



UNIVERSIDAD DE PANAMA
VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO
PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**“APLICABILIDAD DE ANALISIS DE CUANTIFICACIÓN DE INTERFERÓN
GAMMA *IN VITRO* EN RESPUESTA A ANTÍGENOS ESPECIFICOS PARA
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EN PACIENTES INFECTADOS CON VIH
EN PANAMA”**

TESIS DE MAESTRIA

PRESENTADA POR

YOANA PIMENTEL

CIP 8-728-2117

DIRECTOR

MANUEL M. ADAMES M MD, M Sc

PANAMA, REPÚBLICA DE PANAMA
2014

Dedicatoria:

A todos mis familiares que padecieron VIH y ya no estan conmigo, a mis amigos que viven con VIH A mi director de tesis Dr Manuel M Adames M por toda su paciencia, dedicacion y trabajo, a mi hermana Lineth que padeci6 tuberculosis y logro recuperarse, a mi esposo Jose quien ha sido mi apoyo incondicional Muy especialmente a los participantes de este estudio que fueron detectados y tratados.

Agradecimientos

Muchas gracias al Dr Manuel M Adames M, Lic Ritela Gonzalez, Dra Maria Elena Peñaranda El Magister Jose Moreno Enfermeras Celestina Bowell y Enriqueta Cañizalez de la Clinica de Terapia Antirretroviral C H Dr A A M Las Magister Griselda Arteaga, Dalis Mojica, Samantha Rosas y Argentina Ying El grupo de infectologos del C H Dr AAM, en especial al Dr Ivan Toala padre Al personal de la Universidad de Panamá Dra Estela Guerrero, Dra. Zilka Terrientes

A todas mis compañeras de Departamento de Patologia Especial C H Dr A A M que me apoyaron en este proyecto en especial a Lic Evelyn Montes, Lic Flavia Prado

INDICE DE FIGURAS

Figura N° 1	Inmunopatogénesis de la tuberculosis	6
Figura N° 2	Inmunidad contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y los efectos del VIH	7
Figura N° 3	TUBOS PARA EL ANALISIS DE IFN-γ	66
Figura N° 4	TUBOS CON ANTIGENO Y MUESTRAS	67
Figura N° 5	INCUBADORA	68
Figura N° 6	INCUBACIÓN DE MUESTRAS	68
Figura N° 7	COMPONENTES DEL KIT DE ANALISIS PARA IFN-γ	69
Figura N° 8	MICROPLATOS SELLADOS CON LOS POCILLOS PARA ELISA	70
Figura N° 9	SOLUCIONES COMPONENTES DEL KIT DE ANALISIS PARA IFN-γ	70
Figura N° 10	COMPONENTES DEL KIT DE ANALISIS PARA IFN-γ	71
Figura N° 11	COMPONENTES LIOFILIZADOS DEL KIT DE ANALISIS PARA IFN-γ	71
Figura N° 12	MUESTRAS CODIFICADAS DE LOS PARTICIPANTES SALUDABLES Y PACIENTES VIH	72
Figura N° 13	PATRONES DE CALIBRACION Y CONJUGADO PREPARADOS	72
Figura N° 14	MICROPOCILLOS PARA EL ANALISIS DE IFN-γ	73
Figura N° 15	ADICION CONJUGADO A LOS MICROPOCILLOS	73
Figura N° 16	MICROPLATO CON MICROPOCILLOS	74
Figura N° 17	ADICION DE MUESTRAS	74
Figura N° 18	DETALLE DE LA INCUBACION DE MUESTRAS Y CALIBRADORES	75
Figura N° 19	LAVADOR AUTOMATICO DE MICROPOCILLOS	75
Figura N° 20	ADICION DEL SUSTRATO E INCUBACION	76
Figura N° 21	REACCION DEL SUSTRATO	76
Figura N° 22	ADICION DE LA SOLUCION ACIDA PARA DETENER LA REACCION	77
Figura N° 23	PLATOS LUEGO ADICION DE LA SOLUCION ACIDA	77
Figura N° 24	DETALLE MICROPOCILLOS LISTOS PARA LA LECTURA	78
Figura N° 25	LECTURA DE DENSIDADES OPTICAS (LONGITUDES DE ONDA)	78
Figura N° 26	LECTOR DE MICROPOCILLOS	79
Figura N° 27	PLATOS FINALIZADOS	79
Figura N° 28	IMPRESORA	80

INDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1	Cuadro de preparación de conjugado de acuerdo al numero de pruebas a utilizar para el análisis de IFN-γ	63
Anexo N° 2	Cuadro de interpretación de resultados de análisis de IFN-γ	63
Anexo N° 3	Consentimiento informado	64

RESULTADOS	26
DISCUSION	45
CONCLUSIONES	54
RECOMENDACIONES ..	56
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	57
ANEXOS ..	63

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Comparación de Frecuencias absolutas de pacientes BCG vs IFN-γ .	28
Cuadro 2: Comparación de proporciones entre vacunados con BCG con la prueba de PPD	28
Cuadro 3: Comparación de Proporciones de IFN-γ por las características de la muestra estudiada ..	30
Cuadro 4 Comparación de prueba IFN-γ con la prueba de PPD	34
Cuadro 5: IFN-γ en UI/ml vs conteo de Linfocitos TCD4 en pacientes VIH-1 ..	37
Cuadro 6: Comparación de características segun resultados de PPD	40
Cuadro 7: IFN-γ en UI/ml vs la concentración en Log de carga viral en pacientes VIH-1	42
Cuadro 8 Pruebas Estadísticas aplicadas y resultados obtenidos para IFN-γ	44

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica N° 1 Porcentaje de Pacientes VIH vacunados con BCG	27
Gráfica N° 2 Porcentaje de COMBE en Pacientes VIH	29
Gráfica N° 3 Frecuencias absolutas de concentraciones de IFN-γ segun sexo en PVVIH	31
Gráfica N° 4 Frecuencia Absoluta de PPD en pacientes VIH	32
Gráfica N° 5 Frecuencia Absoluta de PPD e IFN-γ	32
Gráfica N° 6 Frecuencia absoluta de TCD3 en pacientes VIH	33
Gráfica N° 7 Frecuencia Absoluta de TCD3 y TCD4 en pacientes VIH	35
Gráfica N° 8 Frecuencia Absoluta de TCD3 y TCD8 en pacientes VIH	36
Gráfica N° 9 Distribución de Linfocitos TCD4, TCD8 e IFN-γ	38
Gráfica N° 10 Distribución de Linfocitos TCD4, TCD8 y PPD	39
Gráfico N° 11 Porcentajes de pacientes de acuerdo al resultado del log de Carga Viral VIH-1 2012	40
Gráfica N° 12 Frecuencia Relativa del Log Carga Viral VIH-1 e IFN-γ	41
Gráfica N° 13 Frecuencia de Relativa de PPD y Log Carga Viral HIV-1	43

INDICE GENERAL	
RESUMEN.....	X
SUMMARY	XI
INTRODUCCIÓN.....	XII
CAPITULO I	1
PLANTEAMIENTO... ..	1
Objetivo General... ..	2
Objetivos Específicos.....	2
JUSTIFICACIÓN.	3
CAPITULO II.....	5
FUNDAMENTO TEÓRICO	5
Generalidades	5
Vía de Señalización para la producción de IFN-γ	8
Prueba de tuberculina.	9
Los IGRAS y su uso en pacientes inmunosuprimidos.....	12
CAPITULO III.....	15
METODOLOGÍA.....	15
Tipo de Estudio:.....	15
Población:.....	15
o Adultos saludables para obtener valores de referencia.....	15
Muestra:.....	15
Hipótesis'	16
Variables.....	17
Metodología:.....	18
Principio.....	18
Reactivos y Materiales... ..	19
RECOLECCIÓN Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS.....	20
Procedimiento análisis de muestras.....	21
CÁLCULOS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO23	
CAPITULO IV.....	26

Índice de Abreviaturas

APC Celula presentadora de antígeno

BCG Bacillus Calmette-Guerrin usado en vacunas

TCD4 Linfocito T que expresa en su membrana antígeno CD4

TCD8 Linfocito T que expresa en su membrana antígeno CD8

COMBE Clasificación de personas expuestas o infectadas con *M. tuberculosis*

CV Carga viral

DO Densidad óptica

ELISA Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

ELISPOT Pruebas para cuantificar Interferon gamma

IFN- γ Interferon gamma

IFN- γ R Interferon gamma receptor

IGRAS Pruebas sanguíneas para determinar liberación de Interferon gamma producido

IL12 Interleucina 12

IL18 Interleucina 18

IRF9 IFN- factor 9 regulatorio

JAK-STAT Via de señalización intracelular

LPS Lipopolisacárido

LTB Tuberculosis latente

LTBI Tuberculosis latente determinada por ensayo específicos de Interferon gamma

pg/ml Picogramos por mililitro

NK Celula asesina natural (Natural Killer)

PPD Derivado proteico purificado de *M tuberculosis*

PVVIH Personas que viven con Virus de Inmunodeficiencia Adquirida

QTF-G Ensayo QuantiFERON-TB Gold

QTF-GIT Ensayo QuantiFERON-TB Gold in tube

SIDA Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SOCS Citocina supresora de señalización

TAT Gen VIH transactivador juega papel importante en la transcripción reversa

TB Tuberculosis

Th Linfocito T ayudador, colaborador o cooperador "helper"

TNF α Factor de Necrosis Tumoral alfa

VIH Virus Inmunodeficiencia Humana

UI/ml Unidades Internacionales por mililitro

RESUMEN

Introducción La infección latente por *M tuberculosis* se detecta mundialmente por medio de la prueba de Tuberculina (PPD) Se han desarrollado nuevas pruebas para ayudar a su diagnóstico, como la medición de la producción de la citocina de IFN- γ específico para esta bacteria

Metodología Este estudio es analítico, descriptivo y transversal con poblaciones de 49 adultos saludables para obtener valores de referencia y 45 adultos que viven con el VIH en riesgo de desarrollo de tuberculosis latente

Realizamos una prueba para medir de producción de IFN- γ *in vitro* en sangre total después de la estimulación específica con antígenos de *M tuberculosis*, denominada QuantiFERON-TB Gold (QTF-G), que mide la respuesta de los linfocitos T efectores de memoria, específicos para tuberculosis y se comparó con la prueba de Tuberculina (PPD)

Resultados

La población de referencia fue de 49 voluntarios saludable Todos PPD negativo < 15 mm en el área de la induración La concentración de IFN- γ de la población saludable fue de 0.004 UI/ml (0.16 pg/ml) a 0.444 UI/ml (17.76 pg/ml)

Entre los 45 pacientes infectados con el virus de VIH que se realizaron la prueba de PPD Fueron positivo 4% (2/45) y negativos 96% (43/45) Ambos pacientes positivo para la PPD, también fueron positivos para IFN- γ , 100% (2/2) Los 43 pacientes restantes con PPD negativos, cuatro fueron positivos para IFN- γ 9% (4/43) y 39 fueron negativos 91% (39/43) para ambas pruebas La sensibilidad obtenida para producción de IFN- γ fue de 99% y la especificidad de 91%

Conclusiones

Esta investigación determinó los valores normales en Panamá de INF- γ específicos para *M tuberculosis* Los valores encontrados en la muestra sana están entre 0.16 – 17.76 pg/ml El IFN- γ específico para *M tuberculosis* fue positivo en un 9% de las personas infectadas por el VIH que tenían la prueba de PPD negativa

SUMMARY

Introduction

The latent infection for M tuberculosis is detection worldwide through of tuberculin test (TST) New tests is developed to help the diagnosis, such the measure of amount of production of specific IFN- γ for this bacteria

Method

This study is analytic, descriptive and transversal with populations of 49 healthy adults to get reference values and 45 people that live with VIH, with a risk to develop latent tuberculosis

We did a test for measure in vitro of IFN- γ production in whole blood after the specific stimulation with antigens of M tuberculosis called QuantiFERON-TB Gold (QTF-G) This test measured the specific response of lymphocyte T memory for tuberculosis and this was compared with tuberculin test (TST)

Results

The reference population was 49 healthy volunteer All of them were negative to TST test with < 15 mm in the induration area The values of IFN- γ in healthy people was of 0 004 UI/ml (0 16 pg/ml) to 0 444 UI/ml (17 76 pg/ml)

Between the 45 people that live with HIV that we performed the TST test They were positive 4% (2/45) and negative 96% (43/45) Both positives patients for TST test, also were positives for IFN- γ test with 100% (2/2) Between 43 patients with negatives TST test, four were positive for IFN- γ test (4/43) and 39 were negative 91% (39/43) for both tests The sensibility found for IFN- γ test was of 99% and the specificity was 91%

Conclusion

This investigation determined the normal values in Panama of specific IFN- γ production to M tuberculosis antigens The values found in the healthy sample are 0 16 – 17 76 pg/ml The specific INF- γ was positive the 9% of the people that live with HIV and they had negative TST test

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) representa un problema grave de salud pública en la actualidad. Se estima que un tercio de la población mundial se encuentra infectada por *Mycobacterium tuberculosis*, considerándose que es responsable de ocho millones de casos nuevos y de más de dos millones de muertes anuales en el mundo (Kunnath-Velayudhan and Gennaro 2011).

La mayoría de los individuos infectados con *M. tuberculosis* desarrollan una infección latente, proceso donde el microorganismo persiste en las lesiones tuberculosas en un estado incapaz de producir síntomas que indiquen su presencia durante períodos prolongados (Achkar and Jenny-Avital 2011).

A pesar de los esfuerzos para detener la epidemia, esta aún crece alrededor de 1% cada año. Más de 9 millones de personas desarrollan tuberculosis activa cada año, de las cuales mueren cerca de 2 millones de estas (Mandelbaum-Schmid 2010). Un tercio de la población mundial alberga la infección latente, lo que plantea el riesgo de transmisión de tuberculosis a la población general.

La reducción del reservorio en los humanos de esta bacteria requiere muchos años de esfuerzo constante e incansable. Además del uso de herramientas más eficaces de las que tenemos a nuestro alcance en la actualidad.

A pesar del aumento de la incidencia de los casos de tuberculosis en la década de los 90 atribuible a la epidemia de VIH y a la progresión a la fase activa de la tuberculosis.

en pacientes con VIH. La prevalencia total de tuberculosis fue descendiendo. Esta contradicción se explica en parte por un incremento de la mortalidad de los pacientes con coinfección (Anandiah et al 2011)

Estudios plantean que tanto los linfocitos TCD4 como TCD8 y las citocinas (IFN- γ y TNF- α) juegan un papel importante en la respuesta inmune contra *M tuberculosis* y en el control de la infección latente

Los linfocitos T son células del sistema inmunológico caracterizadas por expresar en su membrana el CD3. Estos se dividen a su vez en subgrupos de linfocitos T colaboradores que expresan en su membrana la molécula CD4 y linfocitos T citotóxicos que expresan en su membrana la molécula CD8. Los linfocitos TCD4 están involucrados en la activación y dirección de otras células inmunitarias, y son particularmente importantes en la respuesta inmune adaptativa

La importancia de los linfocitos T colaboradores puede observarse durante una infección por el VIH, ya que el virus infecta las células que son tipo TCD4. Hacia el final de la infección por VIH, el número de células TCD4 funcionales caen, lo que lleva al estado sintomático de la infección conocido como síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)

El uso clínico de cualquier prueba de diagnóstico para la tuberculosis latente (LTB) depende, de la capacidad para identificar que personas se encuentran en un mayor riesgo de progresión a TB activa (Metcalfe et al 2013)

CAPITULO I

PLANTEAMIENTO

En abril de 2000, la Sociedad Toracica Americana (ATS) y El Centro para el Control y la Prevencion de Enfermedades (CDC) revisaron sus criterios para el tratamiento de la infeccion tuberculosa latente (LTB) En tanto la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de Estados Unidos y el Colegio Americano de Medicos aprobaron las siguientes directrices

Los controles están dirigidos a los individuos que están en alto riesgo de ser infectados con *M tuberculosis* y por lo tanto que poseen un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad activa Tambien a los que, una vez infectados, corren un alto riesgo de desarrollar la enfermedad debido a las condiciones medicas que aumentan considerablemente el riesgo de desarrollar tuberculosis activa

Sobre la base de los informes publicados en la literatura médica y los datos de vigilancia del CDC, el Comite Asesor para la Eliminacion de la Tuberculosis (ACET) recomienda que los grupos de alto riesgo sean examinados para la tuberculosis latente y la infeccion tuberculosa Estando en primer lugar las personas infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)

Objetivo General

- Determinar la producción de IFN- γ *in vitro* en respuesta a antígenos específicos para *M tuberculosis* en pacientes VIH positivos

Objetivos Especificos

- Determinar los valores normales de IFN- γ en población saludable
- Comparar la producción de IFN- γ con la BCG
- Comparar la producción de IFN- γ con el COMBE
- Comparar la producción de IFN- γ con la prueba *in vivo* de PPD
- Comparar la producción de IFN- γ con el número de linfocitos TCD3, TCD4, TCD8
- Comparar la producción de IFN- γ con la carga viral circulante del VIH-1
- Valorar la utilidad del IFN- γ en el diagnóstico de la infección latente por tuberculosis en pacientes VIH positivos

JUSTIFICACIÓN

La incidencia de la tuberculosis en Panama se estima entre 35 - 48/100 000 en el año 2009 (World Health Organization 2012a) La prevalencia de tuberculosis es de 52/100 00 en 2009 y la de VIH de 585/100 000 en 2010 (World Health Organization 2012a) La coinfección de pacientes con ambas enfermedades TBC y VIH es de 7%, con 1494 casos reportados por la WHO en el 2012 (World Health Organization 2012b)

En la reunión realizada del 7 y 8 de julio de 2012 y cuyo marco fue desarrollar el “Estado actual de la tuberculosis y coinfección TB-VIH en America Latina y el Caribe”, el compromiso adquirido por las autoridades de salud de la Republica de Panama fue ampliar las actividades de colaboración de los programas de TB-VIH entre la sociedad civil, las instituciones academicas en America Latina y el Caribe”, además de impulsar las investigaciones relacionadas con el tema entre la Universidad de Panama (Sistema de Estudio de posgrado, Facultad de Medicina, Sección de Inmunología) y la Caja de Seguro Social (World Health Organization 2012b)

En Panama la disponibilidad de la Prueba de PPD en los últimos años se ha hecho muy escasa y además su interpretación es engorrosa en particular en pacientes inmunosuprimidos, con respuestas celulares débiles

En los metanálisis de investigaciones basadas en la evidencia, cuando se compara ensayos de liberación de IFN- γ contra antígenos específicos de Mycobacterium, se apoyan el uso de IGRAS, especialmente en grupos de alto riesgo y en particular para los individuos inmunosuprimidos con alto riesgo de reactivación de la tuberculosis, como se

ha establecido en algunas de las recomendaciones actuales (Diel, Loddenkemper, and Nienhaus 2010)

CAPITULO II

FUNDAMENTO TEÓRICO

Generalidades

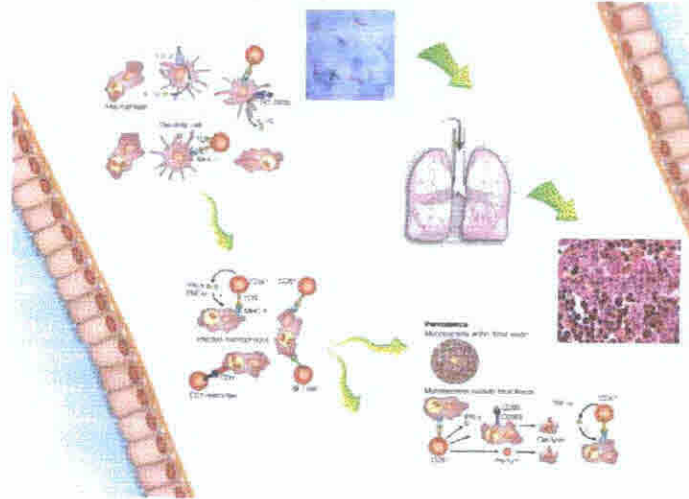
El *M tuberculosis*, durante su infección en los humanos, atraviesa por diferentes periodos o fases, etapas que pueden diferenciarse en una fase activa de replicación, caracterizada por la multiplicación inicial de *M tuberculosis*. Esto estimula la inmunidad mediada por células, una fase de latencia, periodo donde reduce la actividad metabólica celular, pero que no se muestra la presencia del bacilo y, finalmente, una fase de reactivación, estado que se establece en el 10% de los individuos inmunocompetentes (Alvarez n.d.) Este proceso de reactivación tiene una mayor incidencia en sujetos inmunológicamente suprimidos (Kunnath-Velayudhan and Gennaro 2011)

Una efectiva respuesta inmune contra la tuberculosis implica una respuesta coordinada entre los sistemas de inmunidad innata y adaptativa (Araujo, Acosta, and Escobar 2008, VinayKumar, Abul K Abbas 2005) Siendo la tuberculosis una de las causas más importantes de muerte de los pacientes infectados con VIH, esto se relaciona con el incremento del riesgo de desarrollar tuberculosis por la disminución de los TCD4. Por lo que esta población está asociada a altas tasas de tuberculosis tanto diseminada como pulmonar.

La capacidad que posee *M tuberculosis* para sobrevivir dentro de las células es el resultado de un complejo y delicado control de su regulación genética. La expresión

diferencial de algunos genes regulatorios puede ser determinante en la infección por el patógeno o para su capacidad de persistir dentro del hospedero. (Salas-Rangel et al. 2009)

Figura N° 1: Inmunopatogénesis de la tuberculosis

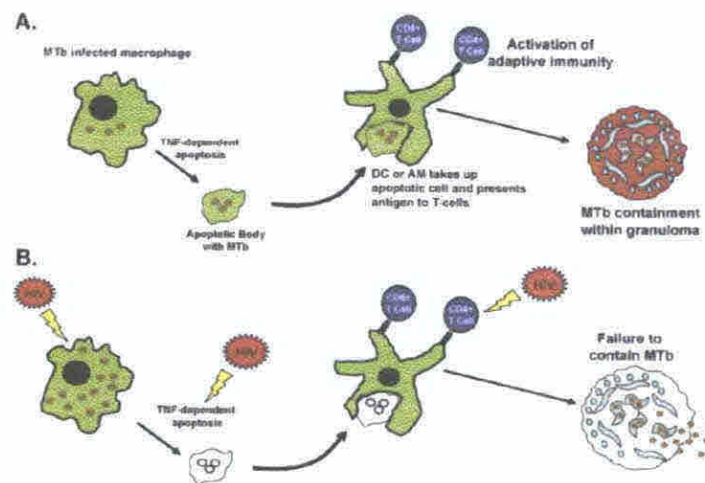


Presentación antigénica de *M. tuberculosis* por los macrófagos y las células dendríticas, activación de los linfocitos TCD4 - TCD8 con liberación de citocinas como el IFN- γ , persistencia de la bacterias dentro del granuloma pulmonar y/o desarrollo de la tuberculosis pulmonar. Fuente: Comparación de la determinación de Interferón γ vs la Prueba de Tuberculina en el diagnóstico de tuberculosis latente en pacientes VIH-1 en el C.H.Dr.A.A.M de octubre a diciembre del 2012

El *M. tuberculosis* persiste dentro de un granuloma en los huéspedes infectados. El granuloma está constituido de macrófagos y células gigantes, células T, células B y fibroblastos. (Araujo et al. 2008). Estos conjuntos de células y citocinas del sistema inmune innato y adaptativo provee una barrera de contención y un ambiente hostil para la replicación bacilar. Nuevos estudios revelan que los granulomas no son estructuras inertes, sino que están activos y en constante cambios de estructuras metabólicas con el tejido. (Barry et al. 2009)

Este control inmune inicial puede fallar a través de una exacerbación de la respuesta inflamatoria conduciendo a necrosis y licuefacción del tejido permitiendo el crecimiento extracelular o por inmunosupresión conduciendo a la diseminación es consecuencia de una falla en la formación de granuloma, debido a que no hay producción de las citocinas (principalmente TNF- α) y quimiocinas involucradas en este proceso. (Araujo et al. 2008)

Figura N° 2: Inmunidad contra *Mycobacterium tuberculosis* y los efectos del VIH.



- (A) Macrófagos alveolares (AMs) son las primeras células que encuentran y fagocitan las bacterias de *Mycobacterium tuberculosis* (MTb) cuando son inhaladas y depositadas en los pulmones. Las micobacterias han desarrollado un escape sorprendente de la muerte intracelular en el fagosoma de los macrófagos permitiendo la permanencia y crecimiento dentro del este. Los mecanismos de defensa contra este incluyen secreción de quimiocinas, citocinas que activan la defensa antimicobacteriana y la inmunidad adaptativa, autofagia y apoptosis entre otras.
- (B) El VIH afecta esto pasos incluyendo el incremento de la fagocitosis de la micobacterias que da acceso al ambiente intracelular disminuyendo la apoptosis en respuesta a *Mycobacterium tuberculosis*, disminuyendo la autofagia y la producción de quimiocinas y citocinas que activan las defensas contra las micobacterias y la inmunidad innata. VIH también afecta la función y cantidad de células T TCD4 que conlleva a un incremento de la carga bacilar, falla en la formación del granuloma y diseminación. DC: células dendríticas, TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa

Vía de Señalización para la producción de IFN- γ

Los interferones son citocinas que tienen una importante función en la respuesta inmune especialmente efectos antitumorales y como respuesta contra infecciones intracelulares por virus y LPS bacterianos. Existen 3 tipos de interferones: Tipo I (IFN- α , β y otros como son Ω , ϵ y κ), tipo II (IFN- γ) y tipo III (IFN- λ) (VinayKumar, Abul K Abbas 2005)

Ambos tipos I y II ejercen su acción a través de complejos receptores de membrana IFN α R e IFN γ R respectivamente. El IFN tipo I está unido a la expresión de un receptor heterodimérico compuesto de las subunidades IFN α R1 y IFN α R2, mientras que el receptor para interferón tipo II está compuesto de IFN α R1 o IFN α R2. El IFN- λ tipo III tiene tres miembros λ 1 (IL-29), λ 2 (IL-28A), y λ 3 (IL-28B) respectivamente (VinayKumar, Abul K Abbas 2005)

La señalización de IFN- λ se inicia a través de un único receptor heterodimérico compuesto por las cadenas IFN-LR1/IF-28R α e IL10R2. El IFN tipo I generalmente utiliza proteínas JAK1 y TYK2 para transmitir su señal hasta STAT1 y STAT2 en combinación con IRF9 (IFN- factor 9 regulatorio), estas proteínas forman el complejo heterodimérico ISGF3. En el núcleo ISGF3 se une al elemento estimulador de respuesta de IFN (ISRE) para promover la inducción del gen IFN tipo II. Los IFN de Tipo II, a su vez dependen de la activación de JAK 1 y 2 y STAT1. Una vez activado STAT1 se dimeriza para formar el regulador transcripcional GAF (IFN γ factor activador) y este se une al elemento de secuencia activada de interferón (GAS) y se inicia la transcripción de los genes de respuesta IFN- γ . Similar al IFN tipo I, el IFN- λ utiliza las quinasas TYK2 y JAK1 y estas promueven

la fosforilacion de STAT1/2e induce la formacion del complejo ISRE3 que dimeriza y trasloca dentro del nucleo y activa la secuencia del elemento (GAS) y consecutivamente lleva a la iniciacion de la transcripcion (Platanias 2005)

Diversos estudios sobre la cascada de señalizacion de IFN sugieren la sobreexpresion de citocinas supresoras de la señalizacion (SOCS-1) y (SOCS-3) que impiden la antiproliferacion y actividad antiviral de IFN α/β e IFN γ Estas proteinas inducibles llamadas SOCS son una regulacion negativa de la cascada de señalizacion JAK/STAT y suprimen la inflamacion (VinayKumar, Abul K Abbas 2005)

Investigaciones han encontrado que los mecanismos encubiertos detras de la de la falla en la regulacion de la via de señalizacion de IFN se encuentra en el VIH-1 la proteina TAT a traves de la induccion de la familia de proteinas SOCS especificamente SOCS -2 para suprimir la activacion de la via JAK/STAT del IFN- γ que es un importante mediador en la respuesta antimicrobiana (Song and Shuai 1998)

Prueba de tuberculina

Actualmente la prueba de tuberculina PPD es la prueba estandar para el diagnostico de la infeccion tuberculosa, la cual pone de manifiesto un estado de hipersensibilidad retardada mediada por celulas principalmente linfocitos T que presenta el organismo frente a proteinas de las micobacterias despues de la infección y se manifiesta de 48-72 horas despues de la inyeccion una induracion en la zona cuya lectura se hace midiendo en milímetros el diametro transversal de la induracion segun el eje transversal del antebrazo En esta lectura diagnostica se toman en cuenta no solo el tamaño sino tambien la situacion clinica de cada paciente (Cascante et al 2007)

Inicialmente la PPD se extraía de bacilos hervidos, actualmente es un derivado proteico purificado, obtenido tras el filtrado de cultivos de *M tuberculosis* (Cascante et al 2007) En Panama la prueba de PPD no se realiza en forma de rutina para pacientes con VIH

La prueba de PPD tiene sus limitaciones siendo el principal inconveniente que las proteínas utilizadas no son específicas solo para *M tuberculosis*, es decir, son compartidas con otras especies de micobacterias no tuberculosas lo que disminuye su especificidad Por otra parte su sensibilidad se reduce significativamente y supresion celular especialmente cuando las cuenta de linfocitos TCD4 es menor de 100 células/mm³ además la vacunacion previa con BCG hace mas de 15 años puede llevar a reaccion cruzada con antigenos de PPD

Cada individuo tiene circunstancias determinadas que pueden desencadenar falsos negativos entre ellas infecciones virales concurrentes, vacunaciones con virus vivos, situaciones de inmunosupresion edades extremas de la vida y ancianos Además inadecuada técnicas de aplicación, lectura e interpretación como toda prueba aumenta el porcentaje de error (Cascante et al 2007)

Existen propiedades particulares en la infección tuberculosa en pacientes con VIH que los diferencian de los inmunocompetentes y que explican por que este virus ha contribuido a extender la epidemia de TBC El virus de la inmunodeficiencia humana es un retrovirus que infecta las células del sistema inmunitario, destruyendo o deteriorando su función Conforme avanza la infección, el sistema inmunológico se debilita, y la persona se vuelve mas susceptible a las infecciones

La tuberculosis es el modelo de infección que requiere la inmunidad celular (Th1) para su control y el VIH causa el deterioro funcional progresivo de los linfocitos TCD4 de forma cuantitativa como cualitativa, con el consiguiente deterioro del sistema inmune celular, lo que permite el desarrollo de la tuberculosis. Es por esta razón que la infección por VIH condiciona un riesgo de 7 a 10% de desarrollo de TB por cada año de vida en un paciente con VIH, comparado con el riesgo de 5 a 10% de desarrollo de TB durante toda la vida en una persona sin VIH.

En sentido inverso, la tuberculosis puede influenciar también la progresión de la infección por VIH. La infección por *M. tuberculosis* trae como consecuencia la producción de TNF e interleucina 1 y 6, que estimularían la replicación del virus (Barnes P, Lackey D). La TB aumenta la replicación del VIH por un factor de 160, aumentando la carga viral (0,2 logaritmos) y disminuye el recuento de linfocitos TCD4, lo que condiciona el aumento de la velocidad a la progresión de SIDA (Mendoza and Iglesias 2008).

El tratamiento de la TB sea compañía de incremento de los linfocitos TCD4, que se relaciona al síndrome de reconstitución inmune que se ve en pacientes con y sin VIH (Mendoza and Iglesias 2008).

El IFN- γ es una citocina proteica soluble que coordina una serie de programas celulares a través de la regulación transcripcional de genes inmunológicamente relevantes especialmente los relacionados con la respuesta de macrófagos a la infección. El IFN- γ aumenta la expresión de genes relacionados con reconocimiento de patógenos, procesamiento y presentación de antígenos, respuesta antiviral, respuesta antiproliferativa con acciones sobre la apoptosis, activación de efectores antimicrobianos, inmunomodulación y tráfico de leucocitos.

El IFN- γ es el representante de los interferones de tipo II que se caracterizan por tener como receptor al IFN- γ R (interferon gamma receptor) El IFN- γ es producido por linfocitos TCD4 de tipo Th1, linfocitos TCD8 y células NK y existen evidencias de que también las células B, las NKT y las células presentadoras de antígeno (APC) son capaces de producirlo Componentes como los lipopolisacáridos (LPS) y los motivos CpG no metilados presentes en el ADN de patógenos aumentan la producción de IFN- γ

El IFN- γ es una de las citocinas más característica del perfil Th1 La producción de IFN- γ es controlada por citocinas secretadas por APC especialmente por la interleucina 12 (IL-12) y la interleucina 18 (IL-18) La función del IFN- γ está centrada en la intervención del macrófago en la inflamación y en la inmunidad adquirida durante la infección El IFN- γ se encarga de orquestar la respuesta de los macrófagos y además también dirige la atracción de leucocitos y el crecimiento, maduración y diferenciación de muchos tipos celulares, refuerza la actividad de las células NK y regula la función de las células B El interferon gamma utiliza la vía de señalización JAK-STAT

El IFN- γ es el único miembro de la clase de tipo II de los interferones Fue originalmente llamado factor activador de los macrófagos y tiene un papel muy importante en la respuesta inmunitaria contra el *M tuberculosis*

Los IGRAS y su uso en pacientes inmunosuprimidos

El progreso del análisis genómico de *M tuberculosis* ha permitido descubrir antígenos específicos, como el antígeno secretorio temprano dirigido (ESAT-6) y filtrado de proteína-10 (CFP-10), que inducen una fuerte respuesta de IFN- γ de células T

sensibilizadas. Estos antígenos han permitido el desarrollo de las pruebas de diagnóstico para la tuberculosis (TB) fueron desarrolladas utilizando estos antígenos.

La identificación de los antígenos específicos de *M. tuberculosis* se ha usado para reemplazar al derivado proteico purificado (PPD), por lo tanto, ha sido una de las principales prioridades de investigación internacional. Estos antígenos otorgan mayor especificidad que aquellas pruebas que utilizan el PPD como antígeno.

Las pruebas sanguíneas para determinar la liberación de IFN- γ producido contra antígenos específicos de *M. tuberculosis* (IGRAS), determinan si un individuo ha estado expuesto al *M. tuberculosis* y presentar si este es capaz de provocar una TBC latente.

Los pacientes con un deterioro de la inmunidad celular (infección por VIH, tratamiento inmuno supresor, incluido inhibidores del TNF etc.) tienen un riesgo elevado de desarrollar tuberculosis en caso de infectarse (Cascante et al 2007). En esta situación, los IGRA pueden tener una importante utilidad, especialmente teniendo en cuenta que tienen un control mitógeno positivo que nos ayuda a conocer si un resultado no positivo es un verdadero negativo o un indeterminado, que traduce errores técnicos o una marcada inmunosupresión (Cascante et al 2007).

Estas pruebas se han utilizado para estudiar individuos con exposición familiar a *M. tuberculosis* (COMBE positivo) o vacunados con BCG. En algunos estudios hasta el 70% de los vacunados con BCG y el 18% de los que no lo están, resultan positivos a la prueba *in vivo* de PPD (>5mm), mientras con IGRA fueron positivos el 9% y del 11%, respectivamente (Diel et al 2010).

En un estudio japonés el análisis de los datos de pacientes con tuberculosis (TB) obtuvo la sensibilidad de IGRA del 92,6% (87/94) y la especificidad fue del 98,8% (Harada et al 2009)

Cuando se comparó la técnica de ELISPOT (Una técnica que necesita cultivar mononucleares estimulados y medir en su sobrenadante el IFN- γ) vs los IGRA en un estudio realizado en Japón, se utilizaron 47 pacientes con tuberculosis confirmada, contra 84 sujetos sanos, se encontró una sensibilidad del 100% para el ELISPOT y 87,2% para los IGRA. La especificidad fue del 83,3 y 98,8%, respectivamente. La concordancia de las dos pruebas fue considerablemente alta (coeficiente kappa=0,671). La sensibilidad de ELISPOT parece ser mayor que la de los IGRA, mientras que la especificidad de ELISPOT fue significativamente menor que la del IGRA (Harada et al 2009)

Otro estudio evaluó la prueba de PPD vs IGRA con sujetos infectados por VIH con respecto a la presencia de factores de riesgo para la tuberculosis latente, encontró que la tasa de indeterminado del IGRA fue del 4,9%, esto fue encontrado principalmente en pacientes con menos de TCD4 < 200 células/ μ l (Jones et al 2007)

CAPITULO III

METODOLOGIA

Tipo de Estudio

- Estudio analítico, descriptivo, transversal

Población

- Adultos saludables para obtener valores de referencia

Adultos que viven con el VIH en riesgo de desarrollo de tuberculosis latente

Muestra.

- El tamaño de la muestra se calculó considerando un margen de error del 5%, una confianza de 95%, considerando el universo de 225 - 300 pacientes mensuales y una heterogeneidad del 7% basada en la diversidad del universo. La muestra resultó en 43 sujetos diagnosticados con VIH cuyo número de linfocitos TCD4 fue mayor de 200 células/ul sin tuberculosis activa ni otras enfermedades oportunistas
- *Criterios inclusión muestra saludable*
 - Pacientes mayores de 18 años infectados por el VIH
 - Sin diagnóstico clínico o de laboratorio de tuberculosis
- *Criterios exclusión muestra saludable*

- Sujetos menores de edad
- Sujetos con diagnostico clinico de tuberculosis
- Sujetos con diagnostico de laboratorio de tuberculosis

- ***Criterios inclusion muestra estudiada***
 - Pacientes mayores de 18 años infectados por VIH
 - Sin diagnostico clinico o de laboratorio de tuberculosis
 - Con un conteo de celulas TCD4 mayor de 200 celulas/ul
 - No padecer de enfermedad oportunista

- ***Criterios exclusion muestra estudiada***
 - Sujetos menores de edad
 - Sujetos con diagnostico clinico de tuberculosis
 - Sujetos con diagnostico de laboratorio de tuberculosis
 - Sujetos con un numero de TCD4 menor a 200 celulas/ul
 - Sujetos que padezcan enfermedades oportunistas

Hipótesis

μ_1 -Las determinaciones de IFN- γ obtenidas en el estudio son estadísticamente significativas para conocer si existe infeccion latente con *M tuberculosis* en comparacion con la prueba de tuberculina. Los valores de IFN- γ obtenidos por el IGRAS indican significativamente infeccion latente con *M tuberculosis* en comparacion con la tuberculina.

μ_0 - Los resultados de IFN- γ obtenidos por el IGRAS son iguales a los de la tuberculina, para detectar infección latente con *M tuberculosis*

Variables

- **Independiente**
 - Cantidad de linfocitos TCD3
 - Cantidad de linfocitos TCD4
 - Cantidad de linfocitos TCD8
 - Vacunación con BCG
 - Conocimiento de exposición a tuberculosis (COMBE)
- **Dependiente**
 - Concentración de IFN- γ UI/ml
 - Diámetro de PPD en mm
 - Log Carga viral HIV-1
- **Definición Operacional de las Variables**
 - **Cantidad Linfocitos TCD3:** Valor de número de células y porcentajes de linfocitos T que expresan en su membrana celular el receptor CD3
 - **Cantidad de Linfocitos TCD4** Valor de número de células y porcentajes de linfocitos T que expresan en su membrana celular el receptor CD4
 - **Cantidad Linfocitos TCD8** Valor de número de células y porcentajes de linfocitos T que expresan en su membrana celular el receptor CD8

- **Concentración de IFN- γ** Valores obtenidos en UI/ml que determinaran una infección latente probable por *M tuberculosis*
- **Diametro de PPD** Valor obtenido en mm 72 horas después de la aplicación intradérmica del derivado purificado de antígeno de *M tuberculosis*
- **Vacunación con BCG** Se determina mediante una inspección del brazo izquierdo del paciente buscando la escara dejada por la vacunación en la niñez
- **COMBE** Información obtenida por medio de una entrevista con el participante para saber si ha tenido exposición o contacto con algún individuo que haya padecido tuberculosis
- **Log Carga Viral VIH-1** Concentración de virus VIH-1 expresada en logaritmo de base 10 Se utilizó este término matemático debido a que las concentraciones varían en amplias cantidades entre pacientes

Metodología

Principio

Se realizó una prueba para medir la producción de IFN- γ *in vitro* en sangre total tras estimulación específica de antígeno, denominada QuantiFERON-TB Gold (QTF-G), que valora la respuesta de los linfocitos T efectoras de memoria, específicos de tuberculosis. Se eligió esta prueba debido a que es un ensayo que mide la reacción inmunitaria celular ante antígenos peptídicos que simulan ser proteínas de micobacterias.

Estas proteínas - ESAT-6, CFP-10 y TB7 7 no aparecen en ninguna de las cepas de BCG ni en la mayoría de las micobacterias de la tuberculosis, con excepción de *M. kansasii*, *M. szulgai* and *M. marinum*. Los individuos infectados con bacterias del complejo *M. tuberculosis* normalmente tienen linfocitos en la sangre que reconocen a estos y a otros antígenos micobacterianos. Este proceso de reconocimiento consiste en generar y segregar citocina, es decir, IFN- γ .

Este ensayo se basa en la detección y posterior cuantificación de dicho IFN- γ en 3 muestras de cada paciente, uno que le llamaremos mitógeno que nos garantiza la proliferación celular, otro que contiene los antígenos específicos ESAT-6, CFP-10 y TB7 7 y otro nulo que nos permite medir la concentración basal de IFN- γ circulante no específica para cada paciente.

Reactivos y Materiales

- Reactivos para determinar IFN- γ QuantiFERON-TB Gold (QTF-G)
- Prueba de tuberculina (PPD)
- Incubadora de 37°C (no precisa CO₂)
- Pipetas calibradas de volumen variable para manejar entre 10 μ l hasta 1000 μ l con tiras desechables
- Pipeta multicanal calibrada capaz de admitir 50 μ l y 100 μ l con puntas desechables
- Agitador de microplacas
- Agua desionizada o destilada-2 litros
- Lavador de microplacas (se recomienda lavador automático)

- Lector de microplacas equipado con un filtro de 450nm y otro de referencia de 620 a 650 nm
- Puntas pipeta
- Tampones para lavado de pocillos
- Centrifuga de suero
- Viales para separar suero
- Bolsas desecho
- Jeringuillas, alcohol, curtas, gasas
- Guantes, bata, marcador

RECOLECCIÓN Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

- 1 Se recogio para cada sujeto 1 ml de sangre por puncion venosa directamente en cada uno de los tres tubos de muestra con mitogeno, antígeno y nulo, respectivamente proporcionadas por el ensayo de QuantiFERON®-TB Gold IT
- 2 Se mezclo el contenido de los tubos agitandolos fuertemente durante 5 segundos (10 veces) para estar seguro de que toda la superficie interna del tubo está cubierta de sangre
- 3 Se rotulo los tubos adecuadamente con el código del paciente
- 4 Los tubos se colocaron verticalmente en la incubadora a 37°C lo antes posible, y siempre dentro de las 16 horas siguientes a la recogida de la sangre
- 5 Se incubaron a 37°C entre 16 y 24 horas
- 6 Tras la incubacion a 37°C, se centrifugo el tubo entre 5 y 15 minutos a entre 2000 y 3000 RCF (g)

- 7 Las muestras se separaron en alícuotas rotuladas con el código del paciente, el tipo de plasma (mitogeno, antígeno y nulo)
- 8 Se guardaron las muestras de plasma antes de llevar a cabo el ELISA, hasta completar el número de pacientes requerido y se almacenaron menos de -20°C

Procedimiento análisis de muestras

- 1 Todas las muestras de plasma y reactivos, se atemperaron antes de usar excepto el concentrado de conjugado 100X, que se utilizó a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$)
- 2 Se utilizaron tiras para los estándares del QuantiFERON®-TB Gold y tiras suficientes para cada uno de los sujetos a diagnosticar, las tiras innecesarias se devolvieron a la bolsita de aluminio y colocaron de nuevo en la nevera
- 3 El estándar liofilizado del kit se disolvió añadiéndole el volumen de agua desionizada o destilada que se indica en la etiqueta del frasco del estándar. Se mezcló con suavidad para que se forme lo mínimo posible de espuma y lograr así una solubilización completa. Al disolver el estándar al volumen indicado se consiguió una solución con una concentración de 8 UI/ml

Del estándar disuelto se obtuvo una serie de 4 diluciones del IFN γ con diluyente verde (DV). Los estándares se analizaron por duplicado siguiendo el siguiente procedimiento

- a Se rotularon 8 tubos "P1", "P2", "P3", "P4", "P5", "P6", "P7", "P8"
- b Se añadió 150 μl de DV a los todos los tubos
- c Se añadió a 150 μl del estándar del kit al P1 y mezclar bien

- d Luego se dispense 50 μ l de P1 en P2 mezclando bien
- e A continuación se dispense 50 μ l de P2 en P3 mezclando bien
- f Luego se continúe de la misma forma hasta llegar a P7
- g El DV funcione como estándar cero/blanco (P8)

Se disolvió el concentrado 110X de conjugado liofilizado con 0,3 ml de agua desionizada o destilada mezclando con suavidad para que se forme lo mínimo posible de espuma

El conjugado listo para utilizar se preparó diluyendo la cantidad necesaria de concentrado 100X en diluyente verde (DV) tal como se indica en el siguiente cuadro

- 5 Se mezclaron los plasmas para que el IFN- γ se repartiera de forma homogénea por toda la muestra
 - 6 Se añadió 50 μ l de conjugado recién preparado a los pocillos de ELISA con una pipeta
 - 7 Se añadió 50 μ l de estándares del 1-8 y las muestras de plasma de prueba a los correspondientes pocillos usando una micropipeta
 - 8 Se mezclaron bien durante 1 minuto en un agitador de microplacas el conjugado y las muestras/estándares de plasma
 - 9 Las placas se incubaron a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) durante 120 ± 5 minutos
 - 10 Durante la incubación, se preparó una parte del concentrado 20X de tampón de lavado con 19 partes de agua desionizada o destilada y mezcló bien
- Se lavaron los pocillos con 400 μ l de tampón 6 veces
- 11 Las placas se colocaron sobre un paño absorbente y dieron a unos toquecitos para que escurran los restos de tampón que puedan quedar

Se añadió 100µL de solución enzimática de sustrato a cada pocillo y mezclar bien con un agitador de microplacas

12 Las placas se incubaron a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) durante 30 minutos

13 Después de la incubación durante 30 minutos, se añadió 50µL de solución enzimática para detener la reacción en cada pocillo

14 Se procedió a medir la densidad óptica (DO) de cada pocillo a los 5 minutos de interrumpir la reacción mediante un lector de microplacas equipado con un filtro de 450nm y con un filtro de referencia de 620nm a 650nm. Los resultados se calcularon utilizando esos valores de DO

CÁLCULOS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO

Generación de curva estándar

Los valores de la DO medios de las réplicas del estándar del kit en cada placa permitieron crear una hoja de cálculo en el programa EXCEL donde se dibujó una curva estándar de logaritmo (e)-logaritmo (e) trazando el logaritmo (e) del valor medio DO (eje y) junto al logaritmo (e) de la concentración de interferón gamma de los estándares en UI/ml (eje x), omitiendo de estos cálculos el estándar cero. Se calculó la línea que mejor se adecua a la curva estándar por análisis regresivo.

A partir de la curva estándar, se determinó la concentración de IFN- γ (UI/ml) de cada una de las muestras de plasma, utilizando para ello el valor DO de cada muestra.

Se creó una base de datos utilizando el programa EXCEL para calcular el mediante un algoritmo lógico un análisis regresivo, para el coeficiente de variación (%CV) de los estándares y el coeficiente de correlación (r) de la curva estándar, entre otras variables con

un valor de confianza de 99,9% y 3% de error. Luego se generó gráficos en Excel para visualizar mejor los datos y se compararon cada uno de las DO obtenidas. Se hicieron 4 rondas de análisis de ELISA para abarcar todos los pacientes participantes. Los resultados se presentan en UI/ml y su equivalente en pg/ml basados en estudios donde se relaciona ambas unidades y señalan que las concentraciones en UI/ml pueden convertirse a pg/ml multiplicando por 40pg/UI (Desem N 1998, Kathryn L Kellar et al 2011)

Interpretación de los resultados

Los resultados del ensayo QuantiFERON®-TB Gold IT se interpretaron según los siguientes criterios

- **Negativos** Aquellos pacientes cuya medición de la absorbancia de la muestra del antígeno menos a medición de la absorbancia de la muestra nula resulte ser $< 0,35$ o $> 0,35$ y $< 25\%$ del valor del tubo nulo nos indica una infección por *M tuberculosis* improbable, es decir IFN- γ negativo
- **Positivos** Aquellos pacientes cuya medición de la absorbancia de la muestra del antígeno menos a medición de la absorbancia de la muestra nula resulte ser $\geq 0,35$ y $\geq 25\%$ del valor del tubo blanco nos indica una infección por *M tuberculosis* probable, es decir IFN- γ positivo. Ver anexo 2

Los resultados obtenidos fueron comparados con las variables discretas obtenidas de la prueba de PPD, los conteos de linfocitos TCD4 y con la medida de la carga viral para VIH-1, además se analizarán métodos estadísticos: valores del promedio, valores máximos y mínimos

El análisis estadístico se realizó mediante el programa OPENEPI que es un programa de estadísticas de código abierto para salud pública (http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm) y el programa EPINFO 7.0

Se calculó la sensibilidad, especificidad, precisión diagnóstica, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo

La prueba de concordancia kappa se usa en casos de que el resultado de la medición se expresa en una variable nominal y se calcula con base en la fórmula

$$\kappa = \frac{\text{Concordancia observada} - \text{Concordancia esperada}}{1 - \text{Concordancia esperada}}$$

Donde se evalúa si 2 pruebas se ponen de acuerdo solo por efecto del azar o si concuerdan en sus resultados, más allá de lo esperado por efecto del azar. El numerador representa que tanto excede la concordancia esperada por azar y el denominador que tanto desacuerdo era esperable por efecto del azar. Este coeficiente tiene valores entre 1.0 y -1.0. Este coeficiente juzga en qué proporción el acuerdo observado excede al esperado por efecto del azar mientras más cercano a 1.0 sea el resultado, más excede el acuerdo esperado al observado y más consistente se considera la medición. Esta prueba está muy relacionada a la distribución Ji cuadrado (Moreno 2013)

CAPITULO IV

RESULTADOS

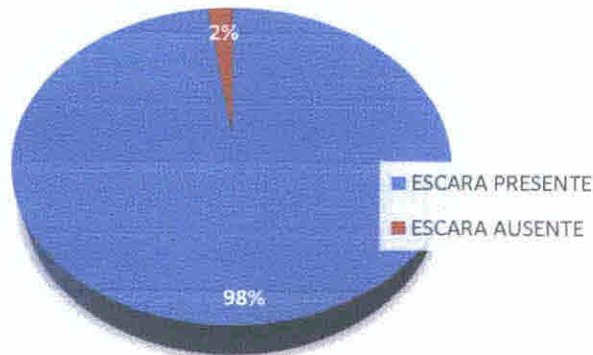
La población de referencia usada para obtener los valores de IFN- γ fueron 49 voluntarios que aceptaron participar en el estudio cumpliendo con el consentimiento informado previamente aceptado. Las edades de los voluntarios sanos comprendieron entre 19 y 22 años. De los 49 voluntarios 31% (15/49) fueron masculinos y 69% (34/49) femeninos. Los intervalos de valores se encontraron entre el valor mínimo obtenido de 0.004 UI/ml (0.16 pg/ml) y un máximo de 0.444 UI/ml (17.76 pg/ml). El coeficiente de variación fue de 0.6%. Se obtuvieron valores para el sexo masculino entre 0.004 UI/ml (0.16 pg/ml) y 0.379 UI/ml (15.16 pg/ml), con un promedio de 0.088 (3.52 pg/ml) UI/ml y para el femenino entre 0.020 (0.8 pg/ml) UI/ml y 0.444 UI/ml (17.76 pg/ml) con un promedio de 0.089 UI/ml (3.56 pg/ml). Para estos voluntarios el 100% de PPD fue negativo con una lectura de < 15 mm en el área de la induración.

En este estudio el total de pacientes analizados fue de 45, muestreados al azar durante los meses de septiembre a diciembre del 2012 en la consulta externa de Infectología e Inmunología Clínica del C. H. Dr. A. A. M. Los mismos aceptaron participar voluntariamente y firmar el consentimiento informado aprobado por el comité de ética del hospital, cumpliendo con los criterios de inclusión y exclusión. La historia de TBC fue recolectada del expediente clínico médico y de enfermería de la clínica de terapia antirretroviral. Los participantes contestaron voluntariamente el cuestionario que utilizamos como instrumento de recolección de datos, ver anexo N°3.

La edad promedio de los pacientes fue 43 años con un ámbito de 24 años hasta 68 años, de los cuales 62% (28) eran del sexo masculino y 38% (17) del sexo femenino. Con una relación de 1.6:1. La PPD fue correctamente aplicada y examinada en estos 45 pacientes, de estos 47% (21) fueron masculino y 38% (17) femenino.

El porcentaje de la población vacunada con BCG fue del 98% (44/45), de los cuales 64% (27) son de sexo masculino y 38% (17) son femeninos, sólo un paciente no mostró la escara de la vacuna en el examen físico realizado, por lo tanto fue catalogado como no vacunado. Esto se muestra en la Gráfica N°1.

Gráfica N° 1: Porcentaje de Pacientes VIH vacunados con BCG



Fuente: Base de datos y archivos del estudio. Comparación de la determinación de Interferón γ vs la Prueba de Tuberculina en el diagnóstico de tuberculosis latente en pacientes VIH-1 en el C.H.Dr.A.A.M de octubre a diciembre del 2012.

Del total de pacientes vacunados con BCG tenemos 86% (38/44) que resultaron negativos para IFN- γ . El 13% de los pacientes BCG positiva fueron IFN- γ positivo (6/44). El único paciente BCG negativo fue también IFN- γ negativo. Esto se detalla en el cuadro N°1.

Cuadro N° 1 Comparación de Frecuencias absolutas de pacientes BCG vs IFN- γ

BCG	Resultado IFN- γ		Total
	Negativa	Positiva	
NO BCG	1 (1%)	0	1 (1%)
SI BCG	38 (86%)	6 (13%)	44 (99%)
Total	39 (87%)	6 (13%)	45 (100%)

Fuente: Base de datos y archivos del estudio Comparación de la determinación de Interferón γ vs la Prueba de Tuberculina en el diagnóstico de tuberculosis latente en pacientes VIH 1 en el C H A.A.M de octubre a diciembre del 2012

De los pacientes vacunados con BCG tenemos que 94% (42/45) obtuvieron resultados PPD negativa. Se obtuvo 2 pacientes es decir 4% que presentaron BCG positiva con PPD positiva. Para los pacientes con BCG negativa y PPD negativa se obtuvo 1 paciente 2%. No se obtuvo ningún paciente BCG negativo con PPD positiva. Esto se detallan en la cuadro N°2

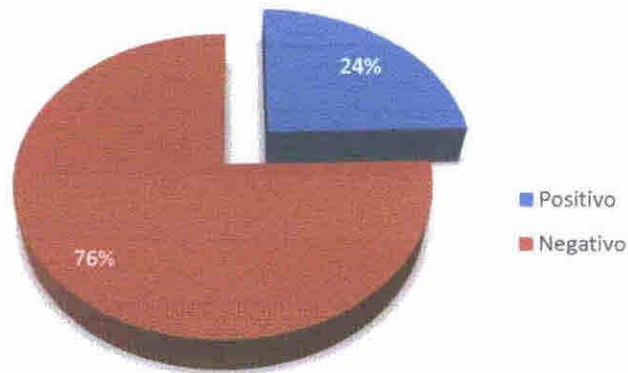
Cuadro N° 2 Comparación de proporciones entre vacunados con BCG con la prueba de PPD

BCG	Resultado PPD		Total
	Negativa	Positiva	
NO BCG	1(2%)	0	1(2%)
SI BCG	42 (94%)	2 (4%)	44(98%)
Total	43 (96%)	2 (4%)	45 (100%)

Fuente: Base de datos y archivos del estudio Comparación de la determinación de Interferón γ vs la Prueba de Tuberculina en el diagnóstico de tuberculosis latente en pacientes VIH-1 en el C H A.A.M de octubre a diciembre del 2012

El porcentaje de pacientes que contestaron afirmativamente que estuvieron expuestos a la tuberculosis (COMBE positivo) fue de 24% (11/45), de los cuales el 64% (7/11) eran masculino y 36% (4/11) femenino. Mientras que el 76% (34/45) no tenía conocimiento de estar expuesto a la misma (COMBE negativo). Donde el 62% (21/34) eran masculino y 38% (13/34) femenino. Ver el gráfico 2

Gráfica N° 2: Porcentaje de COMBE en Pacientes VIH



Fuente: Base de datos y archivos del estudio. Comparación de la determinación de Interferón γ vs la Prueba de Tuberculina en el diagnóstico de tuberculosis latente en pacientes VIH-1 en el C.H.Dr.A.A.M de octubre a diciembre del 2012

En el cuadro N°3 muestra la distribución de acuerdo al resultado de IFN- γ . Se observa que la edad promedio para esta prueba positiva se encuentra entre 47 años y 42 para la prueba negativa, con una proporción hombre-mujer de 3:2 (3/2) para los resultados positivos y 1.6:1 (25/15) para los negativos.

De los 44 pacientes vacunado con BCG 14% (6/44) fueron IFN- γ positivo y un 87% (38/44) fueron negativos a IFN- γ . El único paciente BCG negativo fue también negativo para IFN- γ .

Con respecto a la exposición a la tuberculosis, los pacientes que presentaron el IFN- γ positivo, 33% (2/6) fueron COMBE positivo y 66% (4/6) COMBE negativo. De los pacientes con IFN- γ negativos, 23% (9/39) presentaron COMBE positivo y 77% (30/39) COMBE negativo.

El promedio de linfocitos TCD4 y TCD8 para el INF- γ positivo fue de 421 y 870 células/ul y para el INF- γ negativo fue de 566 y 868 células/ul respectivamente

Cuadro N° 3 Comparación de Proporciones de IFN- γ por las características de la muestra estudiada

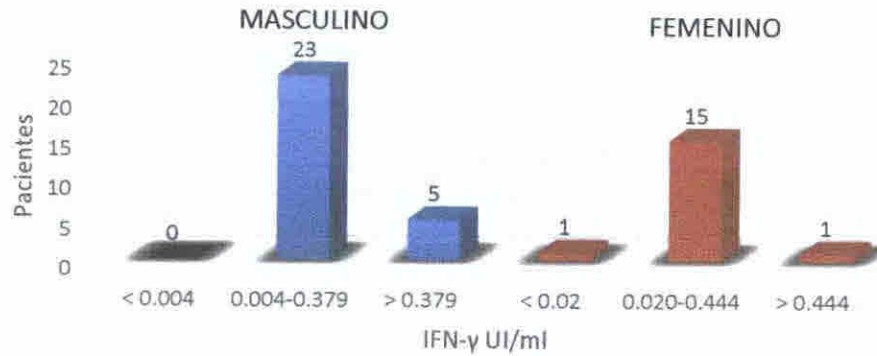
	IFN-γ Positivo	IFN-γ Negativo
Total Pacientes	6 (13%)	39 (87%)
Edad promedio	49	42
Sexo hombre/mujer	2/1	24/15 16/1
Vacunación BCG	6 (11%)	38 (89%)*
COMBE Positivo / Negativo	2 (33%)/4 (66%)	9 (23%) /30 (77%)
Promedio Linfocitos TCD4/ TCD8 células/ul	424/881	569/867

*Se excluye un paciente no vacunado en el estudio con IFN γ negativo

Fuente Base de datos y archivos del estudio Comparación de la determinación de Interferón γ vs la Prueba de Tuberculina en el diagnóstico de tuberculosis latente en pacientes VIH 1 en el C H A.A.M de octubre a diciembre del 2012.

Se observo que la frecuencia de pacientes agrupados de acuerdo al sexo y a la concentración de IFN- γ que presentaron mayor frecuencia, con un 82% (23/28), fue el grupo de 0 004-0 379 UI/ml (0 16-15 16 pg/ml) entre los pacientes masculinos y un 88% (15/17) el grupo de 0 020-0 444 UI/ml (0 8-17 76 pg/ml)n entre las pacientes femeninas Con respecto a los grupos positivos para IFN- γ se encontro un 18% (5/28) entre los pacientes masculinos y un 6% (1/17) entre las pacientes femeninas Una paciente femenina resulto con una produccion de IFN- γ de 0 016 UI/ml (0 64 pg/ml) lo que representa 6% (1/17) Esto se muestra en la Grafica N°3

Gráfica N° 3: Frecuencias absolutas de concentraciones de IFN- γ según sexo en PVVIH



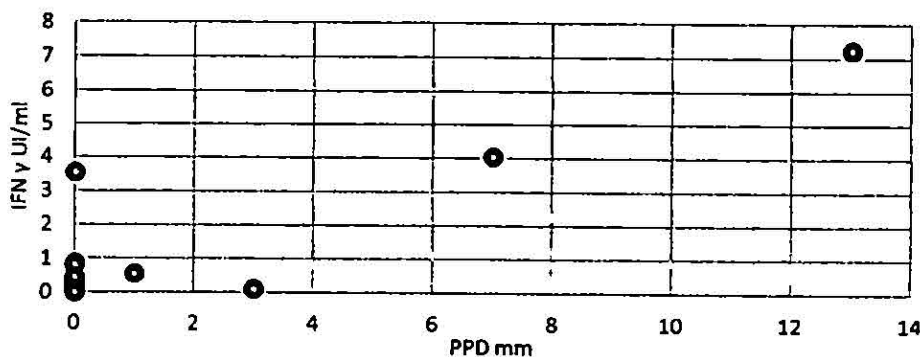
* Se excluye un paciente masculino cuyo resultado se considera negativo debido a un valor basal alto de IFN- γ no específico
 Fuente: Base de datos y archivos del estudio. Comparación de la determinación de Interferón γ vs la Prueba de Tuberculina en el diagnóstico de tuberculosis latente en pacientes VIH-1 en el C.H.Dr.A.A.M de octubre a diciembre del 2012

La frecuencia de pacientes de acuerdo a la prueba de PPD es mayor que la del grupo con PPD negativa de 0 mm, con un 91% (41/45) con respecto a los demás grupos evaluados. Hubo un 4.5% (2/45) de pacientes con mediciones entre 1 y 5 mm. Los pacientes que fueron positivos ≥ 5 mm representaron el 4.5 % (2/45). Esto se muestra en la Gráfica N°4.

Gráfica N° 4: Frecuencia Absoluta de PPD en pacientes VIH

Fuente: Base de datos y archivos del estudio. Comparación de la determinación de Interferón γ vs la Prueba de Tuberculina en el diagnóstico de tuberculosis latente en pacientes VIH 1 en el C.H.Dr.A.A.M de octubre a diciembre del 2012

De los 45 pacientes que se realizaron la PPD 4% (2/45) fueron positivo y 96% (43/45) negativos. Ambos pacientes positivo para la PPD, fueron positivos para IFN- γ , 100% (2/2). De los 43 pacientes con PPD negativos, cuatro fueron positivos para IFN- γ 9% (4/43) y 39 fueron negativos 91% (39/43) para ambas pruebas. Gráfica N°5

Gráfica N° 5: Frecuencia Absoluta de PPD e IFN- γ 

Fuente: Base de datos y archivos del estudio. Comparación de la determinación de Interferón γ vs la Prueba de Tuberculina en el diagnóstico de tuberculosis latente en pacientes VIH 1 en el C.H.Dr.A.A.M de octubre a diciembre del 2012

Del total de pacientes tenemos que el 87% (39/45) obtuvieron resultados negativos en IFN- γ y PPD. No se obtuvo ningún caso de PPD positiva con IFN- γ negativo. El 9%

(4/45) de las PPD negativa fueron IFN- γ positivo y 4% (2/45) de las PPD positiva fueron IFN- γ positivo Ver detalle en el cuadro N°4

Resultado IFN- γ	Resultado PPD		Total
	PPD Negativa	PPD Positiva	
IFN- γ Negativo	39 (87%)	0	39 (87%)
IFN- γ Positivo	4 (9%)	2 (4%)	6 (13%)
Total	43 (96%)	2 (4%)	45 (100%)

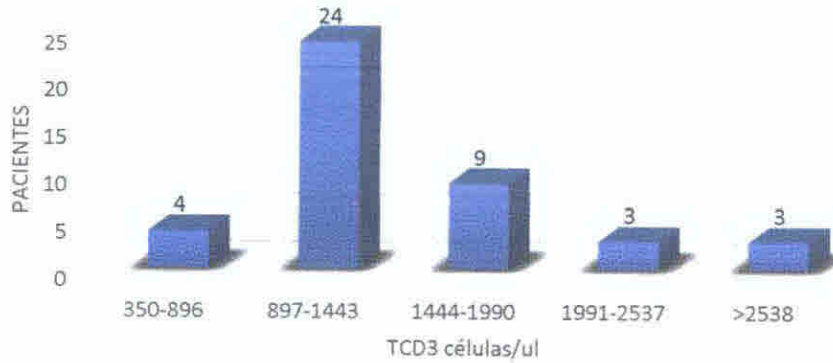
Nota Se excluyeron 4 sujetos que no completaron los datos del estudio

Fuente Base de datos y archivos del estudio Comparación de la determinación de Interferón γ vs la Prueba de Tuberculina en el diagnóstico de tuberculosis latente en pacientes VIH 1 en el C.H.A.A.M. de octubre a diciembre del 2012.

Gráfica N° 6: Frecuencia absoluta de TCD3 en pacientes VIH

La frecuencia absoluta de acuerdo al conteo de linfocitos TCD3, muestra que la mayor frecuencia, 56% (24/43) se encontraba entre 897-1443 células/ul seguido por un 21% (9/43) en el grupo entre 1444–1990 y un 9% (8/43) en el grupo entre 350 – 896 células/ul Además hubo un 7% (3/43) con frecuencias entre 1991-2537 y un 7% (3/45) con más 2538 células/ul Gráfica N°6

Cuadro N° 4: Comparación de prueba IFN- γ con la prueba de PPD en pacientes VIH

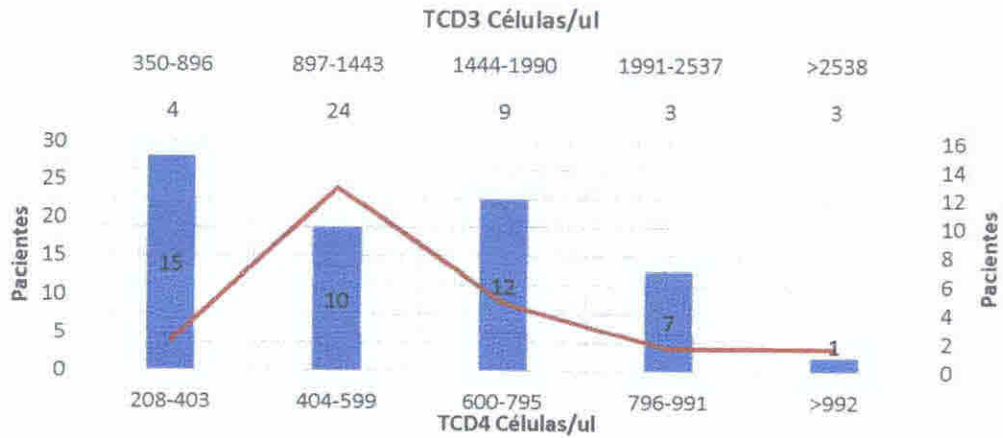


Fuente: Base de datos y archivos del estudio. Comparación de la determinación de Interferón γ vs la Prueba de Tuberculina en el diagnóstico de tuberculosis latente en pacientes VIH-1 en el C.H.Dr.A.A.M de octubre a diciembre del 2012

La frecuencia absoluta de pacientes agrupados de acuerdo al conteo de células TCD4 muestra que el grupo que presentó la mayor frecuencia se encontró entre 208-403 células/ul, lo que representa el 33% (15/45). La segunda frecuencia que agrupó más pacientes fue de 600 – 795, siendo esta el 27% (12/45), seguida por la de 404 – 599, siendo esta el 22% (10/45). Un 16% (78/45) de los pacientes tenían 796- 991 células/ul y solo 4% (2/45) tenían más de 992 células/ul, Gráfica N°7.

Se observa que la distribución del conteo de las células TCD3 se encuentra esparcida en las 3 primeras frecuencias de células TCD4

Gráfica N° 7: Frecuencia Absoluta de TCD3 y TCD4 en pacientes VIH

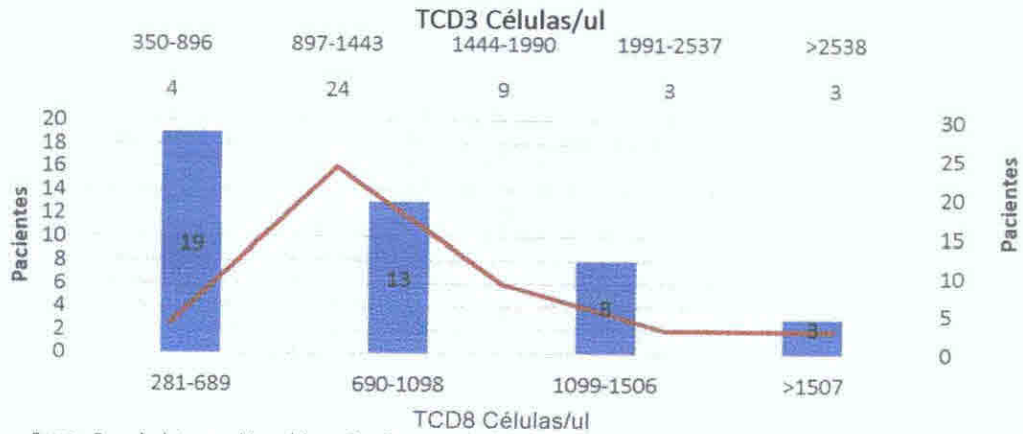


Fuente: Base de datos y archivos del estudio. Comparación de la determinación de Interferón y vs la Prueba de Tuberculina en el diagnóstico de tuberculosis latente en pacientes VIH-1 en el C.H.Dr.A.A.M de octubre a diciembre del 2012

La frecuencia de pacientes agrupados de acuerdo al conteo de células TCD8 muestra la mayor frecuencia entre 281-689 células/ul, esto representa un 44% (19/43). Un 30% (13/43) presento una frecuencia de 690-1098 células/ul. Además, un 19% (8/43) presento una frecuencia de 1099-1506 células/ul. Los pacientes con >1507 células/ul TCD8 representaron un 7% (3/45).

La distribución del conteo de las células TCD3 muestra que la mayor cantidad de las células TCD8 se encuentra incluida en las frecuencias más altas de células TCD8, Gráfica N°8.

Gráfica N° 8: Frecuencia Absoluta de TCD3 y TCD8 en pacientes VIH



Fuente: Base de datos y archivos del estudio. Comparación de la determinación de Interferón γ vs la Prueba de Tuberculina en el diagnóstico de tuberculosis latente en pacientes VIH-1 en el C.H.Dr.A.A.M de octubre a diciembre del 2012

El cuadro N°5 muestra que un 33% (15/45) de pacientes tuvieron un mínimo de 0.02 UI/ml (0.8 pg/ml) y un máximo de 7.26 UI/ml (290 pg/ml) con un promedio de IFN- γ 1.16 UI/ml (46.4 pg/ml) tiene entre 208 y 403 TCD4. Además, el 22% (10/45) de los pacientes tuvieron un mínimo de 0.03 y un máximo de 0.84 UI/ml (33.6 pg/ml) con un promedio de IFN- γ 0.24 UI/ml (9.6pg/ml) con mayor concentración de TCD4 404-599 células/ul. Un 27% (12/45) tuvieron un mínimo de 0.04 (1.6 pg/ml) y un máximo de 0.87 UI/ml (34.8 pg/ml) con un promedio de IFN- γ 0.13 con conteo de TCD4 entre 600-795 células/ul. También 16% (7/45) de pacientes presentaron un mínimo y máximo de 0.03-0.46 UI/ml (1.2-18.4 pg/ml) con un promedio de 0.18 UI/ml (7.2 pg/ml) y un conteo de TCD4 de 796-991 células/ul, cuadro N°5.

Cuadro N° 5: IFN- γ en UI/ml vs conteo de Linfocitos TCD4 en pacientes VIH-1

N° Pacientes	Valores mínimo y máximo / promedio de concentraciones IFN- γ UI/ml	Cantidad de Linfocitos CD4 células/ul
15 (33%)	0 02-7 26 / 1 16	208-403
10 (22%)	0 03-0 84 / 0 24	404-599
12 (27%)	0 04-0 87 / 0 13	600-795
7 (16%)	0 03-0 46 / 0 18	796-991

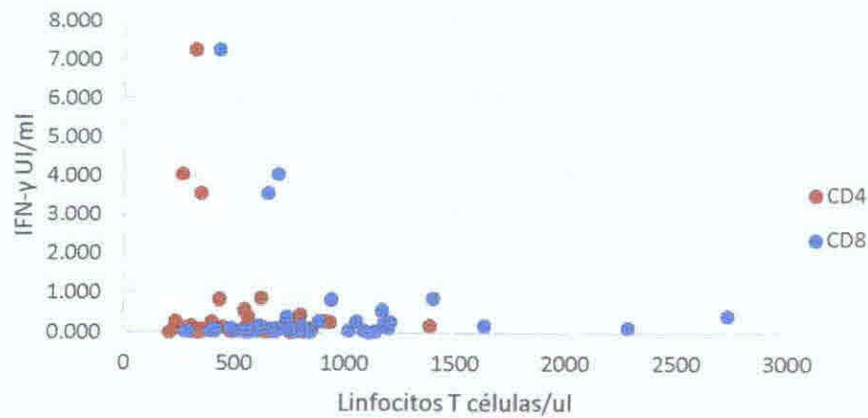
Nota Se excluye un paciente que presentó TCD4 > 991 células/ul

Fuente Base de datos y archivos del estudio Comparación de la determinación de Interferón γ vs la Prueba de Tuberculina en el diagnóstico de tuberculosis latente en pacientes VIH-1 en el C H A.A.M de octubre a diciembre del 2012

La distribución de pacientes de acuerdo a la concentración de IFN- γ muestra que los casos positivos que representan el 13% (6/45) se encuentran entre 0 6 y 7 26 UI/ml (24-290 pg/ml) respectivamente. Además estos casos positivos muestran concentraciones de linfocitos TCD4 entre 266 y 623 células/ul con un promedio de 424 células/ul. Las células TCD8 para estos se encuentran con un mínimo de 432 y un máximo de 1398 células/ul con un promedio de 881 células/ul.

Los pacientes negativos presentaron concentraciones de linfocitos TCD4 entre 208 y 1383 células/ul con un promedio de 570 células/ul. Las células TCD8 para estos se encuentran con un mínimo de 281 y un máximo de 2732 células/ul con un promedio de 867 células/ul, Gráfica N°9

Gráfica N° 9: Distribución de Linfocitos TCD4, TCD8 e IFN- γ

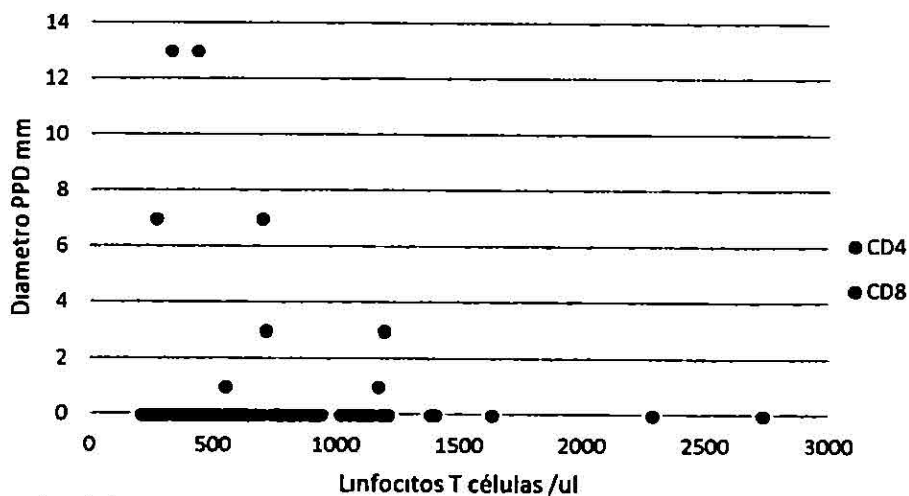


Fuente: Base de datos y archivos del estudio. Comparación de la determinación de Interferón γ vs la Prueba de Tuberculina en el diagnóstico de tuberculosis latente en pacientes VIH-1 en el C.H.Dr.A.A.M de octubre a diciembre del 2012

La distribución de pacientes de acuerdo al número de linfocitos TCD4 en pacientes positivos a PPD 4% (2/45), se encontró entre 266 y 324 células/ul con un promedio de 295 células/ul. De acuerdo al número de TCD8 este se encontró entre 432-697 células/ul con un promedio de 564 células/ul. El diámetro estuvo entre 7 y 13 respectivamente para la PPD.

En los pacientes negativos encontramos entre 208 y 1383 células/ul para los TCD4 con un promedio de 562 células/ul. De acuerdo al número de TCD8 este se encontró entre 281-2732 células/ul con un promedio de 883 células/ul. El diámetro de PPD en los casos positivos 96% (43/45) estuvo entre 0 y 3 mm respectivamente. Ver gráfico N°10.

Gráfica N° 10: Distribución de Linfocitos TCD4, TCD8 y PPD



Fuente Base de datos y archivos del estudio Comparación de la determinación de Interferón γ vs la Prueba de Tuberculina en el diagnóstico de tuberculosis latente en pacientes VIH-1 en el C.H.Dr.A.A.M de octubre a diciembre del 2012

En el cuadro N° 6 se muestra la distribución de acuerdo al resultado de la prueba PPD. Se observa que la edad promedio para la prueba positiva está en 48 años y 42 para la prueba negativa. Con una proporción hombre-mujer de 1:1 para los resultados positivos y 1:6:1 (28/18) para los negativos.

De los 44 pacientes BCG positivos un 4% (2/44) fueron PPD positivos y no se detectó ningún paciente con BCG negativa y PPD negativa. De los dos pacientes PPD positivos, 50% (1/2) presentó COMBE positivo y el otro 50% (1/2) COMBE negativo. De los pacientes con PPD negativos, 23% (10/45) presentaron COMBE positivo y 77% (33/45) COMBE negativo.

Los promedios de IFN- γ para PPD positivos fue 5.66 UI/ml (226 pg/ml) y 0.24 UI/ml (9.6 pg/ml) para la PPD negativa.

El promedio de linfocitos TCD4 para la PPD positiva fue de 295 células/ul y para la PPD negativa fue de 564 células/ul. Para los linfocitos TCD8 el promedio fue 562 y 883 células/ul para PPD positiva y PPD negativa respectivamente. Ver cuadro 6.

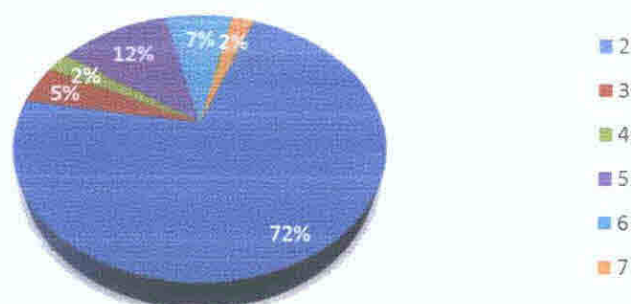
Cuadro N° 6: Comparación de características según resultados de PPD

	PPD Positivo	PPD Negativo
Total Pacientes	2 (4%)	43(96%)
Edad promedio	48	42
Sexo hombre/mujer	1/1	27/16
Vacunación BCG	2 (4%)	42 (95)% *
COMBE Positivo / Negativo	1 (50%)/1 (50%)	10 (23%)/33 (77%)
Promedio IFN- γ UI/ml	5.66	0.24
Promedio Linfocitos TCD4/ TCD8 células/ul	295/564	564/883

*Se excluye un paciente no vacunado en el estudio con PPD negativo.

Fuente: Base de datos y archivos del estudio. Comparación de la determinación de Interferón γ vs la Prueba de Tuberculina en el diagnóstico de tuberculosis latente en pacientes VIH-1 en el C.H.A.A.M de octubre a diciembre del 2012.

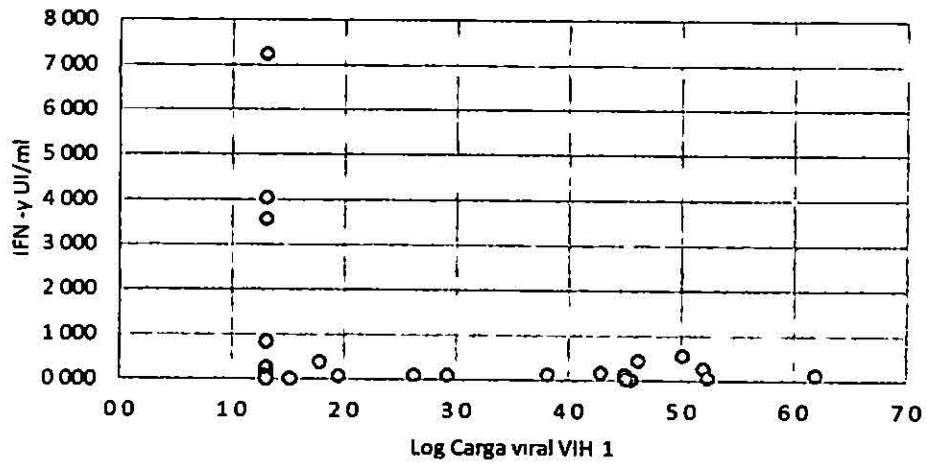
Debido a los amplios valores de carga viral para VIH-1 estos se trabajaron con el logaritmo de base 10, un 72% de los pacientes (31/45) mostraron una carga viral entre 100 – 1000 copias, que corresponde a 2.0 unidades logarítmicas, Esto corresponde es una carga viral baja, Gráfica N°11.

Gráfico N° 11: Porcentajes de pacientes de acuerdo al resultado del log de Carga Viral VIH-1 2012

Fuente: Base de datos y archivos del estudio. Comparación de la determinación de Interferón γ vs la Prueba de Tuberculina en el diagnóstico de tuberculosis latente en pacientes VIH-1 en el C.H.Dr.A.A.M de octubre a diciembre del 2012

El grafico N °12 muestra que 72% (31/43) de los pacientes se distribuyeron mas frecuentemente segun su carga viral Log 10, entre el log 1 a 1 99 y 21% (9/43) entre log 4 a 6 2 Solo un 7% (3/43) de los pacientes se ubico en logaritmos intermedio entre 2 y 3 99 El 86% (37/43) fueron negativos para IFN- γ , la carga viral Log 10 presento un minimo de 1 30, un máximo de 6 18 y un promedio de 4 73 El 14% (6/43) positivos para IFN- γ , la carga viral Log 10 presento un minimo de 1 30, un maximo de 5 0 y un promedio de 4 22 Leer grafico N°12

Gráfica N° 12: Frecuencia Relativa del Log Carga Viral VIH-1 e IFN- γ .



Fuente: Base de datos y archivos del estudio. Comparación de la determinación de Interferón γ vs la Prueba de Tuberculina en el diagnóstico de tuberculosis latente en pacientes VIH 1 en el C.H.Dr.A.A.M de octubre a diciembre del 2012

El cuadro N°7 muestra la cantidad de pacientes, el valor mínimo y máximo, promedio y carga viral Log 10 Este dato solo pudo recolectarse en 43 de los 45 pacientes El 77% (33/43) de los pacientes se ubican entre el primer y segundo logaritmo, con valores de carga viral entre 1 0-2 9 (20-9999 copias por ml) y presentaron un valor mínimo de 0 02 UI/ml (0 8 pg/ml), máximo de 7 26 UI/ml (290 pg/ml) y un promedio de 0 59 UI/ml (23 6 pg/ml) de IFN- γ Un 14% (6/43) estuvo entre el tercer y cuarto logaritmo con valores

de carga viral entre 3 0-4 9 (1000-99999 copias por ml) y presentaron un valor mínimo de 0 03 UI/ml, (1 2 pg/ml) máximo de 0 45 UI/ml (18 pg/ml) y un promedio de 0 17 UI/ml (6 8 pg/ml) de IFN- γ . Por último 9% (4/43) se ubicó entre el quinto y sexto logaritmo con valores de carga viral entre 5 0-6 9 (100000-9999999 copias por ml) con un valor mínimo de 0 07 UI/ml (2 8pg/ml), máximo de 0 57 UI/ml (22 8 pg/ml) y un promedio de 0 27 UI/ml (10 8 pg/ml) de IFN- γ .

Cuadro N° 7 IFN- γ en UI/ml vs la concentración en Log de carga viral en pacientes VIH-1

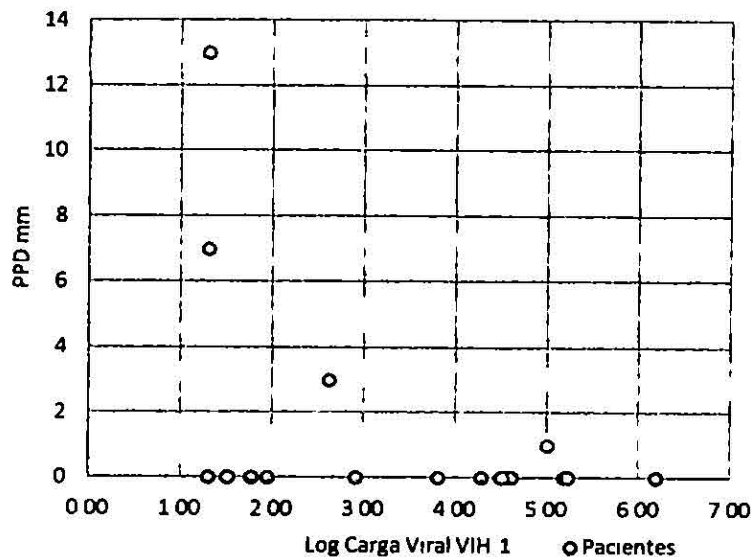
N° Pacientes	Valores mínimo y máximo /promedio de concentraciones IFN- γ UI/ml	Concentración Log ARN VIH-1 circulante/ ml
33 (77%)	0 02-7 26 / 0 59	1 0-2 9
6 (14%)	0 03-0 45 / 0 17	3 0-4 9
4 (9%)	0 07-0 57 / 0 27	5 0-6 9

Se excluyen 2 pacientes que no presentaron el valor de la carga viral para VIH 1

Fuente: Base de datos y archivos del estudio Comparación de la determinación de Interferón γ vs la Prueba de Tuberculina en el diagnóstico de tuberculosis latente en pacientes VIH 1 en el C H A.A.M de octubre a diciembre del 2012.

La grafica N°13 muestra que 77% (33/43) de los pacientes se distribuyeron más frecuentemente según su carga viral Log₁₀, entre el log 1 a 2 99 y 23% (10/43) entre log 3 a 6 2. El 4 6% (2/43) fueron PPD positivo entre los log 1 a 2 99 y 95% (41/43) fueron negativo. No se encontró pacientes positivos a PPD entre log 3 a 6 2 y un 100% (10/10) fueron negativos.

Gráfica N° 13: Frecuencia de Relativa de PPD y Log Carga Viral HIV-1



Fuente: Base de datos y archivos del estudio. Comparación de la determinación de Interferón γ y vs la Prueba de Tuberculina en el diagnóstico de tuberculosis latente en pacientes VIH 1 en el C.H Dr.A.A.M de octubre a diciembre del 2012

Para este estudio sobre se obtuvo 99% para la sensibilidad de la prueba evaluada de IFN- γ , la especificidad fue de 91% a medida que ambos índices se acercan al 100% se considera que la prueba es mas eficaz que la PPD, es decir que la prueba de IFN- γ tiene alta sensibilidad y especificidad ya que detecta el 99% de los enfermos y con una alta capacidad de identificar los individuos sanos

El valor predictivo positivo para esta prueba fue de 33%, es decir que si la prueba de IFN- γ es positiva, la probabilidad estimada de que un individuo tenga realmente tuberculosis latente es 33%

El valor predictivo negativo fue de 99% es decir que si la prueba tiene un resultado negativo la probabilidad estimada de que no padezca tuberculosis latente es de 99%

Estos valores son de enorme utilidad para tomar decisiones clinicas, aunque dependen de

la prevalencia de la enfermedad La precision diagnostica obtenida fue de 91% El indice kappa obtenido fue de 0.46 se considera bueno segun la interpretacion de Landis y Koch La concordancia observada entre ambas pruebas de PPD e IFN- γ fue 96% (43/45) es 46% mayor que la concordancia esperada por el azar segun la prueba kappa

Cuadro N° 8. Pruebas Estadísticas aplicadas y resultados obtenidos para IFN- γ

Prueba	Resultado
Sensibilidad	99%
Especificidad	91%
Precision diagnostica	91%
Valor predictivo negativo	99%
Valor predictivo positivo	33%
Prueba kappa	0.46

Fuente: Base de datos y archivos del estudio. Comparación de la determinación de Interferón γ vs la Prueba de Tuberculina en el diagnóstico de tuberculosis latente en pacientes VIH I en el C.H.A.A.M. de octubre a diciembre del 2012

DISCUSION

En el mundo hay 2000 millones de personas con infección latente por el bacilo de la tuberculosis (TB) En condiciones normales, solo un 10% de ellas, aproximadamente, acaban padeciendo TB activa a lo largo de su vida, la mayoría en los dos años siguientes a la infección (OMS 2014)

En el año 2012 el número de PVVIH y tuberculosis en las Américas fue de 132,943 y de pacientes con VIH y tuberculosis era de 20,798 con un aumento desde el año 2005 de 35% al 57% en el 2012 (World Health Organization 2013)

La tuberculosis latente indica un estado en el que el individuo ha estado en contacto con el bacilo, lo ha respirado y se ha infectado, pero consigue evitar su proliferación, por lo que la enfermedad no se desarrolla. Es decir que *M tuberculosis* resiste dentro de su huésped sin causar indicios o síntomas conservando la viabilidad con la capacidad para replicarse y causar la enfermedad sintomática (Esmail, Barry, and Wilkinson 2012)

En la tuberculosis latente, las pruebas serán normales y la persona no tendrá ningún signo o síntoma, siendo además incapaz de transmitir la tuberculosis a los demás. La identificación de los bacilos en los individuos con infección latente no es factible en la actualidad y por lo tanto se infiere únicamente a través de pruebas en las que se ha producido la sensibilización inmunológica (Esmail et al 2012)

La prueba de PPD se ha utilizado durante más de un siglo en todo el mundo como ayuda en el diagnóstico de la LTB tanto, es de bajo costo y no necesita una gran

infraestructura Esta prueba de diagnóstico, metódica por más de 40 años, aun se utiliza por la medición de la induración formada 48-72 horas después de la inyección intradérmica de 2 a 10 unidades de derivado proteico purificado (PPD) de la tuberculina Esta prueba de la tuberculina (PPD) ha guiado a nuestra comprensión de la epidemiología de la tuberculosis latente (Esmail et al 2012)

El VIH debilita el sistema inmunitario, lo cual aumenta la probabilidad de que la infección latente por tuberculosis progrese hacia la enfermedad activa Los pacientes infectados por el VIH tienen una probabilidad hasta 50 veces mayor de sufrir TB a lo largo de su vida, en comparación con los no infectados

En Panamá en el 2012 el número de PVVIH y tuberculosis fue de 1600 y de pacientes con VIH y tuberculosis fue de 224 con un aumento desde el año 2005 de 86% al 96% en el 2012 (World Health Organization 2013)

Actualmente la tuberculosis latente tiene alternativas para el diagnóstico en poblaciones de alto riesgo, ya que el desarrollo de pruebas *in vitro* como el IFN- γ específico para esta enfermedad nos permite evaluar la respuesta inmune contra el *M tuberculosis* siendo un gran avance en el diagnóstico de la misma Los antígenos más utilizados son antígeno secretorio temprano dirigido (ESAT-6) y filtrado de proteína-10 (CFP-10), más específicos que los derivados de proteínas usados en la PPD

Los valores encontrados en los 49 voluntarios sanos van desde 0.004 UI/ml hasta 0.444 UI/ml, con un promedio de 0.088 y un coeficiente de variación de 0.6% Estudios consideran la división entre positivos y negativos en 0.35 UI/ml sugerido en el inserto de

la prueba (Metcalf et al 2013, Ringshausen et al 2011) Otros estudios señalan valores de IFN- γ con promedios de 0.91 UI/ml en personal militar con resultados de PPD < 15mm (Van Brummelen 2010) Sin embargo otros describen en pacientes COMBE positivos que fueron considerados negativos con concentraciones de 0,02 UI/ml (Takenami et al 2012)

Se encontro que la edad promedio de los pacientes era de 43 años los que nos ubica en uno de los grupos etarios de mayor porcentaje de PVVIH en nuestro pais con un 13.5% (Salud, Ministerio de 2013) La relacion hombre mujer encontrada fue de 1.6:1, difiriendo del reporte trimestral presentado por el Ministerio de Salud el cual muestra una relacion 3:1, esto puede deberse a que normalmente la mujeres acuden con mas frecuencia a las citas medicas (Salud, Ministerio de 2013)

Un estudio realizado en Alemania analizo 75 pacientes de los cuales 10.7 (8/75) estaban vacunados y 87.3 (67/75) no estaban vacunados, esto fue considerado en base a la presencia de cicatriz de la vacuna (Latorre et al 2010) En España (Ramos et al 2012) evaluo 13.9% (40/373) PVVIH vacunados Otros estudios realizados en China (Zhang et al 2010) evaluo 93 PVVIH de los que el 100% estaba vacunado, esto fue considerado tambien con la presencia de cicatriz de la vacuna y/o historial de vacunacion y (Jiang et al 2009) tambien analizo poblaciones de PVVIH con 100% de pacientes vacunados segun su historial de vacunacion Nuestro estudio presenta un 98% (44/45) de la poblacion estaba vacunada con BCG Esto indica un porcentaje alto de la poblacion De estos 64% (27) son de sexo masculino y 38% (17) son femeninos, 2% (1/45) no mostro la escara de la vacuna en el examen fisico realizado, por lo tanto fue catalogado como no vacunado

En el estudio (Latorre et al 2010) no se encontro ningun paciente vacunado positivo por el ensayo usado en nuestro estudio, sin embargo entre los pacientes no vacunados hubo 75 % (5/67) positivos por IFN- γ (Zhang et al 2010) obtuvo que los ensayos que utilizan IFN- γ para captar LTB no son afectados por la vacunacion previa con BCG en adultos PVVIH. Nuestro estudio obtuvo el 86% (38/44) de pacientes vacunados con BCG negativos para IFN- γ . El 13% (6/44) de los pacientes BCG positiva fueron IFN- γ positivo. Un paciente BCG negativo fue tambien IFN- γ negativo. Estos resultados pueden sugerir si el resultado de IFN- γ que todos los casos IFN- γ positivos de nuestro estudio estaban vacunados por lo que no se observa reaccion cruzada con la vacunacion de los pacientes analizados.

Los paises que tienen vacunacion con BCG pueden considerar los analisis de IFN- γ como primera opcion en lugar de la PPD en poblaciones de alto riesgo. Operacionalmente la prueba de IFN- γ utilizada en este estudio es muy conveniente una sola visita del paciente para ayudar a hacer el diagnostico y previene los casos de sobreestimulacion del sistema inmune debido a multiples aplicaciones de la PPD (Zabel 2011).

En Alemania se encontró que un 50% (4/8) de los pacientes PPD positivos estaban vacunados y 75% (5/67) fueron PPD positivo, y no estaban vacunados por lo que señala la especificidad del IFN- γ en comparacion con la prueba PPD en pacientes vacunados con BCG por lo que el IFN- γ se encuentra menos influenciado por la vacunacion con BCG (Latorre et al 2010). Otro estudio encontró que usando PPD para captar LTB con vacunacion previa con BCG en adultos PVVIH, se obtiene hasta 100% de positividad.

para la misma (Zhang et al 2010), mientras que otros han encontrado que el efecto de la vacunacion en la infancia especialmente > 10 años con esta vacuna tiene un efecto mínimo sobre el resultado de la PPD (Farhat et al 2006)

En nuestro estudio se observó que en un 4% (2/44) para los pacientes vacunados con PPD positiva, un 94% (42/45) obtuvieron resultados PPD negativa en contraste con (Latorre et al 2010) Es decir, los porcentajes obtenidos de pacientes para ambas pruebas son de un 13% (6/44) para IFN- γ y un 4% (2/44), para la prueba de PPD No se muestra en nuestro estudio que la vacunacion sea interferente o cause falsos positivos en estas pruebas Además hubo 2% (1/44) de pacientes con BCG negativa y PPD negativa y no se obtuvo ningun paciente BCG negativo con PPD positiva

En nuestro estudio el conocimiento de la exposición a la tuberculosis por parte de los pacientes no estuvo relacionado al desarrollo de la enfermedad ya que se obtuvo 80% IFN- γ positivo con COMBE negativo y con la prueba de PPD esta comparacion fue del 50% Sin embargo, otros autores observaron en adultos con VIH expuestos a la tuberculosis tienen una tasa más alta de positividad con un 30.9 con IFN- γ positivo que la prueba de PPD con un 17.3 (Ramos et al 2012)

Se podria suponer que la exposicion de nuestros participantes no se dio en la etapa infecciosa de la tuberculosis ya que para que ocurra el contagio la transmision de la enfermedad puede ser por via directa, de un individuo afectado a otro, fundamentalmente por las gotitas de saliva que contengan a este microorganismo, o por via indirecta por la inhalacion del bacilo que se puede encontrar por meses en los objetos de uso diario, debido a su gran resistencia

En este estudio se detectaron el 9 % (4/45) de casos entre los pacientes evaluados por IFN- γ mientras que con la PPD 4% (2/45) Otros estudios muestran una fuerte respuesta de IFN- γ en sangre periférica de individuos con tuberculosis latente mientras que los que presentan tuberculosis activa presentan la respuesta al TNF α (Esmail et al 2012)

Los promedios de IFN- γ para PPD positivos fue 5 66 UI/ml y 0 24 UI/ml para la PPD negativa, mostrando un aumento de la concentración entre los pacientes positivos y una concentración dentro de los valores considerados negativos para población saludable Esto nos sugiere que el IFN- γ puede ser considerado como alternativa para la detección de LTB y en la prevención del desarrollo de tuberculosis activa en la población de riesgo como son los PVVIH en nuestro país (Cattamanchi et al 2011)

El ámbito de linfocitos TCD4 se encontró entre los 208 y 403 células/ul Estos pacientes presentaron la mayor concentración de IFN- γ (7 26 UI/ml) esto nos sugiere una buena proliferación celular y por lo tanto un valor la producción de IFN- γ adecuada para el ensayo (Cattamanchi et al 2011, Smith et al 2011) No obtuvimos casos indeterminado esto nos sugiere que el valor consultado en la literatura de 200 linfocitos TCD4 como criterio de inclusión en este estudio fue correcto (Latorre et al 2010)

Los casos positivos de IFN- γ muestran concentraciones de linfocitos TCD8 entre 281 y 689 células/ul Estas células están relacionadas a la cantidad de linfocitos TCD4 en la infección tuberculosa Ambos subtipos de linfocitos son responsables de la producción de IFN- γ en los pulmones (Bold and Ernst 2012) Además, los pacientes muestran la típica proporción invertida entre estos subtipos de linfocitos T con un resultado menor de 1 característico de los PVVIH

Un 77% (33/43) de los pacientes se distribuyeron más frecuentemente según su carga viral Log₁₀, entre el log 1 a 2.99. El 14% (6/43) entre log 3 a 4.9 y 9% (4/43) entre log 5 a 6.9. Los pacientes con IFN- γ positivo 14% (6/43) estaban entre los log 1.3 a 4.9 y 86% (37/43) fueron negativos. Comparados con la prueba de PPD el 4.6% (2/43) fueron PPD positivo entre los log 1 a 2.99 y 95% (41/43) fueron negativo. No se encontraron pacientes positivos a PPD entre log 3 a 6.2 y un 100% (10/10) fueron negativos. Es decir que las cargas virales más predominantes entre los pacientes tuvieron un número bajo de virus circulante. Este marcador está relacionado con la fase de la infección por VIH, ya que cantidades altas de carga viral log₁₀ dan pronóstico de desarrollo de tuberculosis activa en los pacientes. Estudios señalan que la media de los participantes fue de <50 copias/ml que es equivalente a un logaritmo de base 10 de 1.7 (Ramos et al 2012).

La especificidad calculada para la prueba de IFN- γ fue de 91% con una sensibilidad de 99% comparada con la prueba de PPD, se considera que a medida que ambos índices se acercan al 100% la prueba es más eficaz, es decir que la prueba de IFN- γ tiene alta sensibilidad y especificidad ya que detecta el 99% de los enfermos y con una alta capacidad de identificar los individuos sanos. Según una revisión sistemática de 38 estudios publicados entre 2004 y 2008, la sensibilidad media de estas pruebas en casos de TB con confirmación bacteriológica fue la siguiente: 0.73-0.82), QFT-GIT 0.70 (0.63-0.78) y QFT-G 0.78 (IC 0.90 (0.86-0.93). La sensibilidad media de PPD fue 0.77 (0.71- 0.82). De acuerdo a este análisis T-SPOT TB fue más sensible que las otras dos que miden IFN- γ y que la PPD (de Kantor and Ritacco 2009).

Hay un ámbito amplio de resultados en cuanto a sensibilidad y especificidad entre ambas pruebas según los estudios. Algunos de ellos muestran la sensibilidad para la prueba de IFN- γ (64%- 91%) comparado con la de PPD (25% - 85%) (Santín, Muñoz, and Rigau 2012, Trajman, Steffen, and Menzies 2013)

Sin embargo existen estudios que sugieren la alta especificidad y sensibilidad de las pruebas de IFN- γ para recomendarlas en los protocolos de determinación de tuberculosis latente en PVVIH (Denkinger, Dheda, and Pai 2011, Zabel 2011)

El valor predictivo positivo fue de 33%, es decir que si la prueba de IFN- γ es positiva, la probabilidad estimada de que un individuo tenga realmente tuberculosis latente es 33%. El valor predictivo negativo fue de 99% es decir que si la prueba tiene un resultado negativo la probabilidad estimada de que no padezca tuberculosis latente es de 99%. Estos valores son de enorme utilidad para tomar decisiones clínicas, aunque dependen de la prevalencia de la enfermedad. Investigaciones han señalado que el valor predictivo de los IGRA en personas infectadas con el VIH muestran que los IGRA tienen escaso valor predictivo positivo, pero un alto valor predictivo negativo para la tuberculosis activa (Cattamanchi et al 2011). Otros estudios proponen el uso de ambas pruebas y así aumentar el valor predictivo, comparado si se utilizan por separado (Kik et al 2010)

La precisión diagnóstica obtenida fue de 91%. Esto significa que del porcentaje de pacientes captados como verdaderos positivos el 91% es preciso en el diagnóstico

El índice kappa obtenido fue de 0,46, se considera buena concordancia según la interpretación de Landis y Koch (Moreno 2013). La concordancia observada entre ambas pruebas de PPD e IFN- γ fue 96% (43/45) es decir 46% mayor que la concordancia esperada por el azar según la prueba kappa. Estudios han encontrado que la concordancia general entre el T-SPOT TB y el QFT-G-IT fue solo 60,8% ($\kappa = 0,17$) en las personas infectadas por el VIH sin tuberculosis activa. Además la concordancia entre T-SPOT TB y TST concordancia fue más baja con el 40,4% ($\kappa = 0,37$), mientras que QFT-G-IT y TST mostraron el mejor resultado de acuerdo con el 66,3% ($\kappa = 0,34$) (Zabel 2011). En contraste otros estudios muestran que hubo una concordancia moderada entre QFT-G y T-SPOT TB, kappa = 0,49 (95% intervalo de IC = 0,21-0,77). Mientras se excluyeron los resultados indeterminados la concordancia se mantuvo moderada, kappa = 0,558 (95% IC = 0,21-0,77). Sin embargo cuando fueron excluidas las personas con tuberculosis preliminar, la concordancia fue menor, kappa = 0,19 (95% IC = 0,18-0,56) (Sultan et al 2013). También se encontró que el acuerdo entre las dos pruebas en LTBI era bajo. QFT-GIT vs T-SPOT (IC del 95% 0,30-0,07-) kappa = 0,18, QFT-GIT vs PPD kappa = 0,29 (IC del 95% 0,16-0,42), PPD vs T-SPOT CI kappa = 0,22 (95% 0,07 a 0,29) (Chkhartishvili et al 2013).

CONCLUSIONES

- 1 En esta investigación se determinó los valores de producción de IFN- γ específicos para *M tuberculosis* en las células mononucleares de una población adulta sana y en pacientes infectados por el VIH, utilizando un inmunoensayo enzimático (Quantiferon-TB Gold)
- 2 Los valores encontrados en la muestra sana están entre 0,16 – 17,76 pg/ml. Los rangos para el género masculino están entre 0,16 – 15,16 pg/ml y para el femenino entre 0,8 – 17,76 pg/ml
- 3 La tuberculosis latente se determinó en el 13% de pacientes infectados por el VIH vacunados con BCG mediante la determinación de IFN- γ específico para *M tuberculosis*
- 4 La prueba de IFN- γ específica para *M tuberculosis* detectó un 66% de tuberculosis latente en pacientes COMBE negativos
- 5 El IFN- γ específico para *M tuberculosis* captó el 9% de las personas infectadas por el VIH que fueron PPD negativo
- 6 Las concentraciones del IFN- γ específico para *M tuberculosis* de 0,8 a 290 pg/ml fueron detectadas en pacientes VIH con un rango de linfocitos T CD3 CD4 de 208 - 403 células/ul
- 7 Los pacientes con carga viral más bajas entre 20 – 9,999 copias/ml presentaron concentraciones más altas de IFN- γ específico para *M tuberculosis* con un rango de 0,8- 290 pg/ml
- 8 La utilidad de la prueba de IFN- γ específico para *M tuberculosis* en pacientes VIH se demuestra, porque presentó una sensibilidad de 99%, especificidad de 91%,

precisión diagnóstica de 91%, valor predictivo negativo del 99% y predictivo positivo del 33% y una prueba Kappa del 0.46

RECOMENDACIONES

- 1 Utilizar la prueba de IFN- γ en la determinación de tuberculosis latente en pacientes inmunodeficientes como PVVH, inmunodeficiencias primarias y secundarias, inmunosuprimidos como pacientes sometidos a quimioterapia, radioterapia, trasplantes, enfermedades autoinmunes, anticitoquinas
- 2 Implementar este ensayo en nuestro sistema de salud como medida preventiva que permita un mejor monitoreo de los posibles casos de tuberculosis latente para evitar la diseminación de esta enfermedad de alta prevalencia como indica la OMS
- 3 Disponer de esta prueba en las unidades ejecutoras de salud para el inicio temprano de tratamiento específico para tuberculosis latente en pacientes por parte del cuerpo médico

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Achkar, Jacqueline M and Elizabeth R Jenny-Avital 2011 “Incipient and Subclinical Tuberculosis Defining Early Disease States in the Context of Host Immune Response ” *The Journal of infectious diseases* 204 Suppl S1179–86 Retrieved August 29, 2013
([http //www pubmedcentral nih gov/articlerender fcgi?artid=3192549&tool=pmcentrez&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3192549&tool=pmcentrez&rendertype=abstract))
- Alvarez, Nadine n d “Mecanismos de Evasion Y Persistencia de Mycobacterium Tuberculosis Durante El Estado de Latencia Y Posibles Estrategias Para El Control de La Infeccion Latente ” Retrieved March 24, 2015 (file:///D:/main carpet/Yoanett (D)/YOANETT_/latencia M tuberculosis/evasion persistencia y latencia de M tuberculosis pdf)
- Anandaiah, Asha et al 2011 “Novel Developments in the Epidemic of Human Immunodeficiency Virus and Tuberculosis Coinfection ” *American journal of respiratory and critical care medicine* 183(8) 987–97 Retrieved August 29, 2013
([http //www pubmedcentral nih gov/articlerender fcgi?artid=3086746&tool=pmcentrez&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3086746&tool=pmcentrez&rendertype=abstract))
- Araujo, Zaida, Mariana Acosta, and Hemir Escobar 2008 “Respuesta Inmunitaria En Tuberculosis Y El Papel de Los Antigenos de Secrecion de Mycobacterium Tuberculosis En La Proteccion , Patologia Y Diagnostico Revision ” *Investigacion Clinica* 49(3) 411–41
- Barnes P, Lackey D, Burman W n d “Tuberculosis in Patients with HIV Infection Infectious Disease Clinics of North America ” *Infectious Disease clinics of North America* 16(1) 107–26
- Barry, Clifton E et al 2009 “The Spectrum of Latent Tuberculosis Rethinking the Biology and Intervention Strategies ” *Nature reviews Microbiology* 7(12) 845–55 Retrieved September 20, 2013 ([http //dx doi org/10 1038/nrmicro2236](http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2236))
- Bold, Tyler D and Joel D Ernst 2012 “CD4+ T Cell-Dependent IFN- γ Production by CD8+ Effector T Cells in Mycobacterium Tuberculosis Infection ” *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 189(5) 2530–36 Retrieved September 12, 2013
([http //www pubmedcentral nih gov/articlerender fcgi?artid=3424308&tool=pmcentrez&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3424308&tool=pmcentrez&rendertype=abstract))
- Van Brummelen, Sigrid E 2010 “Kinetics of a Tuberculosis-Specific Gamma Interferon Release Assay in Military Personnel with a Positive Tuberculin Skin Test ” *Clinical and vaccine immunology CVI* 17(6) 937–43 Retrieved October 07, 2014

(<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2884429&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>)

Cascante, J A , I Pascal, V M Eguia, and J Hueto 2007 “Diagnostico de La Infeccion Tuberculosa Diagnosis of Tuberculosis Infection ” *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 30(2) 49–66

Cattamanchi, Adithya et al 2011 “Interferon-Gamma Release Assays for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection in HIV-Infected Individuals A Systematic Review and Meta-Analysis ” *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 56(3) 230–38 Retrieved
(<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3383328&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>)

Chkhartishvili, Nikoloz et al 2013 “Poor Agreement between Interferon-Gamma Release Assays and the Tuberculin Skin Test among HIV-Infected Individuals in the Country of Georgia ” *BMC Infectious Diseases* 1-7(13) 513 Retrieved
(<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/13/513>)

Denkinger, C M , K Dheda, and M Pai 2011 “Guidelines on Interferon- γ Release Assays for Tuberculosis Infection Concordance, Discordance or Confusion?” *Clinical microbiology and infection the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 17(6) 806–14 Retrieved August 10, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21682801>)

Desem N, Jones SL (1998) 1998 “Development of a Human Gamma Interferon Enzyme Immunoassay and Comparison with Tuberculin Skin Testing for Detection of Mycobacterium Tuberculosis Infection ” *Clin Diagn Lab Immunol* 5(4) 531–36 Retrieved (<http://cvi.asm.org/content/5/4/531.full.pdf+html>)

Diel, Roland, Robert Loddenkemper, and Albert Nienhaus 2010 “Evidence-Based Comparison of Commercial Interferon-Gamma Release Assays for Detecting Active TB A Metaanalysis ” *Chest* 137(4) 952–68 Retrieved May 24, 2013
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20022968>)

Esmail, Hanif, Clifton E Barry, and Robert J Wilkinson 2012 “Understanding Latent Tuberculosis The Key to Improved Diagnostic and Novel Treatment Strategies ” *Drug discovery today* 17(9-10) 514–21 Retrieved August 29, 2013
(<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3443737&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>)

Farhat, M , C Greenaway, M Pai, and D Menzies 2006 “False-Positive Tuberculin Skin Tests What Is the Absolute Effect of BCG and Non-Tuberculous Mycobacteria?” *The international journal of tuberculosis and lung disease the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*

10(11) 1192–1204 Retrieved September 20, 2013
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17131776>)

- Harada, Nobuyuki, Kazue Higuchi, Takashi Yoshiyama, Yoshiko Kawabe, and Akira Fujita 2009 “Comparison of the Sensitivity and Specificity of Two Whole Blood Interferon- Gamma Assays for M Tuberculosis Infection ” *Med Microb and Immunol* 198(1) 33–37
- Jiang, Weimin et al 2009 “High-Sensitive and Rapid Detection of Mycobacterium Tuberculosis Infection by IFN-Gamma Release Assay among HIV-Infected Individuals in BCG-Vaccinated Area ” *BMC immunology* 10 31 Retrieved June 19, 2013
(<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2700818&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>)
- Jones, S et al 2007 “Utility of QuantiFERON-TB Gold in-Tube Testing for Latent TB Infection in HIV-Infected Individuals ” *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 11(February) 1190–95
- De Kantor, Isabel N and Viviana Ritacco 2009 “¿Es Suficiente La Prueba Tuberculínica Para El Diagnostico de La Infección Tuberculosa?” *Medicina (Buenos Aires)* 69(3) 359–69 Retrieved September 23, 2013
(http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802009000400014&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Kathryn L Kellar et al 2011 “Multiple Cytokines Are Released When Blood from Patients with Tuberculosis Is Stimulated with Mycobacterium Tuberculosis Antigens ” *Plos One* 6(11) 1–17 Retrieved
(<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0026545&representation=PDF>)
- Kik, S V et al 2010 “Predictive Value for Progression to Tuberculosis by IGRA and TST in Immigrant Contacts ” *The European respiratory journal* 35(6) 1346–53 Retrieved October 09, 2014 (<http://erj.ersjournals.com/content/35/6/1346/full>)
- Kunnath-Velayudhan, Shajo and Maria Laura Gennaro 2011 “Immunodiagnosis of Tuberculosis A Dynamic View of Biomarker Discovery ” *Clinical microbiology reviews* 24(4) 792–805 Retrieved August 26, 2013
(<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3194832&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>)
- Latorre, Irene et al 2010 “IFN- γ Response on T-Cell Based Assays in HIV-Infected Patients for Detection of Tuberculosis Infection ” *BMC infectious diseases* 10(1) 348 Retrieved July 19, 2013

(<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3016378&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>)

- Mandelbaum-Schmid, Judith 2010 *About the Stop TB Partnership PART I IMPLEMENTATION* Retrieved
(http://www.stoptb.org/assets/documents/global/plan/TB_GlobalPlanToStopTB2011-2015.pdf)
- Mendoza, Alberto and David Iglesias 2008 “Articulo de Revision” *Acta Med. Per* 25(4) 247–54
- Metcalf, John Z et al 2013 “Test Variability of the QuantiFERON-TB Gold in-Tube Assay in Clinical Practice” *American journal of respiratory and critical care medicine* 187(2) 206–11 Retrieved October 07, 2014
(<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3570654&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>)
- Moreno, Laura 2013 *Epidemiologia Clinica* Tercera Ed edited by McGra-Hill Interamericana Editores Mexico, D F
- OMS 2014 “OMS | HABLEMOS DE TUBERCULOSIS Y VIH” Retrieved October 14, 2014 (http://www.who.int/tb/challenges/hiv/talking_points/es/)
- Platanias, Leonidas C 2005 “Mechanisms of Type-I- and Type-II-Interferon-Mediated Signalling” *Nature reviews Immunology* 5(5) 375–86 Retrieved September 19, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15864272>)
- Ramos, Jose M et al 2012 “Contribution of Interferon Gamma Release Assays Testing to the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection in HIV-Infected Patients A Comparison of QuantiFERON-TB Gold In Tube, T-SPOT TB and Tuberculin Skin Test” *BMC infectious diseases* 12 169 Retrieved August 29, 2013
(<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3482589&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>)
- Ringshausen, Felix C et al 2011 “Within-Subject Variability of Mycobacterium Tuberculosis-Specific Gamma Interferon Responses in German Health Care Workers” *Clinical and vaccine immunology* CVI 18(7) 1176–82 Retrieved October 07, 2014
(<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3147310&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>)
- Salas-Rangel, Patricia, Arturo Gonzalez-Mejia, Rivera-Gutierrez Sandra, Rogelio Hernandez-Pando, and y Merchand Jorge Gonzalez, Alberto 2009 “El Estado de Latencia de Mycobacterium Tuberculosis Su Expresion Genetica in Vitro E in Vivo” *VacciMonitor* 2009, Vol 18 No 3 18(3) 19–25 Retrieved March 24, 2015

(file:///D:/main carpet/Yoanett (D)/YOANETT_/latencia M tuberculosis/expresion genetica latencia M tuberculosis pdf)

Salud, Ministerio de, Departamento de Epidemiologia 2013 *Informe Acumulativo de La Situacion de SIDA* Retrieved August 06, 2014

(file:///C:/Users/Yoana/Downloads/NUEVO Trimestral SIDA septiembre 2013 (5) (1) pdf)

Santin, Miguel, Laura Muñoz, and David Rigau 2012 “Interferon- γ Release Assays for the Diagnosis of Tuberculosis and Tuberculosis Infection in HIV-Infected Adults A Systematic Review and Meta-Analysis ” *PloS one* 7(3) e32482 Retrieved July 19, 2013

([http //www pubmedcentral nih gov/articlerender fcgi?artid=3293815&tool=pmcentrez&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3293815&tool=pmcentrez&rendertype=abstract))

Smith, Rachel et al 2011 “Interferon- γ Release Assays for Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection Evidence in Immune-Mediated Inflammatory Disorders ” *Current opinion in rheumatology* 23(4) 377–84 Retrieved July 19, 2013

([http //www ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21519268](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21519268))

Song, M M and K Shuai 1998 “The Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but Not SOCS2 Proteins Inhibit Interferon-Mediated Antiviral and Antiproliferative Activities ” *The Journal of biological chemistry* 273(52) 35056–62 Retrieved September 24, 2013 ([http //www ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9857039](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9857039))

Sultan, B et al 2013 “Comparison of Two Interferon-Gamma Release Assays (QuantIFERON-TB Gold In-Tube and T-SPOT TB) in Testing for Latent Tuberculosis Infection among HIV-Infected Adults ” *International journal of STD & AIDS* 24(10) 775–79 Retrieved October 02, 2014

([http //www pubmedcentral nih gov/articlerender fcgi?artid=4107858&tool=pmcentrez&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4107858&tool=pmcentrez&rendertype=abstract))

Takenami, Iukary et al 2012 “Levels of Interferon-Gamma Increase after Treatment for Latent Tuberculosis Infection in a High-Transmission Setting ” *Pulmonary medicine* 2012 757152 Retrieved August 29, 2013

([http //www pubmedcentral nih gov/articlerender fcgi?artid=3539439&tool=pmcentrez&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3539439&tool=pmcentrez&rendertype=abstract))

Trajman, A , R E Steffen, and D Menzies 2013 “Interferon-Gamma Release Assays versus Tuberculin Skin Testing for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection An Overview of the Evidence ” *Pulmonary medicine* 2013 601737 Retrieved August 29, 2013

([http //www pubmedcentral nih gov/articlerender fcgi?artid=3582085&tool=pmcentrez&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3582085&tool=pmcentrez&rendertype=abstract))

- VinayKumar, Abul K Abbas, Nelson Fausto 2005 *Robbins&Cotran Patologia Humana* edited by Elsevier España Acceso a Student Consult el 8 marzo 2014
- World Health Organization 2012a *Estadísticas Sanitarias Mundiales*
- World Health Organization 2012b *Global Tuberculosis Report 2012* Retrieved September 10, 2013
([http //www who int/tb/publications/global _report/gtbr12 _main pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr12_main.pdf))
- World Health Organization 2013 *Global Tuberculosis Report 2013* Retrieved August 06, 2014
([http //apps who int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656 _eng pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf?ua=1))
- Zabel, Peter 2011 “Relationship of Immunodiagnostic Assays for Tuberculosis and Numbers of Circulating CD4+ T-Cells in HIV Infection ” *Eur Respir J* 619–626 Retrieved August 13, 2014 ([http //www students informatik uni-luebeck de/zhb/ediss981 pdf](http://www.students.informatik.uni-luebeck.de/zhb/ediss981.pdf))
- Zhang, M et al 2010 “Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection in Bacille Calmette-Guerrin Vaccinated Subjects in China by Interferon-Gamma ELISpot Assay ” *The international journal of tuberculosis and lung disease the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 14(12) 1556–63 Retrieved ([http //www ncbi.nlm.nih gov/pubmed/21144240](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21144240))

ANEXOS

Anexo N° 1. Cuadro de preparación de conjugado de acuerdo al numero de pruebas a utilizar para el análisis de IFN- γ

NÚMERO DE TIRAS	VOLUMEN DE CONCENTRADO 100X DE CONJUGADO	VOLUMEN DE DILUYENTE VERDE
2	10 μ l	1,0 ml
3	15 μ l	1,5 ml
4	20 μ l	2,0 ml
5	25 μ l	2,5 ml
6	30 μ l	3,0 ml
7	35 μ l	3,5 ml
8	40 μ l	4,0 ml
9	45 μ l	4,5 ml
10	50 μ l	5,0 ml
11	55 μ l	5,5 ml
12	60 μ l	6,0 ml

Fuente Instructivo utilizado en el procedimiento de análisis de muestras

Anexo N° 2 Cuadro de interpretación de resultados de análisis de IFN- γ

Blanco [UI/ml]	Antígenos TB menos blanco [UI/ml]	Resultado del QuantiFERON® - TB Gold IT	Informe/Interpretación
	< 0,35	Negativo	Infeccion por <i>M tuberculosis</i> improbable
	$\geq 0,35$ y < 25% del valor nulo		
	$\geq 0,35$ y $\geq 25\%$ del valor nulo		
> 8,02	Cualquiera	Indeterminado	Resultados inutilizables para determinacion de antígeno TB

Fuente Instructivo utilizado en el procedimiento de análisis de muestras

Anexo N° 3: Consentimiento informado

Consentimiento informado

Este se entrego de forma escrita a los pacientes HIV-1 en el Laboratorio de Inmunologia de Universidad de Panama antes de tomar la muestra, se les explicara que consiste en extraer muestra de sangre

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO Y FIRMA

Le extendemos una invitacion a participar voluntariamente en el Proyecto

Aplicabilidad análisis de cuantificación de interferón gamma in vitro en respuesta a antígenos específicos para *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes portadores de VIH en Panamá durante marzo y abril de 2012”

Autora Yoana Pimentel Universidad de Panama Facultad de Medicina

Riesgos y beneficios

Si usted decide participar en este estudio solo tiene que permitir la extraccion de muestras de sangre Los beneficios esperados de esta investigacion son obtener informacion de portadores latentes de tuberculosis y es necesario el tratamiento y seguimiento medico de los pacientes con algun compromiso inmunologico que puedan desarrollar tuberculosis activa en nuestro pais

Confidencialidad

Toda informacion o datos que pueda identificar al participante seran manejados confidencialmente Para esto como medida de seguridad su identidad como participante sera protegida mediante un numero de identificacion

A estos datos pueden tener acceso el director del proyecto y el asesor de la investigacion

Dr Manuel Adames y Lic Jose Moreno

Estos datos seran almacenados en archivos de computadora protegidos por contraseñas por un periodo de 5 años una vez concluya este estudio

Las autoridades de la Universidad de Panamá y mi persona son responsables de velar por la integridad en la investigacion podrian requerirle a la investigadora los datos obtenidos en este estudio, incluyendo este documento

Derechos

Si ha leído este documento y ha decidido participar, por favor entienda que su participación es completamente voluntaria y que usted tiene derecho a abstenerse de participar o retirarse del estudio en cualquier momento, sin ninguna consecuencia. También tiene derecho a no contestar alguna pregunta en particular. Además, tiene derecho a recibir una copia de este documento.

Si tiene alguna pregunta o desea más información sobre esta investigación, por favor comuníquese con Lic Yoana Pimentel al (66756943 o 5036214)

Yo, _____ (nombre del paciente)

He leído la información que se me ha entregado

He podido hacer preguntas sobre el proyecto

He recibido suficiente información sobre el mismo

He hablado de ello con _____

Comprendo que mi participación es voluntaria

Comprendo que puedo retirar mi consentimiento

1° Cuando quiera

2° Sin tener que dar explicaciones

3° Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto

FIRMA DEL PACIENTE

Nombre _____ Fecha _____

Yo he explicado por completo los detalles relevantes de este proyecto al paciente y/o la persona autorizada a dar el consentimiento en su nombre

FIRMA _____ Nombre _____

Fecha _____

Se entrega copia de este documento al paciente

Hoja de recolección de datos

Sera elaborada en programa EPINFO para permitir un adecuado archivo de los datos obtenidos y su posterior analisis estadistico

Paciente

Edad _____

Sexo _____

Prueba de tuberculina

positiva

negativa

Ultimo conteo de linfocitos CD4

Ultimo valor de Carga Viral

Vacuna BCG

hace cuanto tiempo

Ha padecido de tuberculosis si no

Ha estado en contacto con alguna persona que padece o ha padecido tuberculosis

Figura N° 3 TUBOS PARA EL ANALISIS DE IFN- γ



TUBOS DE COLECCIÓN DE SANGRE PARA IFN- γ MITOGENO (MORADO), NULO (GRIS), ANTIGENO (ROJO)

Figura N° 4: TUBOS CON ANTIGENO Y MUESTRAS



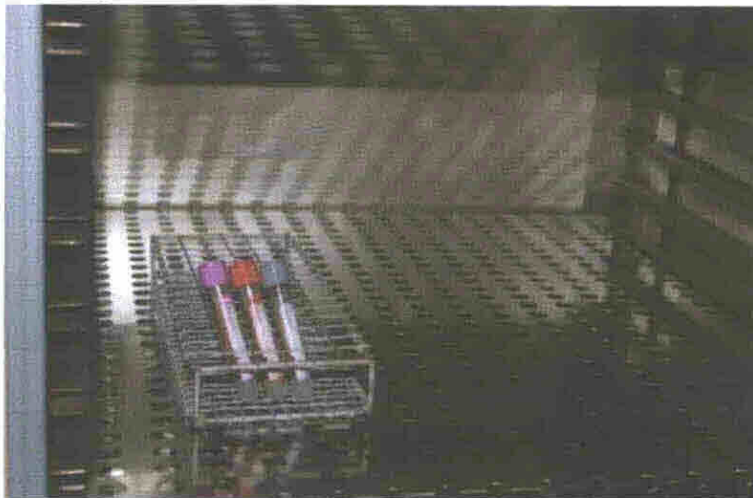
LAS MUESTRAS FUERON ROTULADAS CON EL CODIGO ASIGNADO A CADA PACIENTE

Figura N° 5: INCUBADORA



INCUBADORA DONDE SE MANTUVIERON A 37°C LAS MUESTRAS DE SANGRE COLECTADAS.

Figura N° 6: INCUBACIÓN DE MUESTRAS



LAS MUESTRAS SE MANTUVIERON A 37°C DURANTE 24 HORAS

Figura N° 7: COMPONENTES DEL KIT DE ANALISIS PARA IFN- γ



PAQUETES QUE CONTIENEN LOS MICROPLATOS CON LASTIRAS DE ELISA, LOS FRASCOS CON SOLUCION DE LAVADO, LOS CALIBRADORES Y CONJUGADO LIOFILIZADOS, LA SOLUCIÓN VERDE Y EL SUSTRATO

Figura N° 8: MICROPLATOS SELLADOS CON LOS POCILLOS PARA ELISA



BOLSA SELLADA CON MICROPLATOS PARA EL ANALISIS DE IFN- γ

Figura N° 9: SOLUCIONES COMPONENTES DEL KIT DE ANALISIS PARA IFN- γ



FRASCOS CON SOLUCION DE LAVADO, LOS CALIBRADORES Y CONJUGADO LIOFILIZADOS, LA SOLUCIÓN VERDE, EL SUSTRATO Y LA SOLUCIÓN QUE DETIENE LA REACCIÓN

Figura N° 10: COMPONENTES DEL KIT DE ANALISIS PARA IFN- γ



PAQUETES CON MICROPLATOS CON LASTIRAS DE ELISA, LOS FRASCOS CON SOLUCION DE LAVADO, LOS CALIBRADORES Y CONJUGADO LIOFILIZADOS, LA SOLUCIÓN VERDE Y EL SUSTRATO. ADEMÁS PIPETAS USADAS PARA PREPARACION DE LOS LIOFILIZADOS

Figura N° 11: COMPONENTES LIOFILIZADOS DEL KIT DE ANALISIS PARA IFN- γ



LOS CALIBRADORES Y CONJUGADO QUE ESTAN LIOFILIZADOS SE RECONSTITUYERON CON 1 ml DE AGUA DESTILADA

Figura N° 12: MUESTRAS CODIFICADAS DE LOS PARTICIPANTES SALUDABLES Y PACIENTES VIH



CADA PARTICIPANTE TENIA 3 MUESTRAS CORRESPONDIENTES AL TUBO MITOGENO, AL TUBO CON LOS ANTIGENOS ESPECIFICOS DE *M. tuberculosis*, Y OTRO AL TUBO NULO. EN ESTA GRADILLA HAY 24 PARTICIPANTES PARA UN TOTAL DE 72 TUBOS DE MUESTRA.

Figura N° 13: PATRONES DE CALIBRACION Y CONJUGADO PREPARADOS



PATRONES DE CALIBRACIÓN PREPARADOS A PARTIR DEL LIOFILIZADORECOSNTITUIDO CON AGUA DESTILADA Y DILUIDOS PARA GENERAR DIFERENTES CONCENTRACIONES. EL CONJUGADO ESTA PREPARADO A PARTIR DE LAS INSTRUCCIONES DEL ANEXO N°1

Figura N° 14: : MICROPOCILLOS PARA EL ANALISIS DE IFN- γ



MICROPOCILLOS RECUBIERTOS CON ANTIGENO CONTRA IFN- γ

Figura N° 15: ADICION CONJUGADO A LOS MICROPOCILLOS



MEDIANTE UNA PIPETA MULTICANAL SE LE AÑADIO 50 μ l CONJUGADO A LOS MICROPOCILLOS DE ELISA

Figura N° 16: MICROPLATO CON MICROPOCILLOS



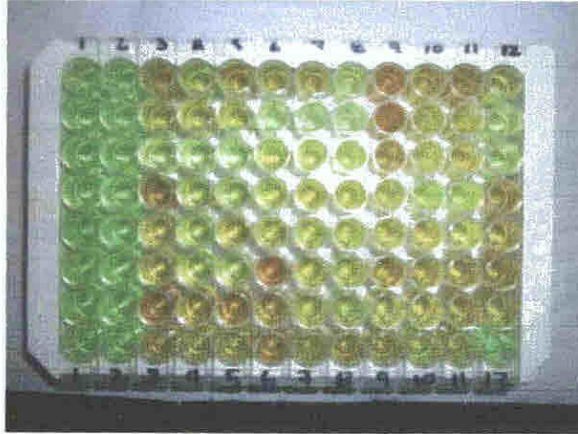
MICROPOCILLOS LLENADOS CON CONJUGADO PREPARADO

Figura N° 17: ADICION DE MUESTRAS



MEDIANTE UNA PIPETA SE LE AÑADIO 50 μ l MUESTRA A LOS MICROPOCILLOS DE ELISA

Figura N° 18: DETALLE DE LA INCUBACION DE MUESTRAS Y CALIBRADORES



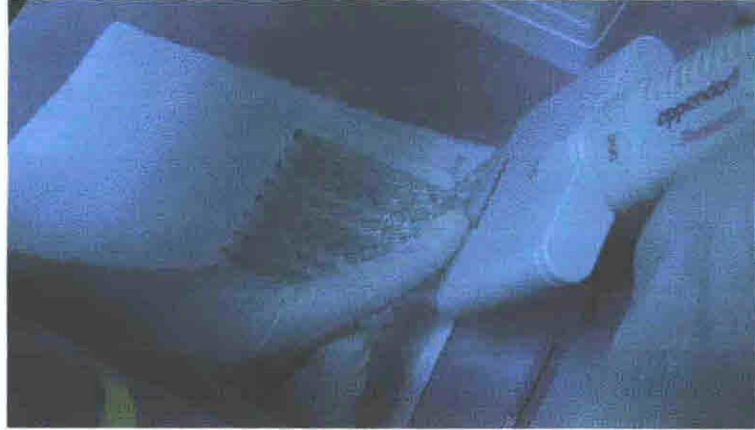
SE OBSERVA LA COLOCACION DE CALIBRADORES FILAS 1 Y 2 Y LAS MUESTRAS POR TRIPLICADO (TUBO NULO, TUBO ANTIGENO, TUBO MITOGENO)

Figura N° 19: LAVADOR AUTOMATICO DE MICROPOCILLOS



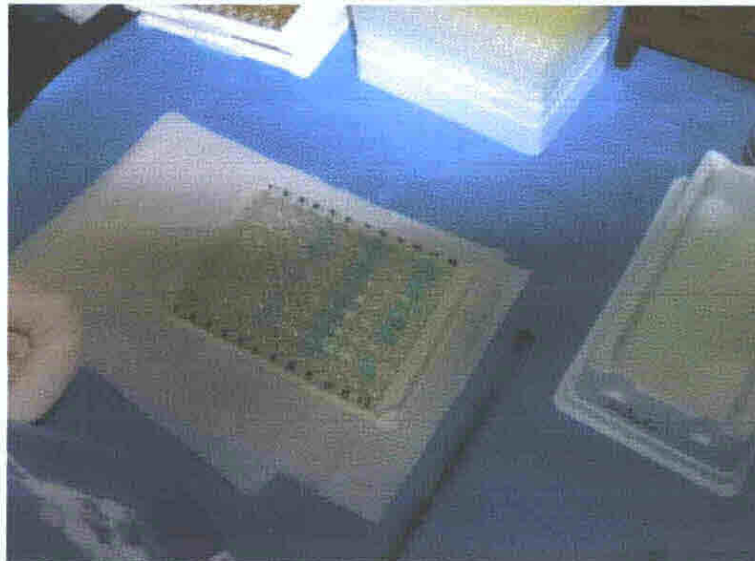
DESPUES DE 2 HORAS DE INCUBACION SE PROCEDE A LAVAR LOS POCILLOS CON LA SOLUCIÓN DE LAVADO DILUIDA EN 6 CICLOS

Figura N° 20: ADICION DEL SUSTRATO E INCUBACION



DESPUES DE LOS LAVADOS SE AÑADIO EL SUSTRATO Y SE PROCEDIO A INCUBARLO A TEMPERATURA AMBIENTE Y EN OSCURIDAD POR 30 MINUTOS

Figura N° 21: REACCION DEL SUSTRATO



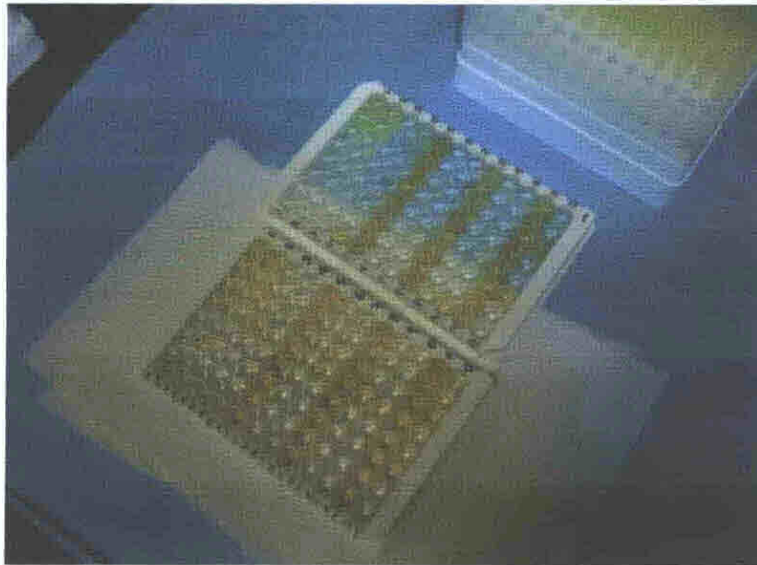
LUEGO DE LA INCUBACIÓN SE GENERO COLOR AZULADO EN LOS POCILLOS QUE PRESENTARON REACCIÓN ENZIMATICA

Figura N° 22: ADICION DE LA SOLUCION ACIDA PARA DETENER LA REACCION



SE ADICIONARON 50 μ l DE SOLUCION ACIDA A CADA POCILLO PARA DETENER LA REACCION ENZIMATICA LO QUE OCASIONA UN CAMBIO DE COLOR DE AZUL A AMARILLO

Figura N° 23: PLATOS LUEGO ADICION DE LA SOLUCION ACIDA



LOS POCILLOS COLOR AMARILLO CORRESPONDEN A LOS POCILLOS DEL MITOGENO Y LOS POCILLOS POSITIVOS

Figura N° 24: DETALLE MICROPOCILLOS LISTOS PARA LA LECTURA



SE OBSERVA UN FUERTE EL DEGRADADO DEL COLOR EN LOS CLIBRADORES Y UN FUERTE COLOR AMARILLO EN LAS LINEAS QUE CORRESPONDEN A LOS MITOGENOS, SE PUEDE OBSERVAR ALGUNOS PACIENTES POSITIVOS

Figura N° 25: LECTURA DE DENSIDADES OPTICAS (LONGITUDES DE ONDA)



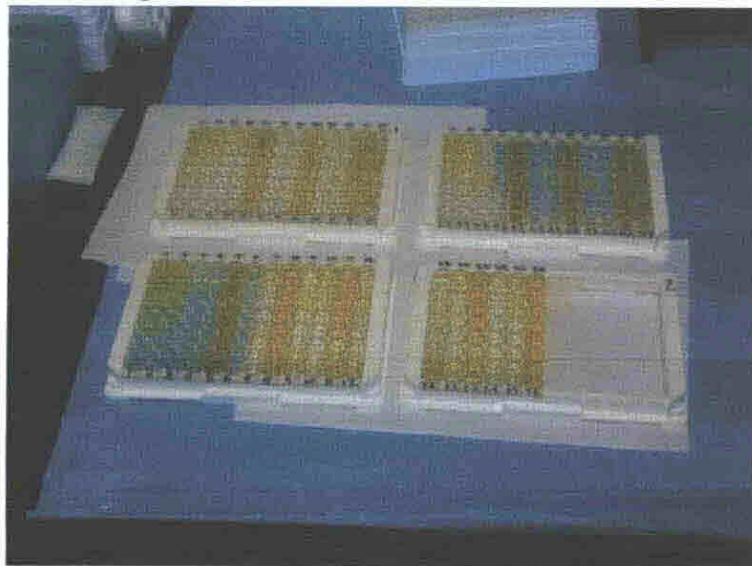
PROGRAMACION DE LA LONGITUD DE ONDA EN EL LECTOR DE PLATOS

Figura N° 26: LECTOR DE MICROPOCILLOS



LA LECTURA DE LOS MICROPOCILLOS SE REALIZO EN UN LECTOR DE ELISA AJUSTADO A 450 nm Y CON FILTRO DE REFERENCIA DE 650 nm

Figura N° 27: PLATOS FINALIZADOS



MICROPLATOS UTILIZADOS PARA EL ANALISIS DE LOS 45 PACIENTES

Figura N° 28: IMPRESORA



LAS ABSORVANCIAS REGISTRADAS POR EL LECTOR FUERON IMPRESAS PARA EL POSTERIOR CALCULO DE LAS CONCENTRACIONES DE IFN- γ UI/ml y pg/ml