciente. El hecho de que, en los niños menores de 7 años la reactividad al PPD es similar e independiente de la vacunación con BCG y que un alto porcentaje los niños con TBC presentaban cicatriz de BCG, sugiere que la respuesta celular inducida por la vacunación con BCG no protege a los niños Warao de padecer TBC pulmonar. Aunado a esto, están las altas tasas de coinfecciones presentes desde una temprana edad en estos niños. Todos estos hallazgos sugieren que tal situación conlleva a dirigir la diversificación de la respuesta inmunitaria para defenderlos de estos gérmenes, pero que quizás como resultado de ello, esta respuesta no los protege contra la infección por *M. tuberculosis* por ser anérgica o por no ser simplemente la adecuada.

## AGRADECIMIENTO

A todas las autoridades sanitarias locales muy especialmente a la Dra. Miryan Calero, ex-Directora Regional de Salud, el Dr. Luis Rodríguez, ex-Coordinador y Dr. Alexis Alfonso Coordinador del Programa Regional de TBC y a la Dra. Ana León del Servicio de Pediatría del Hospital "Luis Razzeti" de Tucupita. Igualmente a las autoridades educativas e indígenas del Estado Delta Amacuro. Al personal de los Laboratorios de Tuberculosis, Psiconeuroinmunología y Micología del Instituto de Biomedicina. A la Lic. Rosa Contrera de la Cátedra de Parasitología de la Escuela de Medicina "Luis Razzeti" de la Universidad Central de Venezuela. Al Dr. Javier Ortega del Servicio de Dermatología del Instituto de Biomedicina. Este trabajo fue hecho posible por el convenio entre el Banco Mundial y el Ministerio de Sanidad y Asistencia Social: BM/MSAS/PCEE-VEN/96/002-021-034 y el proyecto CONICIT S1-2000000667.

## REFERENCIAS

1. **Censo indígena de Venezuela 1992.** Nomenclador de asentamientos. Tomo II. Oficina Central de Estadística e Informática. Caracas, Febrero 1995.
2. **Heinen D.** Los Warao. En: Los aborígenes de Venezuela. Fundación La Salle de Ciencias Naturales. Monte Ávila Editores. Caracas. 1988.
3. **Doménico C.** Informe Warao CVP- Fundación Zumaque. Primicia. Febrero 1998. Número 14: 32-38.
4. **Fundacredesa.** Estudios Integrados sobre Etnias Autóctonas Venezolanas. Proyecto Venezuela, Caracas. 1988.
5. **Holmes R.** Evaluation of the socio-sanitary conditions in five Warao communities of the Delta centro block in preparation for the elaboration of a 5 to 10 year social investment plan. Holmes Consultores, 1997. p 1-29.
6. **Seminario Técnico-Administrativo 1999.** Programa Integrado de Control de la Tuberculosis. Ministerio de Sanidad y Asistencia Social. Caracas. Mayo 1999.
7. **Fernández de Larrea C, Fandiño C, López D, del Nogal B, Rodríguez N, Convit J, Araujo Z, de Waard JH.** Una Metodología Simple para el Diagnóstico de Tuberculosis Infantil en la Población Warao. Invest Clín 2002; 43:35-48.
8. **Gatner EMS, Anderson R.** An in vitro assessment of cellular and humoral immune function in pulmonary tuberculosis: correction of defective neutrophil motility by ascorbate, levamisole, metoprolol and propranolol. Clin Exp Immunol 1980; 40:327-336.
9. **Sousa AO, Henry S, Marója FM, Lee FK, Brum L, Singh M, Lagrange PH, Aucoutorie P.** IgG subclass distribution of antibody responses to protein and polysaccharide mycobacterial antigens in leprosy and tuberculosis patients. Clin Exp Immunol 1998; 111:48-55.
10. **van Crevel R, Ottenhoff THM, van der Meer JWM.** Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Rev 2002; 15:294-309.
11. **Flynn JL, Chan J.** Immunology of Tuberculosis. Annu Rev Immunol 2001; 19:93-129.
12. **Whaley K, Lemercier C.** The Complement System. In: The Natural Immune System. Humoral Factors. Ed. Edith Sim. IRL PRESS. Oxford University Press. 1993: p 137-142.
13. **Petry F, Loos M.** Bacteria and Complement. In: The Human Complement System in Health and Disease. Edited by John E. Volalakis and Michael M. Frank. Marcel Dekker, Inc. New York . 1998: p 378-402.
14. **Schlesinger LS, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, Horwitz MA.** Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. J Immunol. 1990; 144:2771-2780.
15. **Turner M, Nerom EV, Nyabenda J, Waelbroeck A, Duvivier A, Toppet M.** Determination of humoral immunoglobulins M and G directed against mycobacterial antigen 60

- failed to diagnose primary tuberculosis and mycobacterial adenitis in children. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:1508-1512.
16. Hussain R, Dawood G, Abrar N, Toossi Z, Minai A, Dojki M, Ellner J. Selective increases in antibody isotypes and immunoglobulin G subclass responses to secreted antigens in tuberculosis patients and healthy household contacts of the patients. *Clin Diag Lab Immunol* 1995; 2:726-732.
  17. Medzhitov R, Janeway JR CA. Innate Immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997; p 9:4-9.
  18. Keane J, balcewicz-sablinska MK, Remold HG, Chupp GL, Meek BB, Fenton MJ, Kornfeld H. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophages apoptosis. *Infect Immun* 1997; 65:298-304.
  19. Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:14459-14463.
  20. Grange JM, Davies PD, Brown RC, Woodhead JS, Kardjito JS. A study of vitamin D levels in Indonesian patients with untreated pulmonary tuberculosis. *Tubercle*. 1985; 66:187-191.
  21. Juffermans NP, Dekkers PE, Peppelenbosch MP, Speelmar van deventer SJ, van der Poll T. Expression of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 on granulocytes in human endotoxemia and tuberculosis: involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Infect Dis*. 2000; 182:888-894.
  22. Davies P, Grange J. The genetics of host resistance and susceptibility tuberculosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 953:151-156.
  23. Arends T. Estructura genética de la población indígena de Venezuela. La Universidad de las Naciones Unidas, Caracas. 1992. p 85-92.
  24. Arnadottir T, Rieder HL, Trébuq A, Waaler H. Guidelines for conducting tuberculin skin test surveys in high prevalence countries. *Tuber Lung Dis*. 1996; 77: Suppl 1-20.
  25. Pujol FH, Rodríguez I, Devesa M, Rangel-Aldao RY, Liprandi F. A double sandwich monoclonal enzyme immunoassay for detection of hepatitis B surface antigen. *J Immunoassay*. 1993; 14:21-31.
  26. May JJ, Katilus J, Henson PM, Dreisin RB. The purification and identification of circulating immune complexes in tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*. 1983; 128:920-925.
  27. Bohlon SS, Strasser JA, Bower JJ, Schorey JS. Role of complement in *Mycobacterium avium* pathogenesis: in vivo and in vitro analyses of the host response to infection in the absence of complement component C3. *Infect Immun*. 2001; 69:7729-7735.
  28. Pant DC, Kapoor AK, Bhushan V, Bajpai PK, Dwivedi RU. Possible role of mononuclear phagocytes in clearance of immune complexes in pulmonary tuberculosis. *Indian J Pathol Microbiol*. 1995; 38:305-309.
  29. Sai baba KS, Moudgil KD, Kain RC, Srivastava LM. Complement activation in pulmonary tuberculosis *Tubercle* 1990; 2:103-107.
  30. Kamat KA, Williamson M, Koppikar GV. Humoral and cell mediated immune responses in patient with tuberculosis meningitis. *Indian J Med Sci*. 1999; 53:343-348.
  31. Kaustov´a J. Serological IgG, IgM and IgA diagnosis and prognosis of mycobacterial diseases in routine practice. *Eur J Med Res*. 1996; 1:393-403.
  32. Saha N, Wong CT. Changes in serum proteins (albumin, immunoglobulins and acute phase proteins) in pulmonary tuberculosis during therapy. *Tubercle*. 1990; 3:193-197.
  33. Brandtzaeg P, Bakkevold ES, Morton HC. From B to A the mucosal way. *Nature Immunol*. 2001; 2:1093-1094.
  34. Lamm ME, Phillips-Quagliata JM. Origin and homing of intestinal IgA antibody-secreting cells. *J Exp Med*. 2002; 195:F5-F8.

35. **Sousa A O, Salem J I, Lee F K, Vercosa M C, Cruaud P, Bloom B R, Lagrange P H, David H L.** An epidemic of tuberculosis with a high rate of tuberculin anergy among a population previously unexposed to tuberculosis, the Yanomami Indians of the Brazilian Amazon. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:13227-13232.
36. **Bozaykut A, Ipek IO, Ozkars MY, Seren LP, Atay Z.** Effect of BCG vaccine on tuberculin skin test in 1-6 years-old children. *Acta Paediatr.* 2002; 91:235-238.
37. **Wang L, Turner M O, Elwood R K, Schulzer M, FitzGerald J M.** A meta-analysis of the effect of Bacille Calmette Guerin vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax.* 2002; 57:804-809.
38. **American Academy of Pediatrics,** Tuberculosis. In: Peter G, 1997 ed. *Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases.* 24<sup>th</sup> ed: 1997; 541-562.
39. **American Thoracic Society.** Diagnostic standards and classification of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:725-735.
40. **Mbala L, Mashako M, Kashongwe M.** Childhood tuberculosis in a rural tropical area: risk factors. *Tropical Doctor.* 2002; 2:119-120.
41. **van Rie A, Beyers N, Gie RP, Kunneke M, Zietsman L, Donald PR.** Childhood tuberculosis in an urban population in South Africa: burden and risk factor. *Arch Dis Child.* 1999; 80:433-437.