



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS**

**“Dr. Ismael Cosío Villegas”**

**“EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS DE RESPUESTA  
INMUNE COMO POSIBLES INDICADORES DE TUBERCULOSIS  
LATENTE EN CONTACTOS CERCANOS DE PACIENTES CON  
TUBERCULOSIS PULMONAR”**

**TESIS DE ESPECIALIDAD**

**Que para obtener el título de  
NEUMOLOGÍA**

**P R E S E N T A**

**DRA. GLORIA LORENA ARREAGA FION**

**ASESOR DE TESIS:**

**DR. JOAQUIN ALEJANDRO ZÚÑIGA RAMOS**

**COTUTORA:**

**DRA. MARCELA MUÑOZ TORRICO**



Cd. Mx., 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## 1. ÍNDICE

<b>1. ÍNDICE</b>	<b>2</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>3. ANTECEDENTES</b>	<b>4</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>9</b>
<b>5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>10</b>
<b>6. HIPOTESIS</b>	<b>10</b>
<b>7. OBJETIVOS</b>	<b>10</b>
7.1. Principal	10
7.2. Específicos	10
<b>8. MATERIAL Y METODOS</b>	<b>11</b>
8.1. Lugar de estudio	11
8.2. Tamaño de la muestra	11
8.3. Descripción de la población de estudio	11
8.3.1. Criterios de inclusión	11
8.3.2. Criterios de exclusión	12
8.3.3. Criterios de eliminación	12
<b>9. ANALISIS ESTADISTICO</b>	<b>12</b>
<b>10. IMPLICACIONES ÉTICAS</b>	<b>12</b>
<b>11. PRUEBAS REALIZADAS</b>	<b>13</b>
11.1. Radiografía de tórax	13
11.2. Venopunciones	13
11.3. Pruebas de tuberculina	13
11.4. Ensayo de Quantiferon Tb gold	13
11.5. Ensayo de cuantificación de IP-10 y ELISA	14
<b>12. RESULTADOS</b>	<b>15</b>
<b>13. DISCUSIÓN</b>	<b>19</b>
<b>14. CONCLUSIONES</b>	<b>23</b>
<b>15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>24</b>
<b>16. ANEXOS</b>	<b>26</b>
16.1. HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS	26
16.2. CONSENTIMIENTO INFORMADO	30

## 2. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es un problema de salud pública en todo el mundo la cual afecta a 9.2 millones de personas anualmente de los cuales el 80% proviene de los países en vías de desarrollo, con más de 2 millones de fallecimientos. En México se registran anualmente un estimado de 15,000 casos nuevos de TB y alrededor de 2,000 defunciones, con un promedio de edad de fallecimiento de 54 años.

Las formas más frecuentes de presentación de la TB incluyen la enfermedad activa (TBA) y la infección latente (TBL). En esta última no hay sintomatología clínica ni se transmite, de manera que la bacteria persiste en el organismo manteniendo una baja o nula actividad replicativa.

En base a la prueba de tuberculina se estima que un tercio de la población mundial tiene una infección tuberculosa latente y por lo tanto en riesgo de progresión a enfermedad activa.

La prevalencia de TL entre los contactos de pacientes con TB, se sitúa entre el 35 y el 61%. Porcentaje que se incrementa al aumentar el grupo de edad, excepto para los mayores de 55-65 años debido al debilitamiento de la reacción tuberculínica en el transcurso del tiempo.

La importancia de la TBL radica en el riesgo de reactivación de la infección, favorecida por condiciones como la coinfección con VIH, diabetes, obesidad, insuficiencia renal, tratamientos inmunosupresores, cáncer, recepción de órganos trasplantados y malnutrición, que suprimen al sistema inmunológico propiciando la reactivación de la infección.

Hasta el día de hoy no se cuenta con métodos diagnósticos y/o biomarcadores adecuados para el diagnóstico de TBL, ni marcadores que evalúen el riesgo de progresar a enfermedad activa. De ahí la importancia de utilizar las pruebas biométricas de latencia y la tuberculina para aportar datos cualitativos y cuantitativos a la discusión y análisis que permitan proponer nuevas opciones al diagnóstico temprano y tratamiento oportuno de la TB.

### 3. ANTECEDENTES

Durante los últimos 100 años, la prueba más utilizada para el diagnóstico de la TBA y TBL ha sido la prueba cutánea de hipersensibilidad retardada al Derivado Proteico Purificado (PPD, por sus siglas en inglés). Esta prueba, también conocida como tuberculina (TST por sus siglas en inglés), es aún el principal método utilizado en México para identificar la exposición a *M. tuberculosis*.

La prueba no permite diferenciar entre infección, enfermedad y sensibilización con micobacterias no tuberculosas (MNTs) debido a que el PPD es una mezcla cruda de antígenos, muchos de los cuales son conservados y forman parte de la estructura antigénica de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, BCG y diversas MNTs.

A partir de la última década del siglo pasado, los avances en el campo de la genómica y las técnicas de inmunodetección han permitido el desarrollo de sistemas de diagnóstico basados en la producción de IFN- $\gamma$  por células T estimuladas con ESAT-6 y CFP-10, dos antígenos codificados en la región de diferencia 1 (RD1) que se perdió en la vacuna BCG durante su atenuación y se encuentran casi exclusivamente en el complejo *M. tuberculosis*.

Los ensayos de liberación de interferón gamma (IGRAs por sus siglas en inglés interferon- $\gamma$ -release assays) han surgido como una alternativa para la detección de TB. Se basan en 5 componentes esenciales: Antígenos específicos *M. tuberculosis*; Células presentadoras de antígenos; células T; paso de incubación; y un lector de biomarcador de reconocimiento inmune.

- Antígenos: La especificidad del ensayo con IFN- $\gamma$  se vincula primero con los antígenos. El test comercial utiliza 16 – 26 péptidos de *Mycobacterium tuberculosis*, proteínas ESAT-6, CFP-10 y TB7.7.
- Células presentadoras de antígenos (CPA) expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) con especificidad para

los antígenos de células T. Si los receptores de células T reconocen el antígeno péptido del MHC, ambos, las células T y las CPA se activan. Si la persona a la que se le realiza la prueba tiene un mal ajuste entre genotipos HLA y los antígenos usados en la prueba, el ensayo de IFN- $\gamma$  se espera que se exprese poco.

- Células T: un alto número de células T de memoria central específicas para péptidos presentes en las CPA's garantiza una activación inmune fuerte in vitro, la presencia de células T reguladoras amortiguan esta respuesta.
- Incubación: para que se produzca la activación inmune las células necesitan tiempo y calor por lo que las pruebas comerciales incuban durante 16 – 24 hrs a 37 °C.
- Biomarcador de lectura: las pruebas comerciales monitorean los grados de activación inmune por la medición del ensayo de IFN- $\gamma$ . Si el resultado es más alto que el punto de corte el test se considerará positivo, si hay una pequeña o nula respuesta, el test se interpreta como negativo. Como en cualquier respuesta inmune, varias citoquinas y quimiocinas se expresan como resultado de activación inmune incluyendo la quimiocina IP-10.

Actualmente existen versiones comerciales como el QuantiFERON-TB Gold (Cellestis, Carnegie, Australia) y el T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Oxford, United Kingdom). Estas pruebas de diagnóstico tienen mayor especificidad, especialmente en población vacunada con BCG. Diversos estudios han demostrado que el QuantiFERON-TB no presenta interferencia por la vacunación con BCG y puede diferenciar la infección con *M. tuberculosis* de la sensibilización con MNTs. El Ensayo QuantiFERON-TB-Gold In Tube (QFT-GIT) (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australia) en un sistema comercial que se conforma por 3 tubos donde se coloca la sangre periférica de los individuos; el primer tubo incluye 3 antígenos de *M. tuberculosis* previamente descritos como muy inmunogénicos (ESAT-6, CFP-10 y TB 7.7), otro tubo contiene fitohemaglutinina (un mitógeno inespecífico que sirve como control positivo) y el tercer tubo no contiene ningún reactivo (control negativo). En este ensayo se coloca 1 mL de sangre en cada tubo, y después

de mezclar se coloca en una incubadora a 37°C durante 18-24 horas. Posteriormente se centrifuga para separar el plasma se cuantifican los niveles de IFN- $\gamma$  por el método de ELISA en cada uno de los tubos. La interpretación de este método se basa en la comparación de los niveles de IFN- $\gamma$  del tubo con los diferentes antígenos de M. tuberculosis con aquellos niveles obtenidos en los controles positivo y negativo; el resultado se genera como positivo, negativo o indeterminado.

En países con baja incidencia de tuberculosis como Estados Unidos y Europa Occidental estas pruebas de liberación de IFN- $\gamma$  han permitido comenzar a sustituir la prueba de intradermoreacción con PPD para el diagnóstico de TBL. No obstante, aún se cuestiona el uso de ESAT-6 y CFP-10 como marcadores de latencia, toda vez que estas proteínas también se expresan regularmente durante la fase activa de crecimiento microbiano, por lo que la reactividad hacia estas proteínas constituye de momento un indicador de infección tuberculosa.

Los ensayos de liberación de interferón tiene muchas ventajas sobre el test de tuberculina: la prueba requiere solamente 1 visita del paciente y estos ensayos son pruebas ex vivo lo cual reduce el riesgo de efectos adversos y elimina el potencial incremento cuando se repite la prueba. De cualquier forma los IGRAs tiene importantes desventajas, incluyendo el costo del material requerido en el laboratorio y el requerimiento de la extracción sanguínea con el subsecuente cuidado de mantener viables los linfocitos, además la variabilidad de la prueba cuando se repite después de meses o años no ha sido bien estudiada.

Adicional a IFN- $\gamma$ , muchas citocinas y quimiocinas han sido investigadas como biomarcadores potenciales para infección por M. Tuberculosis y es estado de la enfermedad. Diversos estudios han descrito que los niveles de varias citocinas incluyendo interleucina 6 (IL-6), IL-10, IL-15, proteína 10 inductora de interferón gamma (IP-10) y proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-2), son significativamente mayores en pacientes con TB que en controles sanos, además estos hallazgos sugieren un papel importante en

la patogénesis de la enfermedad no son suficientes para el diagnóstico de tuberculosis activa versus tuberculosis latente por lo que se ha hecho necesario el diseño de un biomarcador con mejor sensibilidad y especificidad para lograr discriminar entre enfermedad activa y latente.

En 2006, Morten Ruhwald, Martine G Aabye & Pernille Ravn proyectaron una serie de citocinas y quimiocinas por su potencial como marcadores de respuesta inmune mediada por células en respuesta a antígenos específicos de *M. tuberculosis* en sobrenadantes de QFT-IT, y encontraron que IP-10 se expresa en grandes cantidades en pacientes con TB activa pero no en controles no expuestos. Existe más evidencia que ha fundamentado este descubrimiento y mas de 40 biomarcadores adicionales han sido estudiados como potenciales métodos diagnósticos. De todos los marcadores investigados pareciera que IP-10 es el que se expresa mas consistentemente en respuesta a la exposición al antígeno.

IP-10, también se conoce como CXCL10, es una quimiocina que actúa a través del receptor CXCR3 y es producida principalmente por macrófagos y fibroblastos y otras células inmunes activadas. La producción de IP-10 es principalmente inducida por IFN- $\gamma$  y como resultado de esto tiene un papel importante en el desarrollo de inmunidad protectora de tipo Th1, promoviendo infiltrados celulares en áreas de infección. IP-10 se induce en respuesta a infecciones por patógenos, en el caso de tuberculosis se ha observado que la expresión de IP-10 aumenta de manera significativa en infección activa. IP-10 se produce en grandes cantidades en pulmón de pacientes con tuberculosis activa (Liu et al., 2011) así como en sangre periférica, lo cual sugiere que puede ser útil como un posible biomarcador de infección por *M. tuberculosis* en sujetos de alto riesgo. Las bases inmunológicas para IP-10 como un marcador de lectura en ensayos de inmunidad mediada por células muestra que IP-10 es una quimiocina pequeña expresada por células presentadoras de antígenos y el conductor principal de la respuesta inmune proinflamatoria. IP-10 se expresa por células infectadas con virus y bacterias pero también puede ser inducida a niveles altos como parte de la respuesta inmune adaptativa. En este caso, la secreción de IP-10 se inicia cuando las células T

reconocen los péptidos específicos presentados por una CPA.

La secreción de IP-10 es usualmente inducida por diversas señales, principalmente la producción de IFN- $\gamma$  por células T, pero también otras citocinas como IL-2, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-27, IL-17, IL-23, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Estudios funcionales han demostrado que TNF- $\alpha$  es un pobre inductor de IP-10 por si mismo pero un potente inductor cuando entra en sinergia con interferones de tipo I o tipo II.

Debido a que la producción de IP-10 se induce por diferentes vías de señalización que se relacionan con la activación y proliferación celular en respuesta a estímulos inflamatorios, esta molécula se considera como un buen indicador de inmunidad mediada por células (CMI) con un comportamiento similar en relación con IL-2 e IFN- $\gamma$ .

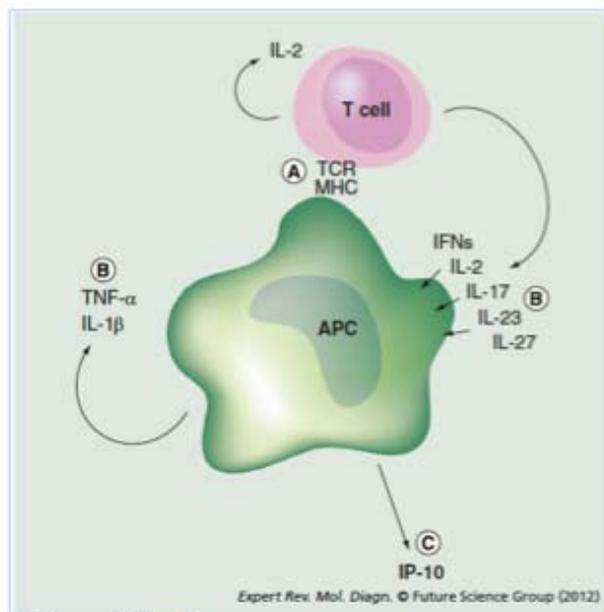


Figura 1. IP-10.

induction through adaptive immuneresponses. (A) T cells recognize Mycobacterium tuberculosis specific peptides on the MHC molecules on the surface of the APCs, and this interaction activates the T cells and also the APCs. (B) T cells and the APCs secrete a series of proinflammatory cytokines, which further activates the APCs and leads to (C) IP-10 secretion from activated APCs. APC: Antigen-presenting cell; IFN: Interferon; TCR: T-cell receptor

Una diferencia importante de IP-10 comparada con los típicos marcadores de respuesta celular como IFN- $\gamma$  e IL-2 es que IP-10 se expresa en niveles mucho más altos y como IP-10 es una molécula 2.5 veces mas pequeña que IFN- $\gamma$  ( 7.4 vs 18.8

kD), esta diferencia es aún mayor a nivel molecular cuando se determina con tecnología de fase solida como un ELISA o pruebas de inmunoprecipitación.

Estudios previos han sugerido que IP-10 podría ser un bio-marcador de utilidad para complementar las pruebas de producción de IFN- $\gamma$  en sujetos con tuberculosis latente. Otros estudios han demostrado que los antígenos derivados de *M. tuberculosis* inducen de manera significativa la producción de IP-10 la cual parece ser diferente en sujetos con tuberculosis activa y tuberculosis latente, sin embargo se han encontrado resultados

contradictorios. Jeong y colaboradores den 2015 demostraron que IP-10 se produce en mayor cantidad en cultivos de células mononucleares de sangre periférica aisladas de pacientes con tuberculosis active en relación con células de sujetos con tuberculosis latente. (Jeong and others 2015). Por otro lado, el efecto del tratamiento con fármacos anti-tuberculosis como rifampicina, isoniazida, etambutol, entre otros no se ha evaluado de manera clara y hasta la fecha no se sabe con certeza si los niveles de IP-10 son afectados por el uso del tratamiento.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

La tuberculosis es un problema de salud que afecta a 9.2 millones de personas anualmente de los cuales el 80% proviene de los países en vías de desarrollo, con más de 2 millones de fallecimientos. En México se registran anualmente un estimado de 15,000 casos nuevos de TB y alrededor de 2,000 defunciones, con un promedio de edad de fallecimiento de 54 años.

En base a la prueba de tuberculina se estima que un tercio de la población mundial tiene una infección tuberculosa latente y por lo tanto en riesgo de progresión a enfermedad activa.

La prevalencia de tuberculosis latente entre los contactos de pacientes con TB, se sitúa entre el 35 y el 61%. Porcentaje que se incrementa al aumentar el grupo de edad, excepto para los mayores de 55-65 años. Este resultado se le atribuye al debilitamiento de la reacción a tuberculina en el transcurso del tiempo.

En México se sigue utilizando la prueba de la tuberculina para la caracterización de los pacientes con TBL, sin embargo esta carece de sensibilidad y especificidad adecuadas. Si bien existen otras pruebas como los IGRA's, no están disponibles en los centros asistenciales de salud del país, ni se han desarrollado estudios locales que aporten información sobre su utilidad, por lo que es importante realizar investigaciones para difundir la conveniencia y los aportes de estas pruebas en nuestra población.

Hasta el día de hoy no se cuenta con métodos diagnósticos y/o biomarcadores adecuados para el diagnóstico de TBL, ni marcadores que evalúen el riesgo de progresar a enfermedad activa. De allí la importancia de utilizar las pruebas biométricas de latencia y la tuberculina para aportar datos cualitativos y cuantitativos a la discusión y análisis que permitan proponer nuevas opciones al diagnóstico temprano y tratamiento oportuno de la TB. Por lo anterior en este trabajo realizamos ensayos de estimulación de células mononucleares de sangre periférica con antígenos de *M. tuberculosis* incluidos en el ensayo de QuantiFERON TB Gold de individuos de alto riesgo, contactos de pacientes con TB pulmonar activa. Adicionalmente cuantificamos los niveles de IFN- $\gamma$  e IP-10 para evaluar la correlación entre los niveles de estas moléculas y buscando la posible utilidad de IP-10 como un biomarcador adicional para diagnóstico de TB latente.

## **5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Podrían las moléculas de respuesta inmune ser indicadores de tuberculosis latente en contactos cercanos de pacientes con tuberculosis pulmonar?

## **6. HIPÓTESIS**

Los valores elevados de IP-10 en contactos sanos de pacientes con TB es un indicador de infección latente por *M. tuberculosis*.

## **7. OBJETIVOS**

### **7.1 Principal**

Evaluar el perfil de producción de la quimiocina IP 10 en respuesta a antígenos de latencia de *M. Tb* y correlacionar con la presencia de pruebas de quantiferon y PPD.

### **7.2 Específicos**

Evaluar los niveles de producción de IP-10 en contactos cercanos de pacientes con tuberculosis pulmonar activa.

Correlacionar los niveles de IP-10 con los niveles de IFN- $\gamma$  y con los resultados de PPD.

## **8. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **8.1 Lugar del estudio.**

El estudio se realizó en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) en la Ciudad de México. Se realizó el estudio de contactos establecido por la Norma Oficial Mexicana para la prevención y control de la tuberculosis (NOM-006-SSA2-2013) por parte del personal de la Clínica de Tuberculosis del INER.

Se realizaron los estudios de laboratorio (biometría hemática, química sanguínea, PFH, perfil lipídico, EGO) en el laboratorio clínico del INER, además de una prueba para HIV en el Banco de sangre del INER. Se aplicó y se dio lectura de la prueba de tuberculina por parte del personal del área de Epidemiología del INER.

### **8.2 Tamaño de muestra:**

Se calculó el tamaño de la muestra considerando la prevalencia de tuberculosis latente reportada por la OMS y con un nivel de confianza al 95%.

El numero necesario de sujetos a estudiar, tomando en consideración perdidas del 10% fue de 90 sujetos.

### **8.3 Descripción de la población de estudio**

Se reclutaron contactos domiciliarios de casos de Tuberculosis pulmonar Activa en los primeros dos meses de diagnostico establecido mediante cultivo positivo con desarrollo de *M. tuberculosis* con pruebas de farmacosensibilidad.

#### **8.3.1 Criterios de inclusión:**

1. Sujetos mayores de edad (18 a 54) dispuestos a firmar la carta de consentimiento.
2. Sujetos en contacto cercano con el caso índice de tuberculosis pulmonar activa

3. Sujetos dispuestos a proporcionar las muestras de sangre necesaria para participar en el estudio.

### **8.3.2 Criterios de exclusión:**

1. Sujetos que no cuenten con los estudios de laboratorio necesarios para participar en el estudio.
2. Sujetos que no se realicen la prueba de tuberculina.
3. Contactos de pacientes con tuberculosis extrapulmonar

### **8.3.3 Criterios de eliminación:**

1. Pacientes con datos de tuberculosis activa.
2. Sujetos con prueba de VIH positiva

## **9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los valores se expresarán en dispersiones y medias  $\pm$  desviaciones estándar. Para la comparación entre cada grupo experimental los valores de  $p < 0.05$  se considerarán significativos aplicando la prueba de U de Mann-Whitney con el programa GraphPad Prism versión 5.

## **10. IMPLICACIONES ÉTICAS**

Se realizó el reclutamiento durante las consultas de los médicos participantes en la clínica de tuberculosis del INER. A los sujetos sanos que conviven con pacientes con tuberculosis pulmonar activa, se les invitó de manera directa para participar en el estudio y se les solicitó su consentimiento por escrito antes de realizar estudios. El proyecto fue aprobado por el comité de ciencia y Bioética en investigación mediante el código E0215

Después de dar el consentimiento informado, se realizó un examen físico completo a cada contacto, durante la evaluación se llenó un cuestionario de salud respiratorios (AIRE). Se obtuvieron 50 ml de sangre venosa completa mediante venopunción, a fin de realizar estudios de laboratorio (Biometría hemática, química sanguínea, PFH, perfil lipídico, HbA1c), quantiferon y

realización de biomarcadores. Se solicitó una muestra de orina para examen general de orina y se aplicó prueba de tuberculina.

## **11. PRUEBAS REALIZADAS**

- 11.1 Radiografía de Tórax:** Como parte del estudio de contactos se realizó una radiografía de tórax PA la cual se evaluó por el médico a cargo de la valoración de los contactos.
- 11.2 Venopunción:** A todos los participantes se les extrajo una muestras de sangre para investigación (50 ml) en el momento que se realizó la venopunción para los estudios de rutina en el laboratorio clínico del INER.
- 11.3 Prueba de tuberculina:** A todos los contactos se realizó la aplicación de PPD (Derivado proteico purificado) previo a la toma de muestra inicial para evitar el posible efecto de la aplicación del PPD sobre la expresión de genes. Se aplicó 0.1mL (5UT) de tuberculina (Turbesol, Canadá) por vía intradérmica en la cara antero externa del antebrazo izquierdo en la unión del tercio superior con el tercio medio. Se consideró positivo un diámetro de induración mayor a 10 mm a las 72 hrs.
- 11.4 Ensayo QuantiFERON-TB Gold In-Tube** El ensayo de QuantiFERON-TB Gold in Tube (QFTGIT) se realizó de acuerdo con las instrucciones del productor (QuantiFERON-TB Gold In-Tube, Cellestis Ltd., Carnegie, Australia). Brevemente, se obtuvo sangre periférica de cada individuo y se colocó 1 mL en cada uno de los tres tubos los cuales contienen (Tubo 1: antígenos CFP-10, ESAT-6, TB 7.7; Tubo 2: Mitógeno fitohemaglutinina, control positivo; Tubo 3: Control negativo). Después de mezclar adecuadamente y de forma gentil, los tubos se colocaron en una incubadora marca Thermo Scientific, a 37°C durante 24 horas. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 3,000 r.p.m. durante 10 min con la finalidad de aislar el plasma. Los plasmas se recolectaron y se congelaron a -20 °C. Posteriormente se cuantificaron los niveles de IFN- $\gamma$  por el método de ELISA. La concentración de IFN- $\gamma$  se obtuvo mediante la lectura de la

densidad óptica a 450 nm y con un filtro de 620 nm como referencia en un equipo lector de ELISA (Bio-Rad). Los resultados se interpretaron en base a la DO obtenida la cual se resta del control positivo, los resultados se expresaron como positivo, negativo o indeterminado con el uso del programa de interpretación QFTGIT desarrollado por la compañía (QFTGIT, Cellestis Ltd., Carnegie, Australia). Todos los ensayos de QuantiFERON TB Gold se realizaron en el Departamento de investigación en Inmunología del INER.

**11.5 Ensayo de cuantificación de IP-10 por ELISA** La concentración de IP-10 en sobrenadantes se cuantificó por el método de ELISA con el sistema comercial (Human CXCL10/IP-10 Immunoassay marca R&D, Minneapolis, MN, USA). Este ensayo se realizará por duplicado con 100 ul de muestra de plasma de sangre estimulada con antígenos ESAT-6 y CFP10 que resultan del ensayo de Quantiferon TB Gold. Este es un ensayo de ELISA tipo sándwich con anticuerpos anti-IP-10 que recubren los pozos de la placa. Se adiciona 100 ul de muestra por duplicado, se incuba 1h a 37°C y se lava con PBS y posteriormente se agregó el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa. Se incubó 1 hr a temperatura ambiente y se adiciona el sustrato para generar color. La absorbancia de la muestra se midió a 540 nm de longitud de onda en un equipo lector de placas de ELISA.

## 12. RESULTADOS

Se reclutaron 47 sujetos contactos cercanos de pacientes con diagnóstico de tuberculosis en fase intensiva de tratamiento, de los cuales el 61% corresponde a personas del género femenino y 39% fueron hombres, todos los sujetos mayores de edad quienes viven y se relacionan de forma directa con el caso índice. La edad promedio fue de 39 años, 40% de los participantes se encuentran ubicados entre la tercera y cuarta década de la vida y 90% de ellos refirieron pasar más de 6 hrs en contacto con el caso índice, **Tabla 1**.

La escolaridad de los participantes en el 70% es de educación primaria completa esto se explicaría por vivir en la ciudad y tener mayor acceso a la educación y esto también permite asumir un mejor entendimiento de las instrucciones dadas para el tratamiento del caso índice y de las medidas preventivas que como población en riesgo deberían de adquirir y quizá de esta manera aumentar la prevención de contagio.

En relación a los resultados de laboratorios clínicos no se encontraron anomalías significativas en la mayoría de pacientes sin embargo en 1 paciente se documentaron niveles muy altos de glucosa sérica y hemoglobina glucosilada que evidenciaron mal control de la diabetes mellitus, se encontró también un paciente con falla renal aparentemente de evolución crónica por lo que se realizó referencia a hospital de segundo nivel para su abordaje diagnóstico.

En el examen físico realizado a los participantes, no se encontraron datos clínicos de tuberculosis en ninguno de ellos, sin embargo en una persona se identificó hipoxemia moderada sin comorbilidades conocidas por lo que fue necesario efectuar apertura expediente en el instituto y estudiar causas de este hallazgo.

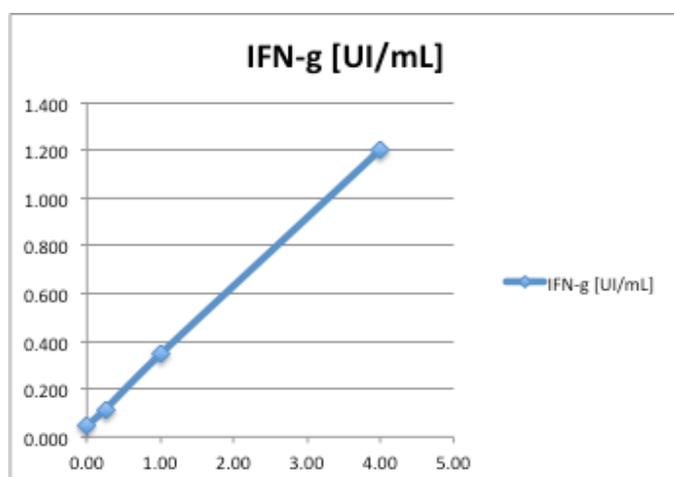
En los estudios radiológicos se documentaron lesiones calcificadas en el 25% de las radiografías realizadas a los participantes. No se encontraron personas

con síntomas respiratorios (tos con expectoración por mas de 2 semanas) y/o radiografía de tórax sugestiva de tuberculosis pulmonar activa por lo que no fue necesario solicitar baciloscopías ni cultivos de expectoración y tampoco fue necesaria la referencia de pacientes para tratamiento en centros de salud de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana.

Se documentó por estudio de laboratorio un paciente con infección por HIV por lo que se refirió al servicio medico correspondiente para mayor estudio y seguimiento y fue eliminado del estudio previo a ser referido para recibir tratamiento por latencia debido al riesgo que esta población tiene así como a la paciente con mal control glucémico.

Se diagnosticó TBL de acuerdo a la Oficial Mexicana para la prevención y control de la tuberculosis (NOM-006-SSA2-2013), en el 85% de los sujetos participantes. Mediante el análisis de QuantiFERON TB Gold In Tube, encontramos que el 65% de los contactos de pacientes con TB activa tienen resultados positivos. El 38.2% tubo pruebas positivas de QuantiFERON y PPD, 27.6% tuvieron prueba positiva QuantiFERON y prueba negativa de PPD y 17.0 % tuvieron prueba negativa de QuantiFERON y prueba positiva PPD. El 17.0% de los contactos fueron QuantiFERON negativo PPD negativo, **Tabla 1, Tabla 2.**

En el **Gráfico 1** se muestra el resultado de la curva de calibración de la cuantificación de IFN- $\gamma$  por ELISA, lo cual muestra un buen control de calidad de los resultados obtenidos.



**Gráfico 1.** Curva de calibración de la cuantificación de IFN- $\gamma$  por ELISA.

Tabla 1. Datos demográficos de los individuos con pruebas de IGRA (QuantiFERON TB Gold in Tube) y PPD.

	Resultados para			
	Latencia			Sano
	PPD + IGRA +	PPD – IGRA +	PPD + IGRA -	PPD – IGRA -
Genero (F/M)	10/8	9/4	6/2	7/1
Edad (Med)	43	38	24	41
Cicatriz de BCG	18	12	8	7

Tabla 2. Criterios técnicos utilizados para la interpretación de la prueba de QuantiFERON TB Gold In Tube.

QuantiFERON®-TB Gold IT

Blanco <sup>1</sup> [IU/ml]	Antígenos TB menos blanco [IU/ml]	Mitógenos menos blanco [IU/ml]	Resultado del QuantiFERON®-TB Gold IT	Informe/Interpretación
<= 8,0	< 0,35	>= 0,5	Negativo	Infección por <i>M. tuberculosis</i> IMPROBABLE
	>= 0,35 y < 25% del valor blanco	>= 0,5		
	>= 0,35 y >= 25% del valor blanco	Cualquiera	Positivo	Infección por <i>M. tuberculosis</i> PROBABLE
	< 0,35	< 0,5	Indeterminado	Resultados relativos a la respuesta de Antígenos TB INDETERMINADOS
>= 0,35 y < 25% del valor	< 0,5			
> 8,0	Cualquiera	Cualquiera		

<sup>1</sup>Para que los resultados del QuantiFERON®-TB Gold en tubo de un sujeto se consideren válidos, la medición del tubo blanco (o de nulos) ha de ser <= 8,0 IU/ml y los mitógenos - nulo, de >= 0,5 IU/ml O los antígenos TB - blanco debe ser >= 0,35 IU/ml.

Los ensayos de estimulación *in vitro* mostraron que la estimulación con antígenos de *M. tuberculosis* inducen niveles importantes de IFN- $\gamma$  (promedio 1400 pg/mL +/- 400 pg/mL). Adicionalmente se observó que las células aisladas de sujetos con TB latente, contactos de pacientes con TB activa producen niveles muy elevados de IP-10 después de la estimulación con antígenos de *M. tuberculosis* (CFP-10, ESAT-6 y Ag Mtb 7.7), **Gráfico 2**. Esta producción de IP-10 fue significativamente más elevada que la de IFN- $\gamma$  en estos ensayos. Es importante mencionar que se observó el mismo

comportamiento en la producción de IFN- $\gamma$  e IP-10. Lo anterior apoya la hipótesis de que IP-10 podría ser un buen indicador adicional a IFN- $\gamma$  de la infección latente por *M. tuberculosis*.

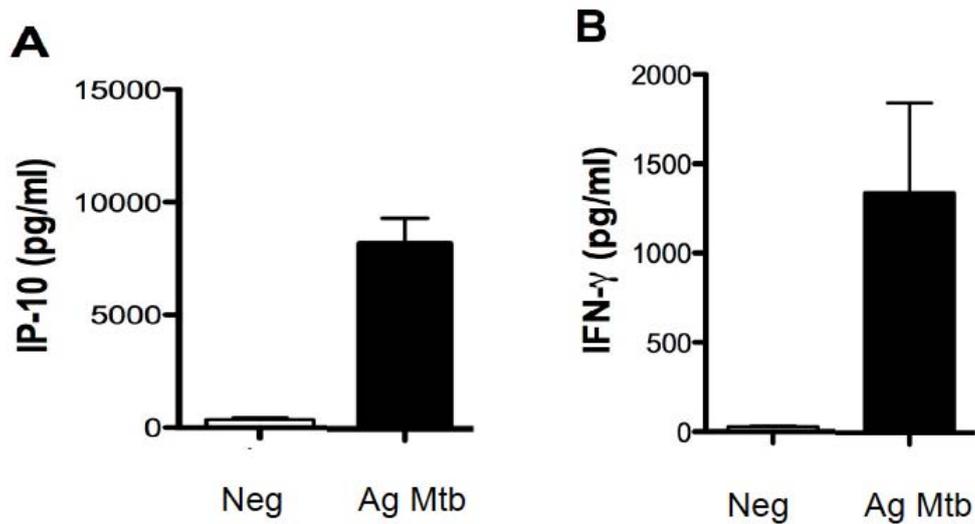


Gráfico 2. Resultados de la cuantificación de IFN- $\gamma$  e IP-10 en individuos contactos de pacientes con TB activa.

### 13. DISCUSIÓN

La tuberculosis (TB) es un problema de salud pública a nivel mundial, particularmente con mayor prevalencia en países subdesarrollados, es la principal causa de muerte en todo el mundo. El impacto global de la TB ha continuado a pesar de los programas de vacunación con *M. tuberculosis* y de la disponibilidad de antibióticos antimicobacterianos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que un tercio de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis* y entre el 2000 y 2020, cerca de un billón de personas se infectarán, 200 millones de personas desarrollarán la enfermedad, y se calculan 35 millones de fallecimientos asociados a TB en ese periodo (OMS, 2011).

Se calcula que por año aparecen entre 8 a 10 millones de casos nuevos de TB pulmonar (TBP) y que se producen aproximadamente 1.6 millones de fallecimientos anuales asociados a TBP (Skamene E., et al. 1998). En México, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), ha reportado una tasa de incidencia de TB pulmonar y de 13.5 casos/100,000 habitantes en el 2007 y 14,422 casos nuevos en ese año, sin embargo, existen estados de la república que tienen tasas de incidencia por encima del promedio nacional (Boletín del Sistema de Vigilancia Epidemiológica, 2008, 1ª y 2ª parte).

Aproximadamente el 10% de los individuos con tuberculosis latente (TBL) desarrollan TB activa (TBA) y el otro 90% permanecen asintomáticos (ATS y CDC, 2000). La progresión clínica de TB resulta de la interacción entre el medio ambiente, el huésped y las características patogénicas de la cepa de *Mtb* (Yim J., 2010; Kaufmann S., 2001). El diagnóstico de TB pulmonar se basa en hallazgos radiológicos, clínicos, antecedentes de exposición a *M. tuberculosis*, así como la prueba de tuberculina y el aislamiento en cultivo de *Mtb*. En la mayoría de las personas infectadas, la *Mtb* se encuentra en forma latente, contenida en los pulmones en forma de granulomas (Pai M, et al., 2008). Algunos factores que contribuyen con este mayor riesgo son inherentes a un sistema inmune inmaduro o las deficiencias inmunológicas relacionadas con la edad (Swaminathan S, Rekha B., 2010).

En los últimos años, los ensayos de liberación de interferón-gamma (IGRA, por sus siglas en inglés) se han usado ampliamente como herramientas de diagnóstico de TB. Sin embargo, los IGRA no permiten discriminar entre TBL y TBA (Mazurek G, et al., 2010). En este contexto, se ha sugerido que IP-10 podría ser útil para determinar la infección latente por Mtb en sujetos de alto riesgo y que podría ser un biomarcador adicional a IFN- $\gamma$  en los IGRA (Whittaker E, et al., 2008; Lighter J, et al., 2009; Borgström E, et al., 2012; Alsleben N, et al., 2012). IP-10, también conocida como CXCL10 es una quimiocina que actúa a través del receptor CXCR3 y es liberada por macrófagos, fibroblastos y otras células, se produce en respuesta a IFN- $\gamma$  y tiene un papel importante en el desarrollo de la inmunidad antimicrobiana Th1 y promueve infiltrados de células inflamatorias en sitios de infección. IP-10 se produce en mayor cantidad en comparación con el IFN- $\gamma$  en respuesta a los patógenos micobacterianos (Liu M, et al., 2011; Pan H, et al., 2005).

Además, el papel del tratamiento anti-Mtb en la producción de IP-10 sigue siendo poco clara. Wang Y. y colaboradores demostraron que la liberación de IP-10 en un grupo de pacientes con tuberculosis fue significativamente mayor que en el grupo de enfermedades pulmonares no tuberculosas ( $p < 0.001$ ) y el grupo control sano ( $p < 0.001$ ). La prueba de IP-10 detecta más casos de tuberculosis pulmonar y de tuberculosis extra-pulmonar que el examen por microscopía ácido-alcohol resistente. La sensibilidad, especificidad y eficacia diagnóstica para IP-10 fueron 75,3%, 84,9% y 79,7%, respectivamente.

Los pacientes con TB con comorbilidad de cáncer producen niveles significativamente más altos de IP-10-TB específica en comparación con los otros grupos ( $p < 0.05$ ), mientras que los pacientes con enfermedades respiratorias producen niveles más bajos que los controles sanos ( $p > 0.05$ ).

En este estudio analizamos la producción de IP-10 e IFN- $\gamma$  después de la estimulación con antígenos de *M. tuberculosis* para evaluar si existe una correlación entre la producción de estos mediadores inmunológicos y

adicionalmente que nos permitan distinguir individuos con enfermedad latente. Los resultados más significativos fueron que el 65 % de los individuos contactos de pacientes con TB activa tienen pruebas de QuantiFERON positivas y que la producción de IP-10 es mucho más elevada que la de IFN- $\gamma$  en ensayos de estimulación *in vitro*.

Es importante recalcar que la producción de IP-10 fue significativamente mayor (8,200 pg/mL) en relación con la producción de IFN- $\gamma$  (1,400 pg/mL), lo cual apoya la hipótesis de que IP-10 podría ser un biomarcador útil para complementar las pruebas de producción de IFN- $\gamma$  para el diagnóstico de tuberculosis latente. En este sentido diversos estudios han demostrado que la producción de IP-10 incluso permite distinguir entre individuos con TB latente y TB activa. En este trabajo Jeong y colaboradores en 2015 mostró una mayor producción de IP-10 en ensayos de estimulación *in vitro* de células de sujetos con TB activa en relación con latentes. (Jeong and others 2015). En nuestro trabajo no incluimos pacientes con TB activa, sin embargo los niveles de producción de ambas moléculas fue detectable.

Originalmente IP-10 se describió como una quimiocina pro-inflamatoria importante en el tráfico celular con un efecto crítico en la activación de células Th1 CD4+ así como de linfocitos B, monocitos/macrófagos, células NK y células dendríticas (Sallusto y cols 1998). Esas células activadas ejercen efectos reguladores o efectores a través de la vía CXCR3/IP-10 para regular la respuesta inmune innata y adaptativa en contra de patógenos diversos, incluyendo micobacterias (Liu y cols 2011; Neville y cols 1997). Las alteraciones en la producción de IP-10 tanto a nivel de expresión de RNAm como de proteína se han asociado con mayor susceptibilidad a infecciones por virus, bacterias, hongos y cáncer. Como se ha mencionado IP-10 se produce en etapas tempranas de la respuesta contra patógenos.

En modelos experimentales de infección los niveles de IP-10 descienden rápidamente después de la eliminación del patógeno con antibióticos (Salvatore y cols 2009).

Adicionalmente, en previos estudios se ha demostrado que tanto la respuesta innata como adquirida se pueden estimar con la finalidad de diagnosticar la infección latente por *M. tuberculosis* (Feris y cols 2016). Basado en esto, se ha sugerido que la estimación de la proliferación de células T contra antígenos de *M. tuberculosis* y los niveles de IgG anti-PPD, así como la inclusión de IP-10 y TNF- $\alpha$  podrían ser de mucha utilidad para el diagnóstico preciso de Tb latente. Este trabajo apoya el importante papel de IP-10 como un potencial indicador de TB latente.

## 14. CONCLUSIONES

- El 65 % de los contactos de pacientes con TB activa tienen resultados de QuantiFERON positivos.
- La quimiocina IP-10 se produce en cantidades significativas en ensayos de estimulación in vitro con antígenos de M. tuberculosis.
- En general la producción de IFN- $\gamma$  tienen el mismo patrón de producción que IP-10, sin embargo esta última se produce en mucho mayor cantidad en relación con IFN- $\gamma$ .
- Nuestros datos sugieren que IP-10 es un marcador reproducible y útil para el diagnóstico de TB latente.

## 15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Global tuberculosis control 2011. France, World Health Organization, 2011 (WHO/HTM/TB/2011.16).
- 2 Skamene E, Schurr E, Gros P. Infection Genomics: Nramp1 as major determinant of natural resistance to intracellular infections. *Annu Rev Med* 1998; 49:275–287.
- 3 Boletín del Sistema de vigilancia epidemiológica. Tuberculosis en México, 1ª parte. 2008, 13, 1-3.
- 4 Boletín del Sistema de vigilancia epidemiológica. Tuberculosis en México, 2ª parte. 2008, 14, 1-4.
- 5 American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(4 Part 1):1376–9.
- 6 J.J. Yim, P. Selvaraj. Genetic susceptibility in tuberculosis. *Respirology*. 2010; 15:241-56.
- 7 S.H. Kaufmann. How can immunology contribute to the control of tuberculosis?. *Nat Rev Immunol*. 2001;1:20-30.
- 8 Pai M, Zwerling A, Menzies D, Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med* 2008; 149:177-1784.
- 9 Swaminathan S, Rekha B. Pediatric tuberculosis: global overview and challenges. *Clin Infect Dis* 2010; 50 Suppl 3:S184-194.
- 10 Mazurek GH1, Jereb J, Vernon A, LoBue P, Goldberg S, Castro K; IGRA Expert Committee; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect Mycobacterium tuberculosis infection - United States, 2010. *MMWR Recomm Rep*. 2010 Jun 25;59(RR-5):1-25.
- 11 Pan H, Yan BS, Rojas M, Shebzukhov YV, Zhou H, Kobzik L, et al. Ipr1 gene mediates innate immunity to tuberculosis. *Nature* 2005; 434:767–772.

- 12 Whittaker E, Gordon A, Kampmann B. Is IP-10 a better biomarker for active and latent tuberculosis in children than IFN $\gamma$ ? PLoS One. 2008;3(12):e3901.
- 13 Lighter J1, Rigaud M, Huie M, Peng CH, Pollack H. Chemokine IP-10: an adjunct marker for latent tuberculosis infection in children. Int J Tuberc Lung Dis. 2009 Jun;13(6):731-6.
- 14 Borgström E1, Andersen P, Atterfelt F, Julander I, Källenius G, Maeurer M, Rosenkrands I, Widfeldt M, Bruchfeld J, Gaines H. Immune responses to ESAT-6 and CFP-10 by FASCIA and multiplex technology for diagnosis of M. tuberculosis infection; IP-10 is a promising marker. PLoS One. 2012;7(11):e43438.
- 15 Alsleben N1, Ruhwald M, Rüssmann H, Marx FM, Wahn U, Magdorf K. Interferon-gamma inducible protein 10 as a biomarker for active tuberculosis and latent tuberculosis infection in children: a case-control study. Scand J Infect Dis. 2012 Apr;44(4):256-62.
- 16 Liu M, Guo S, Hibbert JM, Jain V, Singh N, Wilson NO, Stiles JK. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. Cytokine Growth Factor Rev. 2011 Jun;22(3):121-30.
- 17 Wang Y, Yang Y, Li H, Liang Y, Liu J, Yu T, Wu X. Evaluation of a Whole Blood Chemiluminescent Immunoassay of Interferon-gamma Inducible Protein 10 (IP-10) for Diagnosis of Tuberculosis Patients. Clin Lab. 2016;62(1-2):165-72.
- 18 Jiménez et al., J Interferon Cytokine Res, In press.
- 19 Morten Ruhwald, Martine G Aabye & Pernille Ravn (2012) IP-10 release assays in the diagnosis of tuberculosis infection: current status and future directions, Expert Review of Molecular Diagnostics, 12:2, 175-187, DOI: 10.1586/erm.11.97



25. Durante la semana pasada, Cuantos días el contacto se encontró con la persona con Tuberculosis  Sí;  No;  0

26. Durante la semana pasada, Cuál fue el tiempo máximo que el contacto estuvo en contacto con la persona con Tuberculosis? Horas

Minutos

27. El contacto duerme en la misma vivienda que la persona con Tuberculosis:  Sí;  No;  0

28. El contacto duerme en el mismo cuarto que la persona con Tuberculosis:  Sí;  No;  0

29. El contacto duerme en la misma cama que la persona con Tuberculosis:  Sí;  No;  0



#### ANTECEDENTES PERSONALES

30. Ingesta de bebidas alcohólicas (Mayor De 8 Años):  Sí;  No;  0

31. Edad inicio el consumo de bebidas alcohólicas:   Años

32. Ha ingerido bebidas alcohólicas en los últimos 12 Meses  Sí;  No;  0 (Si es NO pase a la pregunta 36)

33. Tipo De Bebida     1. Vino De Mesa; 2. Cerveza; 3. Destilados; 4. Pulque; 5. Alcohol Puro; 6. Otras

34. En Este Período ¿Cuál Fue La Frecuencia De Consumo?

1. Más De 3 Veces Por Semana
2. Una a 3 veces por semana
3. Una a 3 veces por mes
4. Una a 11 veces por mes
5. Una vez al año

36. Tabaquismo (Mayor De 8 Años)  Sí;  No;  0

37. Actualmente el sujeto fuma  Sí;  No;  0 (Actualmente\* Significa Cualquier Cantidad De Cigarrillos En Los Últimos 30 Días)

38. Edad a la que empezó a fumar regularmente:   años (Regularmente\* Significa Por Lo Menos 1 Cigarrillo Cada 30 Días)

39. ¿Cuántos cigarrillos fuma al día:   Cigarrillos/día 40. IT   paquete

41. En el último mes, el sujeto utilizó alguna droga o estimulante que no sea por prescripción médica  Sí;  No;  0 (Si es NO, pase a la pregunta 43)

42. Que droga ha utilizado:    1. Solventes Inhalados; 2. Marihuana; 3. Cocaína; 4. Heroína; 5. Otros: \_\_\_\_\_

43. Ha utilizado carbón o leña en casa para cocinar y/o calentar la casa por mas de 6 meses:  Sí;  No;  0 (Si es NO, pase a la pregunta 47)

44. Durante cuanto tiempo utilizo carbón o leña para cocinar o calentar la casa:   Años

45. Cuantas horas al día en promedio esta expuesto al humo de carbón o leña:   Horas 46. IEHL   Hrs/año

47. Cuenta Con Agua Intradomiciliaria  Sí;  No;  0

48. Que tipo de agua utiliza para consumo en casa:   1. Hervida; 2. Comercial (garrafón); 3. Agua de grifo; 4. Otro: \_\_\_\_\_

49. Alguna vez en la vida el contacto ha tomado Leche cruda, leche bronca, leche de cabra, leche de establo, u otro tipo de leche NO pasteurizada  Sí;  No;  0

50. Alguna vez en la vida el contacto ha consumido, crema fresca NO pasteurizada:  Sí;  No;  0

51. Alguna vez en la vida el contacto ha consumido, queso fresco:  Sí;  No;  0

52. Antecedente De Vacunación Por BCG  Sí;  No;  0

53. Antecedente De Realización De PPD  Sí;  No;  0

51. Resultado  Positivo;  Negativo;  0

54. Antecedente De Vacunación el último año  Sí;  No;  0 Especifique \_\_\_\_\_

#### ENFERMEDADES CONCOMITANTES

55. Diabetes  Sí;  No;  0

56. Hipertensión Arterial  Sí;  No;  0

57. Cirrosis Hepática  Sí;  No;  0

58. EPÓC  Sí;  No;  0

59. Insuficiencia Renal  Sí: 1, No: 0  
 60. Tratamiento Con Esteroides  Sí: 1, No: 0  
 61. Otras Enfermedades  Sí: 1, No: 0

Especifique: \_\_\_\_\_



62. El Contacto, ha estado tomando algún tipo de tratamiento.  Sí: 1, No: 0 Cual? \_\_\_\_\_

#### DIABETES MELLITUS

63. Año De Diagnóstico

64. Tiempo De Evolución (Años)

65. Complicaciones Crónicas (Especificar Tipo Y Estado): \_\_\_\_\_

66. Tratamiento Establecido:

1. Sin Tratamiento

2. Hipoglucemiantes Orales (Especificar Tipo Y Dosis): \_\_\_\_\_

3. Insulina (Tipo Y Dosis): \_\_\_\_\_

67. Tiempo De Inicio Del Último Tratamiento:

#### ESTATUS CLÍNICO (Síntomas durante las últimas 2 semanas)

68. Tos  Sí: 1, No: 0

69. Expectoración  Sí: 1, No: 0

70. Hemoptisis  Sí: 1, No: 0 Cantidad  En Mililitros

71. Disnea  Sí: 1, No: 0 Mnrc

0. Disnea sólo ante actividad física muy intensa;

1. Disnea al andar muy rápido o al subir un cuesta poco pronunciada;

2. Incapacidad de andar al mismo paso que otras personas de la misma edad;

3. Disnea que obliga a parar antes de los 100 m, a pesar de caminar a su paso y en terreno llano;

4. Disnea al realizar mínimos esfuerzos de la actividad diaria como vestirse o que impiden al paciente salir de su domicilio

72. Fiebre  Sí: 1, No: 0

73. Diaforesis Profusa Nocturna  Sí: 1, No: 0

74. Cefalea  Sí: 1, No: 0

75. Mialgias  Sí: 1, No: 0 Artralgias  Sí: 1, No: 0

76. Pérdida De Peso (Referida Por El Sujeto)  Sí: 1, No: 0 Cantidad En Kg: \_\_\_\_\_ Tiempo: \_\_\_\_\_

77. Dolor Torácico  Sí: 1, No: 0

78. Otros \_\_\_\_\_

#### EXPLORACION FISICA

79. Peso  Kg

80. Talla  Cm

81. IMC:

82. TA  /  mmHg

83. FC  Por Min.

84. FR  Por Min.

85. Temperatura:  °C

86. Sat O<sub>2</sub>  %

87. Perímetro De Cuello:  cm

88. Examinar Físicamente Cada Brazo Del Sujeto Para Buscar Cicatrices De La Vacuna  0. Cicatriz Ausente

1. Cicatriz Presente

89. Número de cicatrices:  Brazo derecho  Brazo izquierdo



## 16.2 CONSENTIMIENTO INFORMADO



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS  
ISMAEL COSÍO VILLEGAS  
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN



**ESTUDIO: Evaluación de la frecuencia de tuberculosis latente en contactos sanos y su asociación con marcadores inmunológicos de latencia.**

### **CARTA DE CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN**

*Investigador principal: Marcela Muñoz Torrico*



Estimado Señor o Señora, se le hace una cordial invitación para participar en este estudio.

Este formulario forma parte de un proceso de consentimiento informado para un estudio de investigación, cuyo objetivo es proporcionarle información útil para decidir si desea o no participar voluntariamente en este estudio. Por favor, tome todo el tiempo que sea necesario para leer este formato, preguntar a la persona que le brinda este documento, al responsable del proyecto de investigación (Dra. Marcela Muñoz) o incluso usted puede consultarlo con alguien de su confianza.

Una vez que usted haya leído el formulario, y se hayan respondido todas sus preguntas, si desea participar en este estudio de investigación se le pedirá que firme este documento y se le entregará una copia del mismo.

Es importante que sepa que la decisión de participar en este estudio no afectará la atención médica que usted o su familiar recibe en este instituto, ni tampoco está renunciando a ninguno de sus derechos legales por firmar este formulario de consentimiento.

#### **Patrocinador del estudio:**

El patrocinador de este estudio de investigación es el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

*A continuación se le presentan una serie de preguntas y respuestas sobre el proyecto, que lo guiarán para saber si desea o no participar en el estudio.*

#### **1. ¿Por qué se lleva a cabo este estudio?**

Este estudio se lleva a cabo porque la tuberculosis es una enfermedad infecciosa, que representa un serio problema de salud pública y para llevar a cabo el control de la enfermedad es necesario diagnosticar y tratar a los pacientes con tuberculosis y realizar un estudio de los contactos en riesgo de adquirir la infección. Los contactos de pacientes con tuberculosis activa pueden contraer la infección por inhalación de pequeñas gotitas cargadas de bacilos, que los pacientes enfermos exhalan al toser, sin embargo solo 5-10% de los casos desarrollan tuberculosis primaria progresiva. El 90 a 95% de los contactos desarrollan tuberculosis latente, un estado que se caracteriza por la ausencia de síntomas clínicos y radiológicos de enfermedad activa. La tuberculosis latente puede progresar a tuberculosis activa dependiendo de las características propias de cada paciente, y este riesgo es variable.

#### **2. ¿Cuáles son los objetivos de este estudio?**

El objetivo de este estudio es evaluar la presencia de infección latente por tuberculosis en personas sanas que han estado en contacto reciente con pacientes con tuberculosis pulmonar activa, y realizar el seguimiento un año después para evaluar la presencia de enfermedad activa. En este proyecto, se plantea estudiar a 90 personas, convivientes cercanos de un paciente con tuberculosis pulmonar activa diagnosticado por cultivo para *Mycobacterium tuberculosis* (la bacteria que causa la enfermedad).

**ESTUDIO: Evaluación de la frecuencia de tuberculosis latente en contactos sanos y su asociación con marcadores inmunológicos de latencia.**

**3. ¿Por qué me han pedido que participe?**

Se le ha pedido que participe en este estudio porque convive con una persona que tiene tuberculosis, por lo que queremos realizar un examen clínico y pruebas de laboratorio para identificar si usted ha contraído la infección.



**4. ¿En qué consiste mi participación?**

Para participar en este estudio, se le solicitará que acuda al INER para realizar un evaluación de su estado físico, se le solicitará que llene un cuestionario de salud respiratoria y se coleccionarán sus datos personales que incluirá su edad, diagnóstico, historial de enfermedades, tratamientos médicos y respuesta a tratamientos. Se le realizarán estudios de laboratorio (Biometría hemática, química sanguínea, pruebas de funcionamiento hepático, perfil de lípidos, y examen general de orina) y una radiografía de su pecho. También si usted decide participar en este estudio, se le realizará una prueba para VIH y usted recibirá este resultado en forma totalmente confidencial, es importante mencionar que la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana incrementa el riesgo de desarrollar tuberculosis, por lo tanto en estudios de convivientes de pacientes con tuberculosis pulmonar activa es importante realizar este procedimiento. Se le aplicará una prueba en la piel del antebrazo izquierdo (prueba de tuberculina) para determinar la presencia de tuberculosis activa, la cual se revisará a las 72 horas para evaluar si es positiva o negativa.

Si usted tiene datos clínicos sugestivos de tuberculosis activa se le solicitarán muestras de expectoración (flema) para realizar baciloscopias y de ser necesario un cultivo para tuberculosis y si es positiva será enviado a su centro de salud para recibir tratamiento.

Se le solicitará una donación de 50mL de sangre (equivalente a cinco cucharadas soperas) por punción de una vena periférica, esta muestra se utilizará para realizar los estudios de investigación.

Se le citará un año después de la evaluación inicial para evaluar nuevamente su estado de salud y se repetirán los estudios mencionados si usted así lo requiere. Cada cita le tomará aproximadamente 2 horas.

**5. ¿Cuáles son los riesgos posibles a los que me enfrente por participar en el estudio?**

La radiografía de tórax es un estudio seguro, no doloroso, se utiliza una cantidad muy pequeña de radiación para obtener una imagen de su pecho y no representa un riesgo para su salud excepto en mujeres embarazadas a menos que este embarazadas.

La extracción de sangre puede causar un pequeño dolor a nivel del sitio de punción donde se introduce la aguja, y puede incluso presentarse un moretón. Es importante que sepa que esta muestra se tomará con equipo totalmente nuevo y esterilizado y será realizado por personas capacitadas para ello.

La aplicación de la prueba de tuberculina en la piel del antebrazo puede causar un pequeño dolor durante la aplicación y se espera que se produzca un área de induración en caso de ser positiva, sin embargo esta zona de induración puede ser de tamaño variable dependiendo del individuo.



**ESTUDIO: Evaluación de la frecuencia de tuberculosis latente en contactos sanos y su asociación con marcadores inmunológicos de latencia.**

**6. ¿Cuáles son los beneficios que obtengo por participar en el estudio?**

Usted obtendrá evaluación clínica y de laboratorio inicial, interpretación de radiografía de tórax que nos permitirá orientarnos para referirlo al servicio de salud adecuado en caso de que requiera atención médica. Además usted obtendrá los resultados de estos análisis que podrá integrar a su expediente clínico y compartirlo con su médico. La principal razón por la cual quiera participar en el estudio es la de contribuir al mejor conocimiento de la enfermedad.

**7. ¿Tiene algún costo participar en el estudio? ¿Se me pagará por participar?**

Participar en este estudio de investigación no tiene ningún costo para usted, usted no pagará ninguno de los estudios que se realizarán, los costos serán absorbidos por el INER. Usted, únicamente tendrá que cubrir los costos de su atención médica en caso de requerirlo después de la evaluación médica. Usted no recibirá ningún pago, ni incentivo por la participación en el estudio, su participación es voluntaria y altruista.

**8. ¿Cómo se manejarán mis resultados y registros médicos?**

Los resultados de los estudios y la información personal obtenida por participar en este estudio son totalmente confidenciales. Todos los resultados e información confidencial serán depositados en una base de datos segura, donde sólo un grupo de investigadores y médicos autorizados, que se han comprometido a proteger los datos de los participantes en el estudio, tendrán acceso. Nadie que no esté autorizado podrá tener acceso a su información.

Sus muestras y los materiales que provengan de estas muestras tendrán un código numérico; solamente los datos relativos a su edad, sexo, raza, estado de salud y otra información clínica relevante se vincularán con el código numérico de la muestra. Su nombre, fecha de nacimiento, dirección u otra información que le identifique personalmente no se vinculará con las muestras que proporcione.

**9. ¿Seré contactado (a) de nuevo en el futuro?**

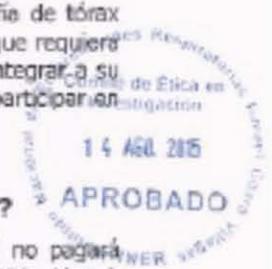
Usted será contactado un año después de la evaluación inicial para realizar el seguimiento de su estado de salud. Si después de esta segunda evaluación se requiere de realizar algún estudio adicional o invitarlo a participar en otro proyecto es posible que uno de los investigadores con quien firmó una carta de confidencialidad lo contacte si usted lo autoriza.

Nuevamente es importante que sepa que participar o acudir a realizarse un nuevo estudio es totalmente voluntario.

**10. ¿Y si en el futuro ya no deseo continuar en el estudio?**

Usted es libre de decidir si desea participar o no en este estudio de investigación. **Si decide no participar, esto no afectará su relación con su médico tratante.**

Si decide participar, usted puede cambiar de opinión y retirarse del estudio en el momento que lo decida. En este caso, todos sus resultados de los estudios realizados serán destruidos.





**ESTUDIO: Evaluación de la frecuencia de tuberculosis latente en contactos sanos y su asociación con marcadores inmunológicos de latencia.**

**11. ¿Dónde puedo acudir si requiero mayor información acerca del estudio?**

Si tiene alguna pregunta sobre la participación en este estudio o si cree que ha sufrido una lesión relacionada con la investigación, puede contactar a los investigadores a cargo:

Dra. Marcela Muñoz Torrico  
Investigador en Ciencias Médicas A  
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)  
Calzada de Tlalpan 4502, México D.F.  
Tel.: 54871712



Si tiene alguna pregunta sobre sus derechos como sujeto de una investigación, puede llamar a:

Dra. María del Rocío Chapela  
Presidenta del Comité de Ética en Investigación del INER  
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER)  
Tel.: 55-54871700 ext. 5254 y 5110

**ACUERDO PARA PARTICIPAR**

Si usted ha leído este formato, se le han respondido todas sus preguntas incluyendo el uso futuro de sus muestras de sangre, entiende de lo que se trata y está de acuerdo en participar, sabiendo que es libre para hacerlo o no hacerlo y que esto no afectará su atención médica, ni el de su familiar por favor escriba su nombre completo, firme en el espacio correspondiente y escriba la fecha. Esto se hace por duplicado, para que usted reciba una copia del documento.

**Acepta** Si (  ) No (  ) que sus muestras se usen en otros proyectos de investigación relacionados con la investigación en tuberculosis

Nombre del sujeto: \_\_\_\_\_

Firma del sujeto: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Investigador/Persona que obtiene el consentimiento: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

**Testigo 1:** Nombre: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

**Testigo 2:** Nombre: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_