

NIVELES DE INTERFERÓN GAMMA, FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA  
E IL-6 EN EL LAVADO BRONCOALVEOLAR DE PACIENTES ADULTOS CON  
SOSPECHA DE TUBERCULOSIS PULMONAR ACTIVA CON BK NEGATIVO Y  
SU UTILIDAD DIAGNÓSTICA

CAROL PAOLA SALCEDO CERQUERA  
MARCELA CASTRO AMAYA

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
FACULTAD DE SALUD  
ESPECIALIZACION EN MEDICINA INTERNA  
NEIVA - HUILA  
2014

NIVELES DE INTERFERÓN GAMMA, FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA  
E IL-6 EN EL LAVADO BRONCOALVEOLAR DE PACIENTES ADULTOS CON  
SOSPECHA DE TUBERCULOSIS PULMONAR ACTIVA Y SU UTILIDAD  
DIAGNÓSTICA

CAROL PAOLA SALCEDO CERQUERA  
MARCELA CASTRO AMAYA

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Médico  
Especialista en Medicina Interna

Asesores:  
CARLOS FERNANDO NARVAEZ  
Inmunología  
Grupo de Parasitología y Medicina Tropical.

GIOVANI LASTRA  
Neumología  
Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
FACULTAD DE SALUD  
ESPECIALIZACION EN MEDICINA INTERNA  
NEIVA - HUILA  
2014

**Nota de aceptación:**

-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----

-----  
Firma del presidente del jurado

-----  
Firma del jurado

-----  
Firma del jurado

Neiva, Diciembre del 2014.

## DEDICATORIA

*Este trabajo se lo dedico a mis hijos Jerónimo y Carlitos por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme brindado el apoyo incondicional desde el principio hasta ahora, gracias a ellos.*

Marcela

*Quiero dedicarle este trabajo a Dios que me ha dado la vida y fortaleza para terminar este proyecto de investigación, a mis Padres por estar ahí cuando más los necesité; en especial a mi madre por su ayuda y constante cooperación y a mi esposo Christian por apoyarme y ayudarme en los momentos más difíciles*

Carol Paola

## **AGRADECIMIENTOS**

Las autoras expresan sus agradecimientos a:

A los Doctores Giovanni Lastra, Neumólogo y Carlos Fernando Narváez, Inmunólogo, quienes fueron nuestros asesores en esta investigación. Gracias, sin sus sabios consejos no hubiera sido posible este logro, nuestra admiración y respeto.

A todos mis profesores de postgrado Dr. Giovanni Caviedes, Dr. Abner Lozano, Dr. Christian Melgar, Dr. Alejandro Pinzón, Dra Johanna Osorio, Dr. Efraín Amaya, Dra. Adriana Zamora, Dr. Hubert Bahamon, Dr. Carlos Alarcón, Dr. Gustavo Portela, Dr. Felipe Cárdenas, Dr. Cesar Pérez, Dr. Marlio Charry, Luis Fernando Duran, Dra. Raquel Abdala, Dr. Jairo Rodríguez, Dr. Ernesto Benavides, por su paciencia, dedicación y compartir su conocimiento.

A la Universidad Surcolombiana y al Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo, por su constante apoyo en la formación de especialistas de alta calidad.

Al grupo de Parasitología y Medicina Tropical, su apoyo fue fundamental para la realización de esta investigación.

Al Doctor Federico Perdomo (Medico Interno de la Universidad Surcolombiana) por su colaboración en el trabajo.

A COLCIENCIAS, por la financiación de esta idea, a través del proyecto 112451929049.

A todos los participantes mil gracias!

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	14
1. ANTECEDENTES	16
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
3. OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GENERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4. JUSTIFICACIÓN	22
5. MARCO TEÓRICO	25
5.1 DEFINICIÓN	25
5.2 ETIOLOGÍA	25
5.3 EPIDEMIOLOGÍA	27
5.4 PATOGÉNIAS	29
5.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS	34
5.6 DIAGNOSTICO	37
5.7 CRITERIOS DIAGNOSTICOS	42
5.8 TRATAMIENTO	43
5.9 PRONÓSTICO	51
5.10 PREVENCIÓN	52
6. METODOLOGIA	54
6.1 DISEÑO DE ESTUDIO	54
6.2 POBLACIÓN	54
6.3 SUJETOS Y MUESTRA	54
6.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN EN PACIENTES DE GRUPO SOSPECHA DE TBC	55

	Pág.	
6.5	CRITERIOS DE INCLUSIÓN EN PACIENTES DE GRUPO NO TUBERCULOSIS	56
6.6	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DE GRUPO SOSPECHA TBC	56
6.7	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DE GRUPO NO TUBERCULOSIS	57
6.8	PROCESO DE RECOLECCIÓN DE DATOS	57
6.9	VARIABLES	58
6.10	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	59
6.11	CONSIDERACIONES ÉTICAS	59
6.12	ENTIDADES PARTICIPANTES	60
6.13	RECURSOS	60
6.13.1	Recursos humanos	60
6.13.2	Recursos financieros	61
7.	RESULTADOS	62
7.1	OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE DETECCIÓN DE CITOCINAS EN LBA	62
7.2	CARACTERÍSTICAS SOCIO EPIDEMIOLÓGICAS DE LOS PACIENTES	63
7.2.1	Detección de IL-6, TNF- e IFN- en líquidos de LBA	67
7.2.2	Eficiencia de los niveles de IL-6, TNF- e IFN- para el diagnóstico de TBC pulmonar activa	69
8.	DISCUSIÓN	71
9.	CONCLUSIONES	73
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
	ANEXOS	79

## LISTA DE FIGURAS

		Pág.
<b>Figura 1</b>	Frotis de esputo que muestra bacilos ácido-alcohol resistentes (Coloración de Ziehl-Neelsen). (Aumento original x 960)	26
<b>Figura 2</b>	Estructura y composición química de la pared celular de <i>MTB</i>	27

## LISTA DE TABLAS

		Pág.
<b>Tabla 1</b>	Hallazgos clínicos en las formas agudas de la TBC miliar	35
<b>Tabla 2</b>	Régimen recomendado para pacientes con TBC pulmonar	45
<b>Tabla 3</b>	Esquema de tratamiento para TBC pulmonar en pacientes con insuficiencia renal	46
<b>Tabla 4</b>	Esquema de tratamiento para pacientes con TBC y diabetes Mellitus	46
<b>Tabla 5</b>	Esquema de tratamiento anti-TBC en paciente con coinfección VIH	47
<b>Tabla 6</b>	Régimen alternativo para tratamiento anti- TBC en paciente con VIH	48
<b>Tabla 7</b>	Características clínicas de los pacientes	65
<b>Tabla 8</b>	Diagnostico microbiológico de pacientes con sospecha de TBC	67

## LISTA DE GRAFICAS

		Pág.
<b>Grafica 1</b>	Diseño del estudio	55
<b>Grafica 2</b>	Optimización de los ensayos para la detección de las citoquinas en LBA	63
<b>Grafica 3</b>	Distribución de pacientes	64
<b>Grafica 4</b>	Detección de los niveles de IL-6, TNF-x e IFN-y en la LBA de pacientes sin TBS con sospecha de TBC y TBC confirmada determinados por ELISA (IL-6 y TNF-x) y CBA (IFN -y).	68
<b>Grafica 5</b>	Curvas ROC comparando casos sospechosos vs TBC confirmada Curvas ROC y valores cutoff de TNF- (A), IL-6 (B) e IFN-y (C) para discriminar entre pacientes con sospecha y confirmación de TBC pulmonar	69

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
<b>Anexo A</b> Instrumento de recolección de datos del estudio	80
<b>Anexo B</b> Consentimiento informado	83
<b>Anexo C</b> Niveles de TNF- (A), IL-6 (B) e TNF- e IFN- (C) en LBA de pacientes con TBC pulmonar confirmada, sospecha de TBC pulmonar y controles	86
<b>Anexo D</b> Curvas ROC comparando casos sospechosos con dx de NAC vs TBC confirmada	87

## RESUMEN

La Tuberculosis (TBC) es una enfermedad infecciosa transmisible causada por el *Mycobacterium tuberculosis*. El diagnóstico de la TBC activa en aquellos pacientes en los que las bacilos copias (BK) en esputo son negativas, es difícil y requiere mucho tiempo en espera del cultivo, por lo que en la actualidad hay cada vez más esfuerzos para buscar nuevas herramientas diagnósticas tempranas

**OBJETIVOS:** Determinar si hay diferencias en los niveles TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 en LBA entre pacientes con TBC pulmonar BK negativo y controles no TBC y evaluar su valor diagnóstico.

**MÉTODOS:** En este estudio se incluyeron los pacientes adultos en quienes se sospechó TBC pulmonar con BK seriada negativa, que llegaron al servicio de neumología del hospital con orden de fibrobroncoscopia (FBC) solicitada por su médico tratante. Como controles se incluyeron 17 pacientes con indicación de FBC por enfermedad pulmonar diferente a TBC (neoplasias, neumonías, enfermedad pulmonar obstructiva crónica).

**RESULTADOS:** De 32 pacientes con sospecha de TBC pulmonar, 7 pacientes fueron confirmados de TBC y se denominaron TBC confirmados y 25 pacientes no confirmados TBC. De la IL-6, TNF- $\alpha$  analizados (ELISA), se encontraron niveles detectables de en los tres grupos de pacientes, con una tendencia a encontrarse más elevados en los pacientes con TBC confirmada. Aunque no hubo diferencias significativas entre los grupos analizados, los pacientes con los niveles más altos de IFN- $\gamma$  estuvieron en el grupo TBC confirmada.

**CONCLUSIÓN:** En nuestro estudio existe una tendencia y una probabilidad alta de que el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  este significativamente elevados en TBC pulmonar.

**Palabras Claves.** Tuberculosis, diagnóstico, interferón gamma, interleucina 6, factor de necrosis tumoral alfa.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a transmissible infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. The diagnosis of active TB in those patients whose sputum smears (BK) in sputum is negative, it is difficult and time consuming waiting crop, so there are now increased efforts to find new early diagnostic tools.

**OBJECTIVE:** To determine whether there are differences in TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-6 levels in BAL from patients with pulmonary tuberculosis BK negative and controls no TBC and evaluate their diagnostic value.

**METHODS:** In this study, adult patients in whom pulmonary TB was suspected serial BK negative, pulmonology department arrived at the hospital by fiberoptic bronchoscopy (FBC) requested by your treating physician were included. As controls, 17 patients with indication of FBC were included by different TBC (neoplasms, pneumonia, chronic obstructive pulmonary disease) lung disease.

**RESULTS:** Of 32 patients with suspected active pulmonary TB, 7 patients were confirmed TB and TB were referred 25 patients confirmed and unconfirmed TBC. IL-6, TNF- $\alpha$  analyzed (ELISA), detectable levels were found in the three groups of patients, with a tendency to be higher in patients with confirmed TB. Although there were no significant differences between the groups analyzed, patients with higher levels of IFN- $\gamma$  in the TB group were confirmed.

**CONCLUSION:** there is a tendency in our study and a high probability that the IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  levels this elevated significantly in active pulmonary tuberculosis.

**Key words.** Tuberculosis, diagnosis, gamma interferon, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha.

## INTRODUCCIÓN

La Tuberculosis (TBC) es una enfermedad infecciosa transmisible causada por el *Mycobacterium tuberculosis*, de evolución crónica y con localización preferente en el pulmón, aunque puede afectar cualquier órgano <sup>(1)</sup>. Esta patología es una de las principales causas de muerte en muchos países y un importante problema de salud pública a nivel mundial. En la actualidad representa un reto diagnóstico dado que en muchos casos no se logra documentar la presencia del bacilo a pesar de la sospecha clínica, así que un importante porcentaje de los casos quedan sin diagnóstico etiológico.

En el año 2012, 8.8 millones de personas en el mundo desarrollaron TBC y 1.3 murieron a causa de la misma. El año anterior se reportaron en Colombia 12,076 casos nuevos de TBC pulmonar (30% de los casos no hubo confirmación por laboratorio), 381 de ellos en el Departamento del Huila <sup>(2)</sup>.

Antes de 2001, la prueba de la tuberculina (PPD, del inglés Purified Protein Derivative) era la única prueba inmunológica práctica y comercialmente disponible para la detección de la infección por el *Mycobacterium tuberculosis* aprobada en los Estados Unidos <sup>(3)</sup>. El reconocimiento de que el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) desempeña un papel crítico en la respuesta inmune mediada por células contra el *M. tuberculosis* llevó al desarrollo de ensayos de liberación de interferón gamma (IGRA, del inglés interferon gamma release assays) para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con la infección <sup>(3)</sup>. Estas pruebas miden la respuesta inmune después de la estimulación con antígenos derivados de la bacteria y se detecta la liberación de IFN- $\gamma$  y ya sea en forma soluble o la frecuencia de células inmunes que producen esta citocina.

Los IGRA muestran una mayor sensibilidad para detectar tuberculosis latente, pero su gran limitación está dada por el alto costo, la incapacidad para realizar estos ensayos sobre muestras preservadas y porque al igual que la prueba de tuberculina, no permite realizar una precisa discriminación entre infección y enfermedad <sup>(4)</sup>.

Además de la respuesta inmune sistémica, la respuesta a TBC puede ser evaluada a nivel pulmonar dado que induce una respuesta inmune local dominada por Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y TNF- $\alpha$ , cuya detección podría ser usada para apoyar el diagnóstico <sup>(1)</sup>. En método podría discriminar entre pacientes con TBC y no TBC además de diferenciar entre TBC latente y activa. Debido a su fácil, poco costosa y rápida realización, la detección de los niveles de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e IL-6

podría ser muy útil como método de apoyo diagnóstico en pacientes que con sospecha clínica de TBC con baciloscopia en esputo negativa que son llevados a cultivo de LBA el cual dura 3 meses para obtener un diagnóstico microbiológico.

En este trabajo se propone determinar los niveles de IFN- $\gamma$  además del Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e Interleuquina (IL-6), presente en el lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes adultos con sospecha de TBC pulmonar comparándolos con pacientes controles con enfermedad pulmonar no TBC. Éste estudio evaluará una aproximación diagnóstica complementaria temprana para TBC pulmonar activa que se espera permita el inicio oportuno del tratamiento.

## 1. ANTECEDENTES

A nivel mundial se conoce que aproximadamente 8 millones de personas desarrollan TBC activa y 3 millones mueren de esta enfermedad en todo el mundo <sup>(5)</sup>. El balance entre citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias ha demostrado que desempeñan un papel importante en la patogénesis y la actividad de la enfermedad, incluyendo la formación de granulomas, necrosis y reacciones de hipersensibilidad de tipo retardada <sup>(5)</sup>.

Aunque el aislamiento del bacilo de *Micobacterium tuberculosis* es el "Gold standard" para el diagnóstico de TBC, los estudios han demostrado que ciertas concentraciones de citoquinas en el suero, así como en el líquido del lavado broncoalveolar (LBA) también puede contribuir al diagnóstico <sup>(6)</sup>.

El trabajo de Küpeli y colaboradores realizado en el 2008 con la finalidad de evaluar la precisión diagnóstica de los niveles de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2 en suero y LBA de los pacientes con tuberculosis pulmonar con baciloscopia negativa, usando como instrumento la técnica de ELISA, demostró que los niveles de TNF- $\alpha$  en LBA fueron significativamente elevados en el grupo de pacientes que resultaron con TBC en comparación con los pacientes que presentaban otras patologías pulmonares. Los niveles de TNF- $\alpha$  en BAL o de IFN- $\gamma$  fueron mayores en los pacientes con enfermedad cavitaria en comparación con aquellos sin esta, no se encontraron diferencias significativas entre cavitaria y la TBC no cavitaria en los niveles de citoquinas. La sensibilidad y especificidad del TNF- $\alpha$  en LAB se encontró que eran del 73 y 76% respectivamente y se concluyó que en los casos de TBC con baciloscopia negativa el TNF- $\alpha$  en LAB puede ser una herramienta útil para identificar a sujetos sanos de aquellos pacientes enfermos con TBC <sup>(5)</sup>.

En la investigación de Tsaoy *col*, se trató de establecer posibles correlaciones para el IFN- $\gamma$  y la IL-2 soluble con el receptor alfa (sIL-2R- $\alpha$ ) en lavados broncoalveolares y el grado clínico de TBC pulmonar, que fue determinado por factores tales como el compromiso pulmonar, fiebre y la pérdida de peso corporal. Para esto se recolectaron 45 muestras de pacientes con TBC pulmonar activa y 14 controles sanos, se midieron las citoquinas usando ELISA y 3 meses después se tomaron nuevas muestras de los LBA de aquellos pacientes quienes estaban en tratamiento antituberculoso. En los pacientes con TBC pulmonar de grado más alto (es decir con compromiso pulmonar más avanzado, fiebre o pérdida de peso corporal) reveló niveles significativamente más altos de IFN- $\gamma$  y sIL-2R- $\alpha$  en comparación con aquellos con TBC pulmonar de menor grado. Resultados similares también se determinaron para los niveles séricos de sIL-2R- $\alpha$ , pero después de la terapia antituberculosa los niveles de citoquinas

elevadas en los LBA y en suero disminuyeron significativamente, de acuerdo con la mejoría radiológica<sup>(7)</sup>.

El estudio de Nolan y colaboradores, tomaba en cambio pacientes con TBC pulmonar con cultivo positivo para *M. tuberculosis* con imágenes radiográficas de cavitación y se les practicó fibrobroncoscopia con muestra de LBA y encontraron que los pacientes con cavitación tuvieron mayor porcentaje de polimorfonucleares en el LBA, así como menor concentración de Proteína 10 inducida por IFN- $\gamma$  (IP-10, una citocina del tipo C-X-C) y la IL-6 en sobrenadantes de células de LBA, en comparación con los que no tenían cavitación. La expresión de IP-10 e IL-6 se asocia con menor probabilidad de cavitación en un 79% y un 78% en los modelos de regresión logística. Se concluyó que el aumento de IP-10 e IL-6 por las células en el LBA está asociado con TBC no cavitaria en pacientes que se presentan con TBC radiográficamente avanzada<sup>(8)</sup>.

Para evaluar el impacto de diferentes métodos para el diagnóstico presuntivo de TBC, Jafari y colaboradores en el 2011 publicaron un ensayo en donde tomaban los individuos con sospecha de TBC y siguiendo el algoritmo diagnóstico que incluía la baciloscopia inicial y la amplificación del ácido nucleico específico (NAAT) del *Mycobacterium tuberculosis* en esputo. En los casos en donde se tenían resultados de las pruebas iniciales negativos, se procedía a realizar la prueba cutánea de tuberculina, broncoscopia con biopsia transbronquial y ensayos de liberación de interferón- $\gamma$  (IGRA) en sangre periférica y fluido de LBA. De 135 individuos con sospecha de TBC, en 42 se confirmó TBC, la sensibilidad y la especificidad fueron del 41% y el 99% para la microscopía de esputo y el 31% y el 98% para la amplificación de ácidos nucleicos en LBA<sup>(9)</sup>. En IGRA en sangre periférica, la sensibilidad fue de 96% y la especificidad de 48,9%. El IGRA (tipo ELISPOT) que se realizó en las células del LBA fue el mejor método para distinguir la TBC activa de la infección latente con *M. tuberculosis*. De hecho, el IGRA del LBA que tenía una probabilidad negativa, según los resultados de este estudio permitió la exclusión de TBC activa<sup>(9)</sup>. En esta publicación, los pacientes con TBC activa tenían una concentración de más de 10 veces el IFN- $\gamma$  en el líquido de LBA frente a la sangre periférica, demostrando la compartimentalización de la respuesta inmune en la TBC.<sup>(9)</sup>

El Dr. Boras teniendo en cuenta la posible relación inmunológica entre el patrón de Th1/Th2 y la producción de citoquinas, evaluó la reactividad de la prueba de tuberculina en pacientes con infección activa por *Mycobacterium tuberculosis*. La producción de las citoquinas IFN- $\gamma$  e IL-4 se midió de las muestras obtenidas en sangre periférica y el BAL de 20 pacientes con prueba de tuberculina positiva comparados con 9 pacientes con la misma prueba negativa con tuberculosis pulmonar activa y se encontró que los pacientes negativos a la tuberculina tenían

una proporción significativamente mayor de producción de IFN- $\gamma$  en LBA que en sangre periférica, mientras los pacientes con tuberculina positiva secretan más IFN- $\gamma$  que sus homólogos de sangre periférica. No hubo diferencia significativa en la producción de IFN- $\gamma$  en las muestras en sangre periférica ni en las del LBA. Los resultados del estudio sugieren una mayor actividad inmune en la sangre de pacientes negativos a la tuberculina, con un aumento de la actividad de linfocitos en LBA en comparación con la sangre periférica en ambos grupos de pacientes <sup>(10)</sup>.

En otro estudio realizado por el Dr Wang y colaboradores se tenía como objetivo comprobar si el TNF- $\alpha$  podría ser utilizado como una nueva herramienta para el diagnóstico rápido de la TBC activa dado que es una citoquina que juega un papel importante en la respuesta inmune y patológica de los pacientes con TBC. Para esto se analizó el TNF- $\alpha$  en sangre periférica de 67 participantes con sospecha de infección por TB mostrando que al realizar el cálculo de TNF- $\alpha$  específico para el *M. Tuberculosis* se puede distinguir entre la infección activa de la latente y también se diferenciaron pacientes con TBC activa de los pacientes no TBC utilizando el valor de corte de 136,9 pg/ml <sup>(11)</sup>. La sensibilidad y la especificidad fueron del 72% y 90.9% respectivamente <sup>(11)</sup>. Estos datos sugieren que TNF- $\alpha$  específico para TBC en sangre periférica podría ser un marcador potencial para el diagnóstico de la TBC activa aunque quedó claro que se necesitan más estudios para reforzar esta afirmación <sup>(11)</sup>.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La TBC pulmonar es una patología endémica en nuestra región. El cultivo para TBC que es el “Gold estándar”, tiene una sensibilidad del 85% y una especificidad de 98%, un resultado positivo asegura el diagnóstico de TBC, con un alto valor predictivo positivo pero su desventaja más grande radica en el largo tiempo que se requiere para conocer los resultados, que es de 2 a 3 meses <sup>(9)</sup>.

Hasta la fecha, el diagnóstico de la TBC activa en aquellos pacientes en los que las baciloscopias en esputo son negativas, es difícil y requiere mucho tiempo en espera del cultivo, por lo que en la actualidad hay cada vez más esfuerzos para buscar nuevas herramientas diagnósticas tempranas <sup>(12)</sup>. Se planteó la hipótesis de que en los pacientes con afección pulmonar, las células broncoalveolares muestran una mayor reactividad frente a antígenos de micobacterias <sup>(12)</sup>. Por lo tanto, mientras un pequeño número de células T específicas para *Mycobacterium tuberculosis* se encuentran en la circulación periférica, las células T efectoras antígeno específicas se acumulan en el sitio de la enfermedad y producen rápidamente citocinas de tipo Th-1 <sup>(12)</sup>.

La infección por *Mycobacterium tuberculosis* induce una respuesta inmune local dominada por Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y otras citocinas, en especial el del TNF- $\alpha$ . Por lo tanto su detección podría ser usada para apoyar el diagnóstico <sup>(1)</sup>. La detección de esta citocina por ELISA es poco costosa, rápida y confiable, el costo de un kit con 100 muestras se encuentra alrededor de \$649 dólares que equivale a 6.49 dólares cada muestra <sup>(13)</sup>. Además el IFN- $\gamma$  en diferentes meta-análisis muestra que en el líquido pleural, es sensible en 89-96% y específico en un 96-97% para el diagnóstico de la TBC pleural <sup>(9)</sup>. La medición directa del IFN- $\gamma$  en el LBA podría tener la ventaja de ser mucho más rápido de realizar y con esto obtener apoyos diagnósticos tempranos de la enfermedad para inicios oportunos de tratamiento <sup>(9)</sup>.

En base a la hipótesis anterior se desarrolló la investigación de Nemeth y colaboradores donde analizaron el reclutamiento preferencial de las células T CD4 (+) especulando que podría permitir distinguir entre los pacientes con tuberculosis activa y aquellos con enfermedades no tuberculosas y llegaron a demostrar que la respuesta del IFN- $\gamma$  específica para el *Mycobacterium tuberculosis* en sangre periférica es baja (60%) entre los pacientes con TBC activa <sup>(11)</sup>. En contraste, el reclutamiento de células T específicas de *M. Tuberculosis* para el sitio de la infección produjo una sensibilidad del 100% y una especificidad del 90% independiente del compartimiento afectado. Por lo que se concluyó que

los pacientes que tenían TBC activa mostraban un enriquecimiento notable de células T específicas de *M. Tuberculosis* en el sitio de la infección <sup>(11)</sup>.

Teniendo en cuenta lo anterior se puede llegar a la conclusión de que el sello distintivo de la enfermedad activa no es la presencia de células T específicas para *Micobacterium tuberculosis (MBT)* en la sangre periférica, sino la acumulación de estas células con la producción de citocinas en el compartimento afectado <sup>(12)</sup>. Por lo tanto, la reactividad de las células T específicas para *MBT* utilizando el antígeno temprano de secreción diana antigénica 6 (ESAT)-6 en sangre periférica sin incremento en el sitio de la enfermedad es indicativo de la infección latente de TB, pero no activa <sup>(12)</sup>, puesto que lo que se revela con la estimulación con el antígeno es la liberación de citocinas a partir de células T de memoria.

Es por esto que la secreción de IFN- $\gamma$  y otras citocinas de las células T CD4 + en el sitio de la infección puede proporcionar una nueva herramienta para acelerar el diagnóstico de la TBC activa.

Teniendo en cuenta la hipótesis planteada la pregunta que se quiso responder fue: ¿Hay diferencias en los niveles de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  e IL-6 en LBA entre pacientes con TBC pulmonar y no TBC? ¿Podría esta expresión diferencial del IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  o IL-6 localmente producido, ser usado como un método diagnóstico complementario temprano para TBC pulmonar en adultos con BK negativo?

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar si hay diferencias en los niveles TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 en LBA entre pacientes con TBC pulmonar BK negativo y controles no TBC, y evaluar su valor diagnóstico.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Conocer si la TBC pulmonar activa, incrementa los niveles de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 en el LBA.

Comparar la sensibilidad y especificidad del TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 en LBA con los métodos diagnósticos para TBC pulmonar localmente disponibles.

## 4. JUSTIFICACIÓN

La detección de *M. tuberculosis* en cultivos sigue siendo el estándar de oro para el diagnóstico de la TBC<sup>(14)</sup>. En la práctica clínica habitual, la decisión de iniciar el tratamiento no puede esperar el resultado de esta prueba ya que este método lleva varias semanas (8 semanas) antes de que sea posible la detección en el cultivo<sup>(14)</sup>. Además, aproximadamente el 20% de los pacientes con tuberculosis no son identificados por el crecimiento del cultivo de *M. tuberculosis*.<sup>(15)</sup>

Aunque la infección por *MBT* implica diferentes formas clínicas de TBC, como la TBC pulmonar, la TBC pleural, y la TBC de los ganglios linfáticos, la mayoría de los estudios de la TBC humana se realizan utilizando las células de la sangre periférica, que no ofrecen un reflejo adecuado de la respuesta inmune específica inducida por el *MBT* a diferencia de la respuesta en el sitio local de la infección<sup>(16)</sup>. Una proporción muy baja de células T efectoras específicas de *MBT* se encuentran en la sangre en comparación con el tejido infectado, y por lo tanto puede haber diferencias considerables en la respuesta inmune celular y mecanismos reguladores inducidos en estos diversos compartimentos<sup>(16)</sup>.

Tanto en humanos como en modelos animales, se han identificado una serie de mecanismos inmunes potencialmente implicados en la protección contra la infección por *MBT*<sup>(16)</sup>. La inmunidad celular, en particular la respuesta mediada por las células T, son fundamentales en la interacción con el *MBT*<sup>(16)</sup>. La inmunidad protectora en TBC ha demostrado ser dependiente de células Th1 T CD4<sup>(+)</sup> productoras de interferón (IFN- ) y factor de necrosis tumoral (TNF- ), así como células T citolíticas (CTL) que producen moléculas efectoras asociadas a gránulos tales como perforina, granzimas, y granzulina<sup>(16)</sup>.

Tras la activación de células T específicas del *Ag*, las citoquinas efectoras que se producen, promueven la activación de los macrófagos y el control del crecimiento del *MBT* es principalmente a través de la producción de óxido nítrico (ON) y péptidos antimicrobianos incluyendo catelicidina humana, LL37<sup>(16)</sup>. Estas funciones efectoras antimicrobianas innata y adaptativa están reguladas por una red compleja de células y mediadores inmunológicos que pueden verse afectados negativamente por factores de virulencia específicas de patógeno<sup>(16)</sup>.

Es importante destacar que la aparición de la inmunidad adaptativa en la TBC humana se retrasa en comparación con otras infecciones, lo que permite que la carga bacteriana en el pulmón se expanda de manera significativa en las primeras etapas de la infección<sup>(16)</sup>. En las infecciones crónicas por la TBC, es de gran

relevancia estudiar las interacciones huésped-patógeno en el tejido infectado, porque las células T efectoras son reclutadas y se acumulan en el sitio local de la replicación bacteriana <sup>(16)</sup>.

En los pacientes con TB, la sangre es frecuentemente estudiada debido a que es de fácil acceso, aunque el análisis funcional de las células mononucleares de sangre periférica normalmente requiere la re-estimulación específica de antígeno *in vitro* <sup>(16)</sup> y necesita hacerse en fresco inmediatamente después de ser aislada, sin posibilidad de conservación. Es importante destacar que los linfocitos circulantes en la sangre representan sólo aproximadamente el 2% de la reserva total de linfocitos, mientras que la mayoría de los linfocitos se limitan a órganos linfoides secundarios y en los tejidos no linfoides tales como intestino, pulmón y la médula ósea durante condiciones de estado estable <sup>(16)</sup>.

Durante una infección, la mayoría de las células T específicas del microorganismo migran al sitio del tejido local en respuesta a señales quimiotácticas, donde se expanden y ejercen sus funciones efectoras <sup>(16)</sup>. Lo que destaca la importancia de utilizar métodos complementarios para evaluar las respuestas inmunes sistémicas y locales <sup>(16)</sup>. En consecuencia, un número de importantes estudios sobre la TBC humana han informado de diferencias significativas en las respuestas de células T en el sitio de la infección por *MTB* en comparación con la sangre <sup>(16)</sup>.

La mayoría de los estudios sobre la TBC humana implican células de la sangre periférica, que pueden no proporcionar una imagen representativa de las respuestas inmunes específicas presentes en el sitio del órgano infectado o en el microambiente de las lesiones granulomatosas <sup>(16)</sup>. Para explorar la patogénesis de la TBC humana con el objetivo de desarrollar nuevas estrategias para la prevención y tratamiento de la enfermedad, hay que intensificar la investigación para estudiar las importantes interacciones huésped-patógeno en el sitio local de la infección <sup>(16)</sup>.

De los diferentes estudios que se encuentran en la literatura se sugiere la hipótesis de que “altos niveles de citoquinas son un sello en la patogénesis de la TBC”, por lo que pensamos que algunas citoquinas se pueden usar para propósitos de diagnóstico durante el curso de esta enfermedad,

Por esta razón, de los LBA obtenidos de pacientes con BK negativos, se han determinado los niveles de tres citoquinas TNF- , IFN- e IL-6 en el laboratorio. Los niveles de las citoquinas fueron evaluados y se compararon entre

los grupos (pacientes con sospecha de TBC y los que presentaban otras enfermedades pulmonares sin sospecha de TBC).

Teniendo en cuenta lo anterior se pretende estudiar los niveles de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 en el LBA y tratar de demostrar si pueden llegar a ser una valiosa herramienta en el diagnóstico de TBC pulmonar activa en pacientes con baciloscopia negativa en donde el siguiente paso en el esquema diagnóstico es el análisis microbiológico del LBA obtenido por fibrobroncoscopia.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 DEFINICIÓN

La palabra tuberculosis (TBC) viene del latín Tuberculum “pequeña protuberancia, tumor pequeño” y el sufijo griego “Osis” que denota enfermedad<sup>(17)</sup>. El término TBC describe una amplia gama de enfermedades clínicas causadas por *Mycobacterium tuberculosis*, también llamado Bacilo de Koch en honor a su descubridor<sup>(18)</sup>.

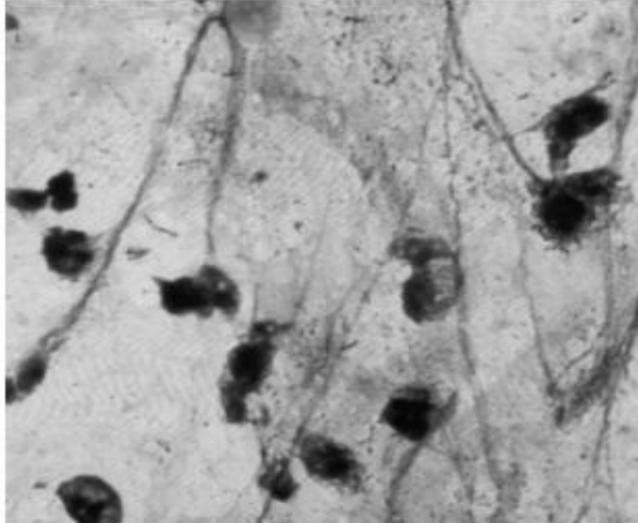
Es una infección de localización preferentemente pulmonar y que se caracteriza por la formación de tubérculos o nódulos en los tejidos infectados; aunque puede afectar diferentes órganos del cuerpo<sup>(15)</sup>. Entre los distintos tipos de TBC, puede mencionarse la meníngea (que compromete las meninges), la cardiovascular (centrada en el corazón, el pericardio o los vasos sanguíneos), la pleural (pleural pulmonar), la oftálmica (infección del ojo), la osteoarticular (la infección pulmonar se traslada a un hueso o articulación mediante el torrente sanguíneo), la genitourinaria (que puede ser causa de esterilidad) y la miliar (afecta a varios órganos por la diseminación sanguínea del bacilo)<sup>(17)</sup>.

### 5.2 ETIOLOGÍA

El complejo MTB comprende al menos siete especies del género *Mycobacterium*, familia *Mycobacteriaceae* y *Actinomycetales* que son causales de la TBC humana y las enfermedades zoonóticas<sup>(17)</sup>.

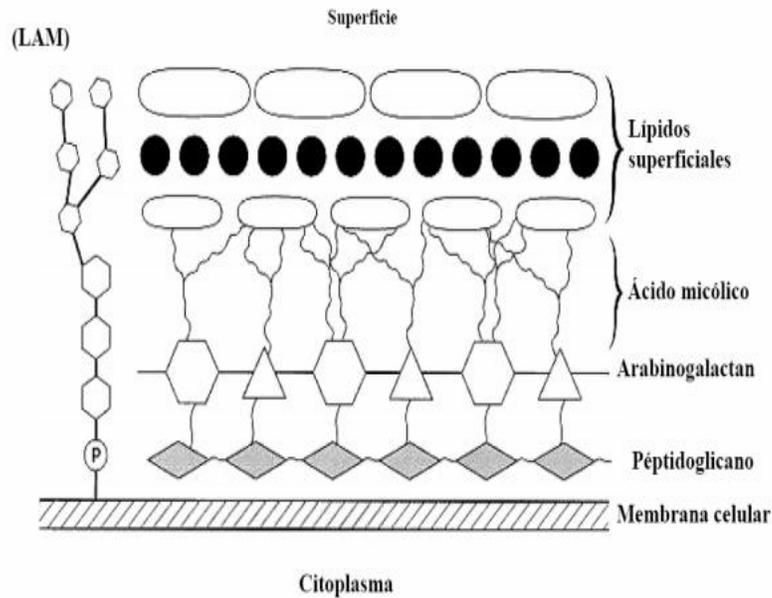
La especie de *MBT* produce la gran mayoría de TBC humana en todo el mundo<sup>(19)</sup>. *Mycobacterium africanum* provoca la TBC humana en África occidental, donde representa el 50% de los casos<sup>(20)</sup>. *Mycobacterium Canetti* es una causa extremadamente rara de TBC humana en el Oriente de África<sup>(20)</sup>. *M. bovis* causa la enfermedad en el ganado y se propaga a los seres humanos a través del contacto con los animales y el consumo de leche no pasteurizada<sup>(17)</sup>. *M. caprae*, otro patógeno del ganado, *Mycobacterium Microti*, un patógeno de los roedores y *Mycobacterium pinnipediense* han reportado que causan TBC zoonótica en humanos<sup>(17)</sup>. Los seres humanos son el único reservorio para la especie de *M. tuberculosis*, a pesar de que muchos animales son susceptibles a la infección<sup>(1)</sup> (Figura 1).

**Figura 1.** Frotis de esputo que muestra bacilos ácido-alcohol resistentes (Coloración de Ziehl-Neelsen). (Aumento original x 960)<sup>(1)</sup>.



*M. tuberculosis* es un bacilo aerobio, no formador de esporas, inmóvil con un contenido de pared celular alto de lípidos de alto peso molecular<sup>(21)</sup>. Su crecimiento es lento, con un periodo de generación de 15-20 horas, comparado con el tiempo inferior a la hora de los patógenos bacterianos más comunes y el crecimiento visible entre 3 y 8 semanas en un medio sólido<sup>(17)</sup>. La constitución química de la pared bacteriana está compuesta por ácidos micólicos, ceras complejas glicolípidos<sup>(22)</sup>.(Figura 2). Los acidomicólicos contiene cadenas laterales que se unen a la molécula de ácidomurámico del peptidoglicano a través de enlaces fosfodiésteres y a los arabinogalactanos<sup>(22)</sup>. Por uniones de glicolípidos<sup>(22)</sup>. Otro componente importante son los dimicolatos de trehalosa y los sulfolípidos, los cuales son partícipes en el proceso de virulencia. Otro constituyente único es el lipo-arabino-manano (L.A.M) que puede contribuir al daño del hospedero<sup>(22)</sup>.

**Figura 2.** Estructura y composición química de la pared celular de *MTB*.<sup>(22)</sup>.



La principal característica que define el género *Mycobacterium* es la propiedad de "solidez al ácido", la capacidad de resistir la decoloración con una mezcla de ácido-alcohol después de la coloración con Ziehl-Neelsen o auramin<sup>(1)</sup>. Además las micobacterias son principalmente parásitos intracelulares, con tasas lentas de crecimiento y en hospederos normales inducen una respuesta granulomatosa en el tejido<sup>(1)</sup>.

### 5.3 EPIDEMIOLOGÍA

Durante la mayor parte de la historia, la TBC ha sido un problema de enormes dimensiones en todo el mundo y lo sigue siendo<sup>(23)</sup>. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en 2011, se presentaron 8.7 millones de nuevos casos de TBC activa en todo el mundo (13% de estos con coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana [VIH]) y 1.3 millones de muertes, incluyendo 430 mil fallecimientos entre los pacientes infectados por el VIH<sup>(23)</sup>.

Se considera inaceptable el número de muertes por TBC dado que la mayoría de los casos son evitables<sup>(24)</sup>. Casi 20 años después de la declaración de la OMS de la tuberculosis como emergencia de salud pública mundial, el reciente panorama

mundial muestra un descenso en los casos pero no lo suficientemente rápido como se encontraba establecido en la estrategia de control <sup>(25)</sup>.

La resistencia a los agentes antituberculosos se ha estudiado desde la década de 1940; sin embargo hoy en día apenas el 0.5% de las personas con diagnóstico reciente de tuberculosis multidrogoresistente en todo el mundo reciben el tratamiento estándar <sup>(24)</sup>. Los que no han recibido el tratamiento adecuado siguen alimentando una pandemia mundial que ahora incluye a las cepas resistentes <sup>(24)</sup>.

Se ha estimado que hay 310.000 casos nuevos de TBC multirresistente, causadas por organismos resistentes al menos a isoniazida y rifampicina, entre los pacientes que fueron reportados por tener TBC, más de 60% de estos pacientes se encontraban en China, India, la federación de Rusia, Pakistán y Sudáfrica <sup>(23)</sup>. Un total de 84 países tiene reportados casos de TBC extensivamente resistente a medicamentos que se entiende que es la resistencia a todas las fluoroquinolonas más cualquiera de los tres fármacos antituberculosos inyectables como kanamicina, amikacina y capreomicina <sup>(23)</sup>.

Las tasas más altas de TBC activa son de África subsahariana, impulsado principalmente por la epidemia del VIH <sup>(23)</sup>. El número absoluto de casos es más alto en Asia, con la India y China tienen la mayor carga de la enfermedad a nivel mundial <sup>(23)</sup>. En los Estados Unidos y la mayoría de los países de Europa Occidental, la mayoría de los casos ocurren en los residentes nacidos en el extranjero y los inmigrantes de países donde la tuberculosis es endémica <sup>(23)</sup>.

Los datos más recientes sobre la situación epidemiológica de la TBC en nuestro país muestran pocas variaciones <sup>(26)</sup>. En 2009, la tasa de incidencia fue de 25.4 x 100,000 habitantes, frente a una estimada por la OMS para Colombia de 35 x 100,000, lo que nos sitúa como país de incidencia intermedia en el mundo. La proporción de casos con coinfección VIH/TB para el mismo año fue de 10,42% <sup>(26)</sup>.

Existe una amplia variación nacional, con regiones donde la incidencia supera los 50 x 100,000 habitantes <sup>(2)</sup>. Dada la dificultad de informe sistemático por parte de algunas regiones apartadas, no hay certeza de la representatividad nacional de muchas de estas cifras y es claro que en Colombia se necesitan actividades de vigilancia expandidas para mejorar la calidad y la frecuencia de esta información <sup>(26)</sup>.

A nivel del Huila entre el 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> trimestres de 2013 se notificaron 15 casos de TBC meníngea, 42 casos de TBC extrapulmonar y 182 casos de TBC pulmonar, el 9.2% de los casos corresponden a procedencia de otros departamentos como Antioquia, Bogotá, Caquetá, Cauca, Nariño, Norte de Santander, Tolima y Valle y el 90.8% de los casos (186) fueron procedentes de municipios del Huila<sup>(2)</sup>. El género con mayor número de casos (145) es el masculino tanto en la TBC pulmonar (160 casos), extrapulmonar (34 casos) como meníngea (12 casos)<sup>(2)</sup>. Los municipios con una incidencia de TBC superior son Altamira, Neiva, Elías, Teruel, Rivera y Paicol; por lo cual son priorizados en el seguimiento de vigilancia en salud pública<sup>(2)</sup>. Hasta la semana epidemiológica 26 de 2013 se registró una tasa de mortalidad de 1 caso de TBC por cada 100,000 habitantes siendo la mortalidad por TBC pulmonar de 0.88 x cada 100,000 habitantes<sup>(2)</sup>.

## 5.4 PATOGÉNIA

La génesis de las reacciones en la patogénesis de la TBC está estrictamente vinculada con la respuesta del hospedero al bacilo tuberculoso invasor<sup>(1)</sup>. Pero no todas las personas infectadas desarrollan la enfermedad<sup>(1)</sup>. El riesgo de desarrollar la enfermedad por parte de una persona infectada viene dado por las condiciones higiénico-ambientales, por la persistencia del contacto (cantidad de bacilos inhalados), la edad (más frecuente en edades tempranas y avanzadas) y por la existencia de enfermedades de base que puedan deprimir la inmunidad. Son enfermedades de riesgo las siguientes:<sup>(17)</sup>

- Diabetes Mellitus
- Uremia
- Enfermedades infecciosas crónicas
- Gastrectomía
- VIH
- Alcoholismo
- Drogadicción
- Tratamientos con corticoides o inmunosupresores.

Una vez el *MBT* se inhala, en los pulmones una serie de eventos inmunológicos conduce a 3 resultados posibles: erradicación, la infección primaria o infección latente<sup>(27)</sup>. La TBC aguda puede presentarse como una enfermedad primaria o por reactivación de la infección latente<sup>(27)</sup>.

La infección primaria en la mayoría de las personas es asintomática o leve y un 3 a 10% de los casos se desarrolla la enfermedad sintomática aguda que requiere atención médica<sup>(27)</sup>. La TBC latente afecta a aproximadamente un tercio de la población mundial y estos están expuestos a los riesgos por reactivación o por la enfermedad aguda. Con menor frecuencia, la reinfección con TBC podría dar lugar a un síndrome clínico agudo<sup>(27)</sup>.

La TBC es una enfermedad altamente infecciosa, su ruta de entrada dentro del organismo es a través del tracto respiratorio por la vía inhalatoria, al hablar, toser o estornudar. En los sitios en los que no se pasteuriza la leche de vaca, *M. bovis* puede penetrar por vía orodigestiva, a través del tejido linfático de la faringe o de la mucosa intestinal<sup>(28)</sup>.

Los pacientes con TBC pulmonar activa son la fuente de *Mycobacterium tuberculosis*<sup>(27)</sup>. En más de 90% de las personas infectadas con *M. tuberculosis*, el patógeno está contenido como infección latente asintomática<sup>(27)</sup>. Estudios recientes plantean la posibilidad de que algunas personas adquieren y eliminan la infección aguda<sup>(27)</sup>. El riesgo de la enfermedad activa se estima en aproximadamente el 5% en los 18 meses después de la infección inicial. Se estima que 2 mil millones de personas en todo el mundo tienen la infección latente y están en riesgo de reactivación<sup>(23)</sup>.

Las partículas infecciosas son liberadas en gotitas de aerosol y sufren un proceso de evaporación y algunas quedan constituidas solamente por un núcleo con bacilos viables, que pueden permanecer suspendidas en el aire por periodos prolongados de tiempo<sup>(28)</sup>.

Las principales características de la respuesta inmune innata incluyen el reconocimiento de diversas estructuras moleculares ampliamente distribuidas entre patógenos por receptores como los TLR (toll-like receptors), los cuales inducen moléculas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y óxido nítrico (NO) que directa o indirectamente contribuyen a la muerte de los microorganismos, además de inducir la activación y orientación de la respuesta adaptativa a través del reclutamiento de linfocitos T al sitio de lesión, activación de células dendríticas y producción de citocinas y quimiocinas<sup>(29)</sup>.

En el espacio alveolar los mecanismos innatos de defensa involucran a diferentes tipos celulares como macrófagos alveolares (MA), células dendríticas, neutrófilos, linfocitos B, células epiteliales, células alveolares tipo I y tipo II y factores solubles como mucina, lisozima, lactoferrina, surfactantes, defensinas, catelicidinas, fosfolipasa A2, inmunoglobulinas y proteínas del complemento, cuya función es mantener la homeostasis pulmonar y eliminar partículas o bacterias que entren por el tracto respiratorio<sup>(29)</sup>.

*MBT* llega a los alvéolos donde entra en contacto con los MA que constituyen la primera línea de defensa en el pulmón<sup>(29)</sup>. Este contacto inicial es crucial y definirá el control de la infección, o bien, el desarrollo de la enfermedad. Componentes de la micobacteria como ellipoarabinomano (LAM), lipoproteína de 19kDa y glicoproteínas, al unirse al receptor tipo Toll 2 (TLR2) de los MA inducen la producción de moléculas como interleucina-1 (IL-1), TNF- $\alpha$  y óxido nítrico que activan señales intracelulares para la producción de proteínas involucradas en la respuesta inmune<sup>(30)</sup>.

El mecanismo de señalización intracelular que se activa tras la unión de LAM, 19kDa y otras glicoproteínas con TLR2 y la unión de citocinas como IL-1 y TNF- $\alpha$  con sus respectivos receptores, activan diferentes vías de señalización que tienen en común el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), induciéndose la expresión de citocinas y moléculas involucradas en la respuesta inmune<sup>(29)</sup>.

El macrófago alveolar (MA) es la primera célula que entra en contacto con el *MTB*<sup>(25)</sup>. Esta célula procesa y presenta antígenos micobacterianos a los LT CD4+. El macrófago además produce citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12p70, esta última citocina induce a los LT CD4+ a producir IFN- $\gamma$  (perfil Th1)<sup>(25)</sup>. El IFN- $\gamma$  potencia la capacidad del macrófago de destruir intracelularmente la Micobacteria por aumento de la expresión de iones como el superóxido y peróxido, además de reactivos intermediarios del nitrógeno como el óxido nítrico (ON)<sup>(25)</sup>.

*MBT* utiliza diferentes vías de entrada a los MA, ya que promueve su propia fagocitosis a través de diferentes receptores presentes en la superficie de los MA como, 1) receptores para Fc, 2) receptores de complemento como CR1 y CR3/CR4, 3) receptores de manosa, 4) receptores carroñeros (scavenger) y 5) receptores para la proteína surfactante A<sup>(29)</sup>.

Posterior a la fagocitosis, *M. tuberculosis* es incluida en un fagosoma para formar el fagolisosoma donde, en un proceso dinámico, es destruida por los mecanismos bactericidas y proteolíticos de los macrófagos con la consecuente generación de

péptidos y otros antígenos<sup>(29)</sup>. Los antígenos micobacterianos de naturaleza proteica son acoplados a moléculas del complejo de histocompatibilidad tipo I (MCH I) y presentados por los macrófagos a linfocitos T CD8+, o bien, acoplados a moléculas del complejo de histocompatibilidad tipo II (MCH II) y presentados a los linfocitos T CD4+, mientras que los antígenos de naturaleza glicolipídica (fosfatidilmanósidos, lipoarabinomananos, ácidos micólicos y hexosil-1-fofoisoprenoides) son acoplados con moléculas CD1 y presentados a los linfocitos CD8+ y dobles negativos (CD4-CD8-)<sup>(29)</sup>.

El proceso de presentación de antígenos constituye un paso importante en la transición de la respuesta inmune innata a la respuesta inmune adaptativa, que se basa en el reconocimiento específico de antígenos por los diferentes tipos celulares que se activan y producen factores solubles como citocinas y quimiocinas<sup>(29)</sup>. El control inmunológico de la infección con *MTB* está basado en una respuesta inmune de tipo celular caracterizada por la producción de citocinas y quimiocinas como: IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ , RANTES, MCP-1, MIP-1 e IL-8. La respuesta no protectora se caracteriza por la producción de citocinas como: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 y TGF- $\beta$  que antagonizan la respuesta inmune celular y como consecuencia, no hay control de la infección y se desarrolla la enfermedad<sup>(29)</sup>.

Las diferentes poblaciones celulares y mediadores solubles en su conjunto forman una compleja red de señales que participa en el control de esta enfermedad<sup>(29)</sup>. El IFN- $\gamma$  es una citocina muy importante en el control de infecciones causadas por bacterias intracelulares como *MTB*<sup>(29)</sup>.

La interacción del IFN- $\gamma$  con su receptor (IFN $\gamma$ R) activa a los macrófagos a inducir la expresión de más de 200 genes que codifican para proteínas involucradas en la respuesta inmune tales como: MHC I, MHC II, p48, TAP 1, LAMP-2<sup>(29)</sup>. El IFN- $\gamma$  induce la producción de intermediarios de oxígeno (ROI), intermediarios de nitrógeno (RNI), acidificación del fagosoma y fusión fagosoma-lisosoma, la expresión de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) para la producción NO a partir de L-arginina como sustrato, la producción de defensinas, la disminución del receptor de transferrina para reducir el hierro (Fe) intracelular y de esta manera limitar el desarrollo de la micobacteria, aumento en las moléculas MHC I y MHC II involucradas en la presentación de antígenos proteicos y aumento en la capacidad para fagocitar e inducir la producción de IL-12<sup>(29)</sup>.

El TNF- $\alpha$  es producido principalmente por los monocitos, macrófagos y los linfocitos T activados y participa en múltiples mecanismos de la respuesta inmune. Asimismo, actúa en forma sinérgica con el IFN- $\gamma$  para inducir la expresión de la enzima iNOS,

involucrada en la producción de óxido nítrico que participa en la destrucción de *MTB* junto con los intermediarios de oxígeno<sup>(29)</sup>. A pesar de que el papel de NO es controversial en humanos, los altos niveles de iNOS observados en MA de pacientes con TBC pulmonar, en comparación con sujetos sanos, sugieren la importancia de esta enzima y su participación en el control de la infección<sup>(29)</sup>.

La IL-6, tiene múltiples papeles en la respuesta inmune, incluyendo inflamación, hematopoyesis y diferenciación de las células T<sup>(30)</sup>. Tiene un papel potencial en la supresión de la respuesta de las células T. La IL-6 es importante en la respuesta innata inicial al patógeno<sup>(30)</sup>.

Cada vez es más claro que las células T activadas, los MA, y la producción de una variedad de linfoquinas y citoquinas también están implicados en el daño tisular que se produce en la TBC<sup>(27)</sup>.

La lesión hística de la TBC tiene varios componentes, que se suelen mezclar con frecuencia, predominando uno u otro en función del estado inmunoalérgico del paciente y del tiempo de evolución<sup>(1)</sup>. Las lesiones que se encuentran son:

1. Proliferación celular: componente inflamatorio reactivo alrededor del foco infeccioso de bacilos de Koch, englobando a manera de un pequeño tumor de 1mm de diámetro (granuloma tuberculoso) y compuesto por macrófagos o histiocitos modificados (*células epitelioides*), y algunas células gigantes de *Langhans*<sup>(1)</sup>. Esta lesión proliferativa tiene tendencia a producir necrosis de la parte central, que recibe el nombre *caseosis*<sup>(25)</sup>.
2. Exudación: lesión con gran producción de exudado líquido inflamatorio y poca reacción celular. También tiene tendencia a la caseosis difusa<sup>(25)</sup>.
3. Cavernización: se trata de formación de cavidades (*cavernas*) secundarias a los focos de caseosis cuando se vacían. Estas cavidades tienen una gruesa pared donde crecen los bacilos de KOCH<sup>(25)</sup>.
4. Fibrosis: son formaciones involutivas y residuales de las anteriores lesiones. La fibrosis es una forma de curar la tuberculosis, pudiendo ser únicamente una lesión residual o también coexistir con formas de tuberculosis activa<sup>(25)</sup>.

A través de la reacción inmune se forman granulomas y en ellos los bacilos tienden a localizarse en su porción central, que a menudo es necrótica (caseum)<sup>(27)</sup>. Los macrófagos tisulares derivados de los monocitos posteriormente se transforman en células epitelioides y se fusionan para formar células gigantes mononucleadas<sup>(28)</sup>. Ese granuloma dentro de los pulmones y drenando a los ganglios linfáticos, es el llamado complejo primario o Complejo de Ghon<sup>(28)</sup>.

## 5.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Las características clínicas clásicas de la TBC pulmonar incluyen tos crónica, expectoración, pérdida de apetito, pérdida de peso, fiebre, sudoración nocturna y hemoptisis<sup>(23)</sup>. La TBC extrapulmonar ocurre en el 10 al 42% de los pacientes, en función de la raza o el origen étnico, la edad, la presencia o ausencia de la enfermedad subyacente, el genotipo de la cepa de *M. tuberculosis* y el estado inmunitario del paciente<sup>(23)</sup>. La TBC extrapulmonar puede afectar a cualquier órgano del cuerpo y las manifestaciones clínicas son inespecíficas y por lo tanto requiere de un alto índice de sospecha clínica<sup>(23)</sup>.

La co-infección por el VIH presenta un desafío especial para el manejo clínico de los pacientes con tuberculosis activa<sup>(23)</sup>. El riesgo de TBC activa aumenta después de la infección con el VIH y las manifestaciones de la TBC pulmonar en esta etapa son similares a los de las personas que son VIH-negativas<sup>(23)</sup>. En los recuentos de células CD4 inferior a 200 por milímetro cúbico, la presentación de la TBC puede ser atípica, con infiltrados sutiles, derrames pleurales, linfadenopatía hilar, y otras formas de TBC extrapulmonar en hasta el 50% de los pacientes<sup>(17)</sup>.

En personas asintomáticas, la TBC subclínica se caracteriza por presentar resultados negativos en la prueba de esputo y hallazgos radiográficos en tórax y resultados de los cultivos positivos, es una característica común de la TBC asociada al VIH y puede representar el 10% de los casos en las regiones en las que la TBC es endémica<sup>(23)</sup>. Hasta el 25% de los pacientes con VIH presentan diagnóstico de TBC activa<sup>(23)</sup>. Se recomienda la detección de la TBC en todos los pacientes con infección por el VIH antes de iniciar la terapia preventiva con isoniazida<sup>(23)</sup>. La presencia de cualquiera de los cuatro síntomas (tos, fiebre, sudoración nocturna o pérdida de peso) se ha demostrado que tiene la sensibilidad del 80% y requiere la identificación y evaluación adicional para realizar el diagnóstico, incluso en regiones con recursos limitados<sup>(1)</sup>. Se recomienda la detección proactiva de la TBC en las zonas donde la enfermedad es altamente endémica, ya que la TBC subclínica en pacientes con infección por VIH o las enfermedades no transmisibles (como la diabetes mellitus y la enfermedad pulmonar crónica relacionada con el tabaco)<sup>(23)</sup>.

Por otro lado la TBC miliar aguda tiene un curso grave, rápidamente progresivo, por lo general después de la infección aguda en adultos jóvenes y se caracteriza por granulomas caseificantes, con frecuencia resulta con bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) negativo al igual que los cultivos <sup>(27)</sup>.

Aunque el pico de incidencia de la TBC miliar es en la segunda a la cuarta década de la vida, puede ocurrir a cualquier edad<sup>(27)</sup>. Hasta un 20% de las personas con una forma crónica de la TBC tienen evidencia de TBC miliar aguda en la autopsia<sup>(27)</sup>. En los que mueren de tuberculosis aguda, la enfermedad se diagnostica post-mortem en aproximadamente 25%<sup>(27)</sup>. Además un tercio de los pacientes con TBC miliar aguda tienen una comorbilidad subyacente, como la diabetes, el embarazo, el uso de corticoides de forma crónica. La mortalidad es elevada (hasta 33%) y aumenta con la edad, enfermedades médicas subyacentes y la presencia de meningitis <sup>(1)</sup>.

Los síntomas más comunes de la tuberculosis miliar son inespecíficos: anorexia, fiebre, tos y pérdida de peso <sup>(27)</sup>. (Tabla 1)<sup>(27)</sup>.

**Tabla 1.** Hallazgos clínicos en las formas agudas de la TBC miliar <sup>(27)</sup>.

HALLAZGO	FRECUENCIA
Fiebre	93%
Pérdida de peso	85%
Sudoración nocturna	79%
Disnea	64%
Tos	82%
Esplenomegalia	78%
Hepatomegalia	35%

El examen físico puede mostrar los tubérculos de las coroides (patognomónicos con placas color amarillo-blanco en el examen del fondo de ojo) presentes en el 15% de los casos <sup>(30)</sup>.

Otro de los tipos de TBC, la meningitis tuberculosa se caracteriza generalmente por una presentación de 2 semanas de fiebre, dolor de cabeza, y meningismo<sup>(32)</sup>. Puede haber bajos niveles de conciencia, diplopía y rara vez, hemiparesia<sup>(32)</sup>. La exploración física muestra una rigidez en el cuello y, en ocasiones, la neuropatía craneal (VI, III, IV, VII, en orden de frecuencia)<sup>(32)</sup>.

La linfadenitis tuberculosa puede ser la única manifestación de la TBC o particularmente en la infección por el VIH<sup>(32)</sup>. Los pacientes con enfermedad del nódulo linfático aislado pueden estar afebriles<sup>(32)</sup>. Los ganglios linfáticos cervicales posteriores y supraclaviculares están involucrados con más frecuencia<sup>(32)</sup>. Esto está en contraste con *M. bovis* que se ve a menudo en los niños, en los que se encuentran en localización submandibular anterior y adenopatía cervical<sup>(31)</sup>. La linfadenitis no suele ser dolorosa, y la aspiración de los ganglios linfáticos es lo que establece el diagnóstico<sup>(32)</sup>.

La pericarditis tuberculosa tiene como manifestación habitual que su compromiso es crónico, pero de vez en cuando puede ser subaguda acompañándose de fiebre, sudoración nocturna, dolor torácico, disnea, edema pretibial y otros signos de insuficiencia cardíaca derecha<sup>(32)</sup>. El examen físico muestra signos de enfermedad pericárdica, insuficiencia cardíaca derecha y el taponamiento (en alrededor del 10%)<sup>(32)</sup>. La realización de aspiración pericárdica y biopsia son los procedimientos diagnósticos de elección<sup>(32)</sup>.

La peritonitis TBC puede ir acompañada de dolor abdominal y fiebre, a veces como un cuadro de un abdomen agudo<sup>(32)</sup>. Puede haber manifestaciones insidiosas que consisten en dolor abdominal, sudoración nocturna y pérdida de peso<sup>(24)</sup>. Suele estar presente la ascitis de tipo exudado<sup>(32)</sup>. En la exploración física el abdomen ha sido descrito como "pastoso" porque se forman bucles enmarañados de intestino y estos pueden ser palpables<sup>(32)</sup>. El mejor método para el diagnóstico cuando la ascitis está presente es por vía laparoscópica con biopsia peritoneal guiada<sup>(32)</sup>. En las zonas endémicas para la tuberculosis y el VIH, el hallazgo de linfadenopatía intraabdominal en la ecografía abdominal o tomografía computarizada se utiliza a menudo para apoyar el diagnóstico de la tuberculosis abdominal<sup>(32)</sup>.

Los pacientes con TBC gastrointestinal suelen tener fiebre, dolor abdominal y sangrado gastrointestinal u obstrucción<sup>(32)</sup>. El diagnóstico se hace por sospecha clínica en áreas endémicas para la TBC y el VIH o por el hallazgo de la TBC en otros lugares<sup>(32)</sup>. La biopsia intraluminal del íleon terminal o de otros sitios implicados se utiliza para establecer el diagnóstico<sup>(32)</sup>.

En la TBC renal puede haber pocos síntomas y signos asociados, aunque en ocasiones disuria, hematuria y dolor en el costado están presentes<sup>(32)</sup>. El diagnóstico a menudo se sugiere por el hallazgo de piuria estéril o hematuria, en el examen físico no suele encontrarse ninguno hallazgo en especial<sup>(32)</sup>. La pielografía intravenosa o la tomografía muestra cicatrización cortical, en ocasiones con masa o lesiones cavitarias, necrosis papilar con cálices y dilatación ureteral<sup>(32)</sup>.

La osteomielitis vertebral se caracteriza porque el sitio inicial de la enfermedad es la región subcondral de la porción anterior del cuerpo vertebral<sup>(32)</sup>. El dorsal inferior y vértebras lumbares están involucrados con mayor frecuencia<sup>(32)</sup>. El examen físico puede mostrar paraparesia o una deformidad causada por las fracturas por compresión anterior<sup>(32)</sup>. Las radiografías de la columna vertebral, así como la tomografía y la resonancia magnética, pueden mostrar anomalías en las vértebras adyacentes con compresión anterior<sup>(32)</sup>.

Otras formas de TBC extrapulmonar como la TBC del hueso o de las articulaciones pueden manifestarse subagudamente como una combinación de la sinovitis y osteomielitis<sup>(32)</sup>. La TBC del tracto genital femenino puede dar lugar a dolor pélvico, la menorragia, flujo vaginal, o la infertilidad y los hombres pueden tener una masa de epidídimo, que a veces se observa en los pacientes con TBC miliar<sup>(33)</sup>.

## 5.6 DIAGNOSTICO

El diagnóstico de esta entidad conjuga tantos aspectos basados en la clínica del paciente, asociado a estudios microbiológicos e imágenes radiológicas<sup>(28)</sup>. La tos, aunque poca específica para el diagnóstico, tiene importancia si se aplica el concepto del sintomático respiratorio, que se define como cualquier persona con tos por más de quince días y a quien hay que hacer la búsqueda del bacilo tuberculoso en tres muestras de esputo<sup>(28)</sup>. El estudio bacteriológico es el pilar fundamental del diagnóstico de la enfermedad y el cultivo es el patrón de oro o “*Gold standard*”<sup>(28)</sup>.

La detección y tratamiento de la infección por *MBT* están indicados para los grupos en los que la prevalencia de la infección latente es alta (por ejemplo, las personas nacidas en el extranjero en las regiones en las que la tuberculosis es endémica), aquellos en los que el riesgo de que la enfermedad se reactive es alta

(por ejemplo, los pacientes con infección por VIH o diabetes y los pacientes que reciben terapia inmunosupresora), y los que tienen ambos factores<sup>(23)</sup>.

La infección latente se puede diagnosticar, ya sea con una prueba cutánea de la tuberculina o por ensayo de liberación de IFN-<sup>(23)</sup>. La prueba de la tuberculina es menos costosa y por lo tanto, se prefiere en las regiones de bajos ingresos, es tan sensible como el ensayo de liberación de IFN- pero menos específica<sup>(23)</sup>.

La prueba de tuberculina o prueba de Mantoux (PPD) se realiza inyectando 0.1 ml de un derivado protéico purificado de la tuberculina en la cara anterior del antebrazo<sup>(3)</sup>. Esta inyección se debe aplicar con una jeringa de tuberculina, colocando el bisel de la aguja hacia arriba<sup>(3)</sup>. La medición de la induración se realiza a las 48-72 horas, se considera que la prueba es positiva cuando el diámetro de la induración es  $\geq 5$  mm en personas no vacunadas, en sujetos vacunados o que han estado en contacto íntimo con pacientes tuberculosos bacilíferos, o en sujetos con lesiones compatibles con TBC en la radiografía de tórax, con bacteriología negativa y control evolutivo que descarta la enfermedad se considera que la PPD es positiva si la induración es  $\geq 5$  mm<sup>(32)</sup>. Con respecto a la Especificidad de la PPD fue menor en sujetos vacunados 56% y se mantuvo en sujetos no vacunados 98%<sup>(34)</sup>.

Dentro de las limitaciones de la PPD se tiene en cuenta que los pacientes tienen que asistir a un centro para que una persona entrenada realice la lectura de prueba y en algunos casos se encuentran imprecisiones con sesgos en la interpretación de la prueba, también se pueden encontrar falsos positivos como es el caso de personas con antecedente de vacunación con el bacilo de Calmette-Guerin (BCG)<sup>(3)</sup>.

Por otro lado el reconocimiento de que el IFN- $\gamma$  desempeña un papel crítico en la regulación de la respuesta inmune mediada por células a la infección del *MTB* llevó al desarrollo de ensayos de liberación de interferón gamma (IGRA) para la detección de la infección por *MTB*<sup>(3)</sup>. Los IGRA detectan la sensibilización al *Micobacterium* mediante la medición de la secreción del IFN- $\gamma$  desde linfocitos T de memoria en respuesta a antígenos del *MTB*<sup>(3)</sup>. En el año 2001, la prueba de QuantiFERON-TB (QFT) se convirtió en el primer IGRA aprobado por la FDA como una ayuda para el diagnóstico<sup>(3)</sup>. En 2005, el QuantiFERON-TB Gold (QFT-G) y QuantiFERON-G In Tube (QFT-GIT) se convirtieron en los segundos IGRA aprobado por la FDA como una ayuda para el diagnóstico de infección por TBC<sup>(3)</sup>.

El QFT-GIT consiste en una serie de tubos pretratados con antígenos del *M. tuberculosis* y control (mitógeno, estímulo-control positivo) que minimizan el fallo

en el tratamiento de las muestras y que contienen el antígeno TB7.7 (Rv2654), que no está presente en la cepa de la vacuna BCG. Tras 16-24 horas de incubación de las células T con los antígenos a 37 °C se mide la producción de IFN-<sup>(35)</sup>. El test es positivo cuando la concentración de IFN- en la muestra (incubada con antígenos TBC) menos la concentración de IFN- en el control negativo (valor nulo) es 0.35 UI/ml y 25% del control negativo y el control negativo 8.0 UI/ml<sup>(28)</sup>. El test resulta negativo si la concentración de IFN- en la muestra es <0.35 UI/ ml o si es 0.35 UI/ml y <25% del control negativo. Cuando el control negativo es superior a 8.0 UI/ml o el control positivo es <0.5 UI/ml, el resultado se considera indeterminado<sup>(35)</sup>. Estos pueden deberse a un recuento reducido de linfocitos en sangre o a una actividad reducida de linfocitos debido a una enfermedad subyacente (infección por VIH, cáncer o disfunción renal)<sup>(35)</sup>.

Los meta análisis han revelado una sensibilidad de los IGRA del 76% para el QFT y 90% para el T-SPOT, similar a la PPD que es de 77%<sup>(34)</sup>. El QuantiFERON (QFT-G y QFT-GIT) presentó la misma especificidad en personas vacunadas 96% y no vacunados 99%<sup>(34)</sup>.

El QFT-GIT parece ser más sensible en poblaciones con un riesgo mayor de TBC, como inmigrantes (procedentes de zonas de alta incidencia de TBC) con un 68%; personal sanitario 50% y drogodependientes 7% de los cuales son VIH positivo un 71%<sup>(34)</sup>. Además tiene un valor predictivo positivo (VPP) superior al 60% en contactos y trabajadores sanitarios 100%, mientras que se encontraron valores inferiores en sujetos VIH positivo con 22% e inmigrantes 46%<sup>(35)</sup>. El quantiferon aún no se ha evaluado en Colombia<sup>(36)</sup>.

Los meta-análisis muestran que el IFN- en el LBA, que se mide por ELISA o radioinmunoensayo cuando presenta niveles por encima de un pre-determinado de corte (variando de 1.5-300pg/ml) en los diferentes estudios es sensible en 89-96% y 96-97% específico para el diagnóstico de la TBC pleural<sup>(35)</sup>. La medición directa del IFN- en lavado broncoalveolar podría tener la ventaja de ser procesada en corto tiempo y dar un diagnóstico temprano, además de que el líquido del lavado broncoalveolar es fácil de conservar usando refrigeración, por periodos largos de tiempo<sup>(35)</sup>.

El diagnóstico de la TBC se basa en los síntomas clínicos y la microscopía de esputo<sup>(35)</sup>. El diagnóstico también se hace sobre bases clínicas, cuando las baciloscopias son negativas y la sospecha de TBC es alta<sup>(35)</sup>.

El diagnóstico clínico es particularmente importante en las personas infectadas por el VIH, debido al riesgo de una rápida progresión de la TBC si no se trata y en aquellos con formas de TBC que son paucibacilares (menígea, miliar, abdominal, pleural, pericárdico) <sup>(35)</sup>. El diagnóstico de la TBC miliar, abdominal, pleural, pericárdico puede ser confirmado por el hallazgo del bacilo en el tejido de biopsia o por el cultivo <sup>(35)</sup>.

La prueba de Bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR), baciloscopia, juega un papel importante en el temprano diagnóstico de la infección por micobacterias y es a menudo el único método de diagnóstico disponible en los países en vía de desarrollo <sup>(34)</sup>. Este método es rápido, simple, de bajo costo, se puede realizar directamente en muestras clínicas y no requiere de un laboratorio de alta tecnología <sup>(34)</sup>. Se puede detectar un mínimo de 5,000 a 10,000 bacilos por mililitro de muestra de esputo <sup>(33)</sup>. Varios estudios que utilizan microscopía para el diagnóstico de la TBC pulmonar han informado de sensibilidades variables que van desde 20% a más del 80% <sup>(33)</sup>.

Dos procedimientos son los más usados para la tinción de un extendido para la baciloscopia, el Ziehl-Neelsen con carbofúscina (ZN) y el Auramina-Rodamina <sup>(28)</sup>. El más usado es el ZN que, además de mostrar los BAAR como pequeños bastoncillos curvos tenidos de rojo sobre un fondo azul, informa también su grado de infecciosidad por el sistema de cruces recomendado por la OMS, así <sup>(28)</sup>:

(-) Ausencia de BAAR en 100 campos observados

(+) Menos de un BAAR por campo, en 100 campos observados

(++) 1-10 BAAR por campo, en 50 campos observados

(+++)+ 10 BAAR por campo, en 20 campos observados

La justificación de la baciloscopia seriada es que de aquellos pacientes que se diagnostican por baciloscopia positiva, 80% resultan positivos en la primera muestra, 15% más en la segunda y cerca del 5% adicional en la tercera, es decir que una sola muestra deja escapar casi el 20% de los enfermos que serían positivos a la baciloscopia <sup>(28)</sup>. El cultivo al identificar con certeza *MTB*, se convierte en el "Gold standard" del diagnóstico de la enfermedad tuberculosa y es la herramienta más valiosa para detectar agrupación de pacientes con la misma cepa de bacilo <sup>(28)</sup>. El medio de cultivo más usado es el OgawaKudoh; en otros países es el Lowenstein – Jensen basado en medios sólidos, pero el gran

inconveniente con ambos es que tardan de 3 a 6 semanas en detectar crecimiento micobacteriano<sup>(28)</sup>.

El cultivo tiene una sensibilidad de 85% y una especificidad de 98%, un resultado positivo asegura el diagnóstico de TBC, con un alto valor predictivo positivo<sup>(28)</sup>. Su negativización después de un tratamiento asegura la curación<sup>(28)</sup>.

En ausencia de confirmación bacteriológica, ya sea porque los cultivos son negativos o porque no están disponibles, el diagnóstico final a menudo se basa en la respuesta al tratamiento o el establecimiento de un diagnóstico alternativo<sup>(34)</sup>.

En los últimos años se han desarrollado técnicas moleculares de detección directa de micobacterias en muestras clínicas, basadas en la identificación de secuencias específicas de ADN y su amplificación mediante diferentes métodos<sup>(37)</sup>. Existen técnicas de amplificación que consisten en la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o nested-PCR de diferentes secuencias diana, como la IS6110, hsp65, MBP64 o rpoB<sup>(37)</sup>. Estas técnicas tienen una especificidad entre el 90-100% tanto en muestras respiratorias como extra-pulmonares; sin embargo, la sensibilidad es variable, y se encuentran sensibilidades bajas en muestras con baciloscopia negativa<sup>(37)</sup>.

Algunos pacientes con alteraciones radiológicas y síntomas respiratorios no logran producir muestras satisfactorias en la expectoración para efectuar las baciloscopias o el cultivo y se recurre a la fibrobroncoscopia (FBC) y el esputo inducido como una manera de obtener muestras respiratorias adecuadas, con rendimientos variables entre 12 y 38% para la FBC y 19 y 34% para el Esputo inducido<sup>(35)</sup>.

La radiografía de tórax es el primer método de aproximación diagnóstica y si es normal tiene un alto valor predictivo negativo cuando se sospecha TBC pulmonar activa, siendo la frecuencia de falsos negativos de aproximadamente 1%, sin embargo, este valor se incrementa a un 7-15% en pacientes seropositivos para VIH<sup>(37)</sup>.

Las manifestaciones radiológicas son dependientes de factores del huésped, incluyendo la exposición previa, la edad y su estado inmune; y pueden ser divididas en TBC primaria y post-primaria, siendo en determinadas oportunidades, difícil la diferenciación entre ambas<sup>(37)</sup>.

En la TBC primaria la naturaleza de las opacidades parenquimatosas puede ser tanto del espacio aéreo como del intersticio, siendo la consolidación del espacio aéreo el patrón radiológico más común, acompañado en ocasiones de excavaciones<sup>(37)</sup>. Por otro lado, el patrón intersticial más frecuente de la enfermedad primaria es la TBC miliar<sup>(37)</sup>. Otras manifestaciones incluyen: 1) Enfermedad traqueobronquial manifestada como atelectasias o hiperinsuflación secundaria, causadas por compresión extrínseca de las vías respiratorias por los ganglios linfáticos hipertróficos<sup>(35)</sup>. 2) Enfermedad pleural, manifestándose por derrame de tamaño variable, pudiendo comprometer incluso un hemitórax completo<sup>(35)</sup>. En muchos casos no se puede visualizar una anomalía parenquimatosa con las radiografías simples, pero el reconocimiento de un derrame pleural es importante con el objetivo de realizar otros estudios diagnósticos<sup>(31)</sup>. La radiografía de tórax generalmente es relegada a la búsqueda de complicaciones y proporcionar diagnósticos alternativos en los no respondedores<sup>(31)</sup>.

Otro método empleado para la detección de TBC es el Adenosíndeaminasa (ADA)<sup>(28)</sup>. La determinación de la actividad de la ADA surge en 1980 y ha demostrado ser de gran rendimiento, fácil ejecución, rápida y de bajo costo y es de gran utilidad para el diagnóstico de la TB pleural<sup>(37)</sup>. La ADA es una enzima polimórfica del catabolismo de las purinas que cataliza la desaminación de adenosina y deoxyadenosina para producir inosina y deoxyinosina, respectivamente, liberando amoníaco en el proceso<sup>(28)</sup>.

La ADA que es un marcador de actividad linfocitaria, se encuentra elevada en TB de las serosas y en la meningitis<sup>(28)</sup>. Esta enzima se distribuye ampliamente en el organismo humano, encontrándose actividad de ADA en prácticamente todos los tejidos<sup>(28)</sup>. Sin embargo, su mayor actividad se encuentra en el tejido linfoide, principalmente en los linfocitos T y varía durante la diferenciación de éstos y en la maduración de los macrófagos<sup>(28)</sup>.

De acuerdo a la Red Nacional de Bacteriología de la TBC, en pleuresías serofibrinosas, un valor de ADA  $\geq 60$ U/l tiene una sensibilidad de 84% y una especificidad de 94% para el diagnóstico de TBC<sup>(28)</sup>. En pericarditis, ascitis y meningitis el valor diagnóstico y la línea de corte para determinar positividad son controversiales<sup>(28)</sup>.

## 5.7 CRITERIOS DIAGNOSTICOS

El diagnóstico de la tuberculosis Pulmonar y Extrapulmonar es eminentemente bacteriológico <sup>(28)</sup>. El diagnóstico de confirmación de la TBC pulmonar se realiza con la detección del bacilo de Koch mediante la baciloscopia (BK) y el cultivo de Koch (CK) en muestras de expectoración <sup>(28)</sup>.

No se debe iniciar tratamiento sin haber realizado una comprobación bacteriológica de la enfermedad mediante baciloscopia o cultivo <sup>(28)</sup>. Esta baciloscopia se le realiza a todo sintomático respiratorio (paciente con síntomas respiratorios por más de 15 días) recogiendo 3 muestras <sup>(27)</sup>.

Si la primera muestra es positiva, no se hace necesario procesar las otras dos y con este criterio positivo debe iniciarse el tratamiento <sup>(28)</sup>. En caso de que las tres baciloscopias iniciales sean negativas y persista la sospecha clínica de TBC debe cultivarse la tercera muestra de esputo para cultivo de Micobacterias, por lo tanto el laboratorio debe conservar esa muestra de esputo en condiciones adecuadas para poder cultivarla <sup>(28)</sup>.

Pacientes con TBC pulmonar con baciloscopia negativa se han incrementado con el aumento de la co-infección TB/VIH <sup>(28)</sup>. Algunos pacientes con alteraciones radiológicas y síntomas respiratorios infecciosos no logran producir muestras satisfactorias de expectoración para efectuar baciloscopias y Cultivo y se recurre a la fibrobroncoscopia (FBC) y al esputo inducido (EI) como una manera de obtener muestras respiratorias adecuadas, con buen rendimiento <sup>(28)</sup>. La sensibilidad del diagnóstico por cultivo de micobacterias es de 73% para la FBC y 87% para el esputo inducido <sup>(28)</sup>. Existen evidencias que demuestran un mayor rendimiento de las muestras de lavado broncoalveolar, las que según algunos reportes pueden alcanzar hasta un 90% de los diagnósticos de TBC pulmonar confirmados con los cultivos <sup>(28)</sup>.

## 5.8 TRATAMIENTO

El tratamiento incluye una serie de medidas generales como condiciones higiénico-ambientales óptimas <sup>(38)</sup>. En los casos graves se aconseja la hospitalización durante la fase aguda de la enfermedad <sup>(38)</sup>. Y como último punto la quimioterapia antituberculosa que es el punto más importante <sup>(38)</sup>.

Los medicamentos antituberculosos de mayor utilización y clasificación según su mecanismo de acción son:

- Bactericidas: destruyen los bacilos durante la fase de multiplicación

- a. Estreptomina (S)
- b. Rifampicina (R)
- c. Isoniazida (H)
- d. Etambutol (E)
- e. Pirazinamida (Z)

- Esterilizantes: destruyen los bacilos persistentes

- a. Pirazinamida
- b. Rifampicina
- c. Isoniazida
- d. Etambutol

- Bacteriostáticos

- a. Etambutol
- b. Pirazinamida

- Quimioterápicos con capacidad de penetración en las membranas

- a. Pirazinamida
- b. Rifampicina

Se consideran fármacos de primera línea: isoniacida, rifampicina, pirazinamida, etambutol<sup>(38)</sup>

Los fármacos de segunda línea son: estreptomina, cicloserina, etionamida, ciprofloxacino, kanamicina, amikacina, tioacetazona y se utilizan en los casos de TBC resistentes o cuando los de primera línea producen efectos secundarios<sup>(26)</sup>.

Los tratamientos actuales de la infección y enfermedad tuberculosa duran un mínimo de 6 a 9 meses<sup>(38)</sup>. Estos periodos tan prolongados dificultan una

adecuada adherencia a ellos <sup>(38)</sup>. La rifampicina va a cumplir 50 años de existencia sin que haya sido superada por otros medicamentos como de elección en TB <sup>(38)</sup>.

Las personas con infección latente por *M. tuberculosis* están en mayor riesgo de presentar tuberculosis activa y requieren tratamiento preventivo <sup>(26)</sup>. El régimen recomendado es isoniazida durante 9 meses o durante más tiempo en las personas infectadas por el VIH en las zonas con una alta prevalencia de TBC <sup>(26)</sup>.

Los pacientes con TBC pulmonar se benefician de esquemas dependiendo del peso si se encuentra entre 20-30 Kg se administrará un número de 2 tabletas con combinación de isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol (HRZE) (75 mg+ 150 mg + 400 mg +274 mg) en primera fase durante 56 dosis diarias y en segunda fase combinación de isoniazida y rifampicina (150 mg+150 mg) 2 tabletas, peso entre 31-50 kg combinación de HRZE 3 tabletas diarias durante 56 dosis diarias y en segunda fase combinación de isoniazida y rifampicina 3 tabletas, y en mayores de 50 kg HRZE 4 tabletas diarias durante 56 dosis y en segunda fase combinación de isoniazida y rifampicina 4 tabletas <sup>(26)</sup>.(Tabla 2)

**Tabla 2.** Régimen recomendado para pacientes con TBC pulmonar <sup>(26)</sup>.

USO DE MEDICAMENTOS EN TABLETAS DE DOSIS FIJA COMBINADA PRIMERA Y SEGUNDA FASE		
Peso en Kilogramos (Kg)	Primera Fase 56 dosis. (Dosis diaria)	Segunda fase 56 dosis. (Tres veces por semana)
	Número de tabletas Combinación de HRZE* 75 mg + 150 mg + 400 mg + 275 mg	Número de tabletas Combinación de RH ** 150 mg + 150 mg
20 – 30	2	2
31 – 50	3	3
Mayor de 50	4	4

En los casos especiales como cuando existe insuficiencia renal se recomienda adicionar Piridoxina (10 mg/ día) y el siguiente régimen (Tabla 3) <sup>(26)</sup>.

**Tabla 3.** Esquema de tratamiento para TBC pulmonar en pacientes con insuficiencia renal<sup>(26)</sup>.

USO DE MEDICAMENTOS EN TABLETAS DE DOSIS FIJA COMBINADA PRIMERA Y SEGUNDA FASE		
Peso en Kilogramos (Kg)	Primera Fase 56 dosis diaria.	Segunda fase 98 dosis. (Tres veces por semana)
	Número de tabletas Combinación de HR + Z (75 mg + 150 mg) + 400 mg	Número de tabletas Combinación de RH 150 mg + 150 mg
20 – 30	2	2
31 – 50	3	3
Mayor de 50	4	4

En los casos en los que se presentan pacientes con diabetes mellitus en los cuales los medicamentos tienen interacción farmacológica se recomienda además de agregar Piridoxina (10 mg/ día) el siguientes esquema de tratamiento <sup>(26)</sup>:

**Tabla 4.** Esquema de tratamiento para pacientes con TBC y diabetes Mellitus.

USO DE MEDICAMENTOS EN TABLETAS DE DOSIS FIJA COMBINADA PRIMERA Y SEGUNDA FASE		
Peso en Kilogramos (Kg)	Primera Fase 56 dosis. (Toma diaria)	Segunda fase 98 dosis. (Tres veces por semana)
	Número de tabletas Combinación de HRZE 75 mg + 150 mg + 400 mg + 275 mg	Número de tabletas Combinación de RH 150 mg + 150 mg

20 – 30	2	2
31 – 50	3	3
Mayor de 50	4	4

Las directrices actuales recomiendan que todas las personas infectadas con el VIH con resultados positivos o desconocidos en la prueba de la tuberculina y sin tuberculosis activa que estén viviendo en países pobres o endémicos para TB reciban terapia preventiva con isoniazida durante al menos 6 meses<sup>(23)</sup>. Tres regímenes son eficaces para la prevención de la tuberculosis activa en personas infectadas por el VIH: la isoniazida diariamente durante 6 a 9 meses, rifampicina y la isoniazida diariamente durante 3 meses y la rifampicina y la isoniazida dos veces por semana durante 3 meses<sup>(23)</sup>. Los regímenes que contienen rifampicina tienen mayores tasas de toxicidad comparados con otros medicamentos<sup>(23)</sup>.

La dificultad de diagnosticar la tuberculosis activa en pacientes con co-infección por el VIH hace que se inicie generalmente el esquema de tratamiento partiendo de la sospecha clínica mientras se obtiene el cultivo<sup>(23)</sup> (Tabla 5).

**Tabla 5.** Esquema de tratamiento anti-TBC en paciente con coinfección VIH.

USO DE MEDICAMENTOS EN TABLETAS DE DOSIS FIJA COMBINADA PRIMERA Y SEGUNDA FASE		
Peso en Kilogramos (Kg)	Primera Fase 56 dosis. (Toma diaria)	Segunda fase 98 dosis. (Tres veces por semana)
	Número de tabletas Combinación de HRZE 75 mg + 150 mg + 400 mg + 275 mg	Número de tabletas Combinación de RH 150 mg + 150 mg
20 – 30	2	2
31 – 50	3	3
Mayor de 50	4	4

O también se puede usar este régimen alternativo (tabla 6)

**Tabla 6.** Régimen alternativo para tratamiento anti- TBC en paciente con VIH.

USO DE MEDICAMENTOS EN TABLETAS DE DOSIS FIJA COMBINADA PRIMERA Y SEGUNDA FASE			
Peso en Kilogramos (Kg)	Primera Fase 56 dosis. (Toma diaria)	Segunda fase 168 dosis. (Toma diaria)	
	Número de tabletas Combinación de HRZE 75 mg +150 mg + 400 mg + 275 mg	Número de tabletas en presentación que tenga la combinación de: RH 150 mg + 150 mg	Número de tabletas en presentación que tenga la combinación de: RH 150 mg + 75 mg
20 – 30	2	2	No utilizar esta presentación
31 – 50	3	No utilizar esta presentación	3
Mayor de 50	4	No utilizar esta presentación	4

En casos en los que existe antecedentes de hepatitis y el paciente está asintomático, puede seleccionarse un esquema de HRSE con duración de seis meses<sup>(26)</sup>. Otro régimen consiste en administrar HSE en la fase inicial, seguido de HE en la segunda fase con duración de doce meses<sup>(26)</sup>. Un esquema con HRE por dos meses, seguido de HR por siete meses para un total de nueve meses con controles de función hepática periódicos<sup>(26)</sup>

Los medicamentos de primera línea, isoniacida, pirazinamida y rifampicina pueden causar daño al hígado (hepatitis inducida por medicamentos)<sup>(26)</sup>. Además, la rifampicina puede causar ictericia asintomática, sin evidencia de hepatitis<sup>(26)</sup>. Es importante tratar de descartar otras causas posibles antes de decidir que la hepatitis es inducida por el régimen de TBC<sup>(26)</sup>.

El manejo de la hepatitis inducida por el tratamiento de la TBC depende de<sup>(26)</sup>:

- Si el paciente se encuentra en la fase intensiva o en continuación del tratamiento de la tuberculosis;
- La gravedad de la enfermedad del hígado;
- La gravedad de la tuberculosis y
- La capacidad del servicio de salud para manejar los efectos secundarios del tratamiento de la tuberculosis.

Si se piensa que la enfermedad hepática es causada por los fármacos antituberculosos, todos los fármacos deberán ser detenidos<sup>(26)</sup>. Si el paciente está gravemente enfermo de tuberculosis y se considera peligroso como para detener el tratamiento, el médico deberá formular un régimen no hepatotóxico que consiste en la estreptomina, etambutol y una fluoroquinolona<sup>(26)</sup>.

Si el tratamiento de la TBC se ha detenido, es necesario esperar a las pruebas de función hepática para revertir los síntomas normales y clínicos (náuseas, dolor abdominal), antes de la reintroducción al tratamiento antituberculoso<sup>(26)</sup>. Si no es posible realizar pruebas de función hepática, es aconsejable esperar 2 semanas después de la resolución de la ictericia y el dolor abdominal antes de reiniciar el tratamiento de la tuberculosis<sup>(26)</sup>. Si los signos y síntomas no se resuelven y la enfermedad hepática es severa, el régimen no hepatotóxico que consiste en un aminoglucosido, etambutol y una fluoroquinolona se debe iniciar (o continuar) para un total de 18-24 meses<sup>(26)</sup>.

Los regímenes alternativos dependerán de que fármaco esté implicado como la causa de la hepatitis. Si la rifampicina está implicada, un régimen sin rifampicina

sugerido es de 12 meses <sup>(22)</sup>. Una primera fase de 2 meses usando isoniacida, etambutol y estreptomina seguidas de 10 meses de isoniacida y etambutol <sup>(26)</sup>.

Si la isoniacida no se puede utilizar, se debe considerar dar 6 a 9 meses de rifampicina, pirazinamida y etambutol <sup>(26)</sup>. Y en caso de que la pirazinamida sea interrumpida antes de que el paciente haya completado la fase intensiva, la duración total del tratamiento con isoniacida y rifampicina puede extenderse a 9 meses <sup>(26)</sup>.

Si isoniacida ni rifampicina pueden ser utilizados, el régimen no hepatotóxico que consiste en la estreptomina, etambutol y una fluoroquinolona debe ser continuado por un total de 18-24 meses <sup>(26)</sup>. La reintroducción de un medicamento a la vez es el enfoque óptimo, sobre todo si la hepatitis del paciente es grave <sup>(26)</sup>.

Si la clínica y las pruebas hepáticas mejoran de forma importante se puede reintroducir la misma pauta, con rifampicina en dosis progresivas para evitar fenómenos de hipersensibilidad y toxicidad renal <sup>(26)</sup>.

En algunas guías se aconseja reintroducir cada fármaco de forma secuencial en el siguiente orden: isoniazida, rifampicina y pirazinamida, con dosis progresivas para cada uno de ellos hasta alcanzar la dosis plena de cada fármaco en 2-3 días <sup>(26)</sup>. Se recomienda reintroducir la rifampicina de forma progresiva, comenzando por 150 mg el primer día, 300 mg el segundo día, 450 mg el tercer día y dosis plena al cuarto día <sup>(22)</sup>. La isoniacida y pirazinamida se inician a dosis plenas desde el primer día, simultáneamente con la primera dosis de rifampicina <sup>(25)</sup>.

Hay pacientes que toleran la reintroducción sin volver a alterarse la función hepática y pueden completar el tratamiento con la pauta inicial, pero si se vuelven a producir las alteraciones de las pruebas hepáticas habrá que suspender todo otra vez <sup>(26)</sup>.

Los medicamentos del tratamiento anti-TB tienen ciertas precauciones como la isoniazida que puede producir polineuritis debida a deficiencia de vitamina B6 que produce y hepatitis que se potencia con la rifampicina <sup>(26)</sup>. La rifampicina además puede producir reacciones de hipersensibilidad <sup>(26)</sup>. La estreptomina es nefrotóxica y ototóxica, por lo que se debe realizar periódicamente a los pacientes pruebas de función renal. La pirazinamida puede producir ictericia e hiperuricemia y el etambutol puede dar neuritis óptica <sup>(26)</sup>.

Una característica importante a tener en cuenta en la infección por *MTB*. es su capacidad para generar resistencias bacteriana<sup>(38)</sup>. Los medicamentos antituberculosos corrientes se han venido usando por décadas y la resistencia a ellos se ha propagado<sup>(26)</sup>. En todos los países estudiados se ha comprobado la existencia de cepas del bacilo que presentan resistencia a por lo menos un medicamento antituberculoso<sup>(26)</sup>.

Se conoce como TBC multirresistente a la causada por una cepa que no responde al tratamiento por lo menos con isoniazida y rifampicina, los dos medicamentos antituberculosos de primera línea (estándar) más eficaces<sup>(26)</sup>. El origen de esta forma de la enfermedad está en el tratamiento incorrecto<sup>(35)</sup>. En efecto, el tratamiento inapropiado con estos medicamentos, o el empleo de medicamentos de mala calidad, puede causar farmacoresistencia<sup>(35)</sup>.

La enfermedad causada por bacilos resistentes no responde al tratamiento corriente de primera línea<sup>(26)</sup>. No obstante, la forma multirresistente se puede tratar y curar con medicamentos de segunda línea<sup>(26)</sup>. Aun así, hay pocas opciones y, además, los medicamentos recomendados no siempre se consiguen, el tratamiento prolongado necesario (hasta dos años de tratamiento) es más caro y puede producir reacciones adversas graves<sup>(26)</sup>.

## 5.9 PRONÓSTICO

La tuberculosis pulmonar puede causar daño permanente a los pulmones si no se trata oportunamente<sup>(26)</sup>. Los medicamentos usados para tratar la tuberculosis pueden causar efectos secundarios como<sup>(26)</sup>:

- Alteración visual
- Alteración del perfil hepático con ictericia
- Rash
- Alteraciones en la diuresis.
- Neuropatías
- Ototoxicidad

Otros factores de riesgo que empeoran el pronóstico incluyen fumar más de 20 cigarrillos al día, (aumenta el riesgo de tuberculosis de 2 a 4 veces)<sup>(26)</sup>. La Diabetes también empeora el pronóstico y el resultado de la tuberculosis. Las otras enfermedades que empeoran el pronóstico incluyen<sup>(26)</sup>:

- Linfoma de Hodgkin
- Enfermedad renal crónica avanzada (terapia dialítica)
- Enfermedad pulmonar crónica
- Desnutrición
- Alcoholismo

Generalmente los síntomas respiratorios y constitucionales a menudo mejoran luego de 2 a 3 semanas después de comenzar el tratamiento<sup>(23)</sup>. La radiografía de tórax no mostrará este mejoramiento hasta semanas o meses más tarde<sup>(23)</sup>. El pronóstico es excelente si la tuberculosis pulmonar se diagnostica a tiempo y el tratamiento eficaz se inicia rápidamente<sup>(23)</sup>.

## 5.10 PREVENCIÓN

La TBC es una enfermedad que se puede prevenir, incluso en aquellos que han estado expuestos a una persona infectada<sup>(23)</sup>. La prueba cutánea de tuberculina se emplea en las poblaciones de alto riesgo o en personas que pueden haber estado expuestas a esta enfermedad, como los trabajadores de la salud<sup>(26)</sup>. A las personas que han estado expuestas a la TBC se les deben hacer pruebas cutáneas inmediatamente y un examen de control en una fecha posterior si la primera prueba es negativa<sup>(23)</sup>. El tratamiento oportuno es sumamente importante para controlar la propagación de la TBC desde aquellos que tengan la enfermedad de tuberculosis activa hacia aquellos que nunca han estado infectados con esta enfermedad<sup>(23)</sup>.

Algunos países con una alta incidencia de TBC tienen dentro de su plan de vacunación la aplicación de la vacuna BCG, que ha sido ampliamente utilizada desde 1921, ha contribuido de forma limitada al control de la enfermedad. Sin embargo, la efectividad de esta vacuna es limitada y no se usa de manera rutinaria en los Estados Unidos<sup>(26)</sup>.

Existen estrategias para el control como “La estrategia Alto a la TBC” de la OMS, cuya aplicación se recomienda en todos los países y a todos los asociados, está dirigida a disminuir la frecuencia de la tuberculosis mediante medidas de orden público y privado en los ámbitos nacional y local; por ejemplo<sup>(26)</sup>:

1. Impulsar la ampliación y el mejoramiento de la estrategia DOTS de gran calidad, que incluye cinco puntos, a saber:
2. Lograr el apoyo político, con una financiación suficiente y perdurable;
3. Efectuar la detección y el diagnóstico tempranos con ayuda de medios bacteriológicos con garantía de calidad;
4. Proporcionar tratamiento estandarizado con supervisión y apoyo del paciente;
5. Mantener un suministro constante de medicamentos y gestionarlos correctamente;
6. Seguir de cerca y evaluar el desempeño y los efectos logrados.
7. Ocuparse de la infección mixta por el VIH y el bacilo de la tuberculosis, y atender las necesidades de los grupos pobres y vulnerables;
8. Contribuir a fortalecer los sistemas de salud que se basan en la atención primaria de salud;
9. Involucrar a todos los prestadores de servicios asistenciales;
10. Procurar que los enfermos tuberculosos y las comunidades adquieran de decisión mediante las alianzas;
11. Propiciar y promover las investigaciones<sup>(26)</sup>.

## **6. METODOLÓGIA**

### **6.1 DISEÑO DE ESTUDIO**

Este es un estudio de pruebas diagnósticas (se trata de establecer la capacidad diagnóstica de TNF- e IFN-, IL-6 en pacientes con TBC activa) observacional (se observa sin realizar intervenciones en los resultados de las pruebas), transversal (cada prueba se realiza en una ocasión en cada paciente) y prospectivo (mediciones planificadas de forma prospectiva)

El Hospital Universitario de Neiva, ubicado en la Calle 9ª. Cra 15 en la ciudad de Neiva, Departamento del Huila, en el periodo comprendido desde el 1 de marzo 2014 al 31 de Mayo del 2015 (15 meses en total),

### **6.2 POBLACIÓN**

Pacientes adultos hospitalizados y ambulatorios con sospecha diagnóstica de TBC con baciloscopia seriada negativa, en quien su médico tratante solicitó fibrobroncoscopia para estudio microbiológico del lavado broncoalveolar. Un segundo grupo será de pacientes adultos con indicación de fibrobroncoscopia por causa diferente a sospecha de TBC.

### **6.3 SUJETOS Y MUESTRA**

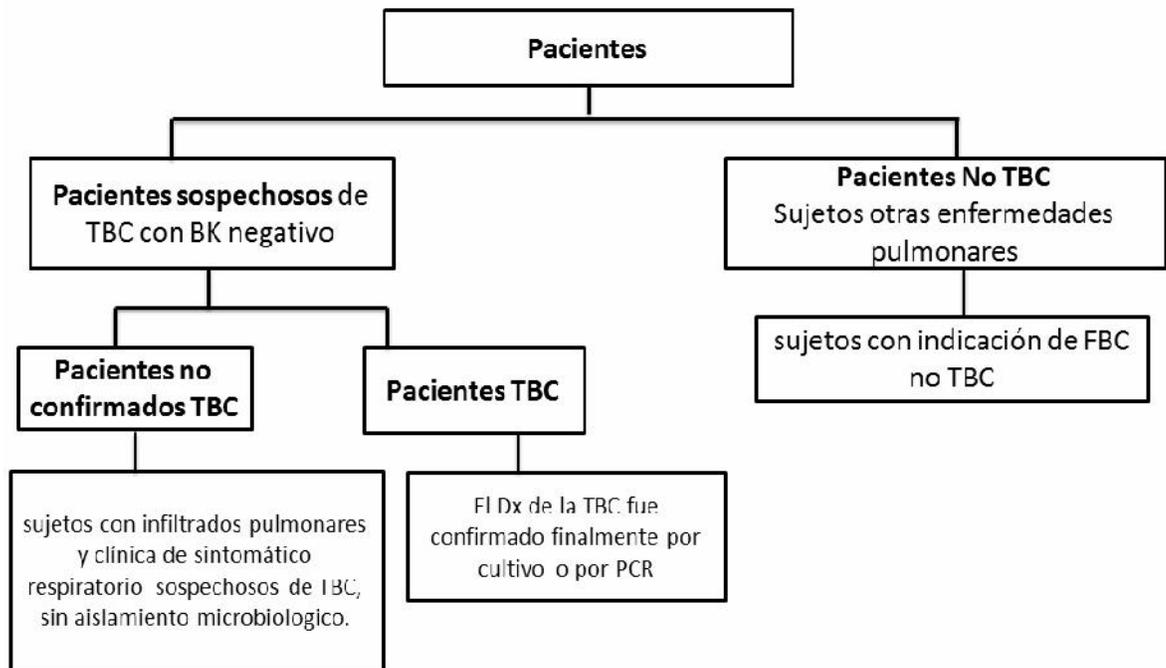
En este estudio se incluyeron los pacientes adultos en quienes se sospechó TBC pulmonar con Baciloscopia seriada negativa, que llegaron al servicio de

neumología del Hospital Universitario de Neiva con orden de fibrobroncoscopia (FBC) solicitada por sumédico tratante. Como controles se incluyeron 17 pacientes con indicación de FBC por enfermedad pulmonar diferente a TBC (neoplasias, neumonías, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad intersticial). Todos los voluntarios incluidos firmaron consentimiento informado previo ingreso al estudio y posteriormente se diligenció una ficha de recolección de datos con información clínica y epidemiológica de importancia para el estudio (anexo 1 y 2). De anotar, ningún procedimiento adicional al que amerita el paciente por su indicación médica es realizado.

De los pacientes del grupo sospechoso de TBC (n= 32) se consideraron como casos confirmados, los que presentaron en el líquido del lavado broncoalveolar, aislamiento microbiológico positivo por cultivo para *M. tuberculosis* y/o PCR cuantitativa positiva para *M. tuberculosis*.

Inicialmente se planteó en el estudio tomar 70 pacientes con sospecha de TBC pulmonar y 35 pacientes no TBC. Pero para el cálculo de la muestra se tomaron en cuenta las características específicas del diseño de el estudio y una aproximación muy general estima que un tamaño debe ser suficiente cuando hay mínimo 10 individuos en cada casilla marginal de la tabla 2 x 2, aunque además se calculó teniendo en cuenta un porcentaje de error del 5% y un nivel de confianza de 95%<sup>(39)</sup> Por lo que el tamaño calculado de la muestra es de 285 pacientes.

**Grafica 1.** Diseño del estudio.



#### 6.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN EN PACIENTES DE GRUPO SOSPECHA DE TBC

- Paciente adulto que llegue al servicio de neumología del Hospital Universitario de Neiva con orden de fibrobroncoscopia solicitada por el médico tratante.
- Paciente sintomático respiratorio (tos de más de 15 días), con síntomas constitucionales dados por hiporexia, sudoración, pérdida de peso.
- Baciloscopias negativas
- Pacientes mayores de 15 años.
- Pacientes con sospecha de primo infección tuberculosa que cumplan con el criterio de solicitud de fibrobroncoscopia indicado previamente

#### 6.5 CRITERIOS DE INCLUSIÓN EN PACIENTES DE GRUPO NO TUBERCULOSIS

- Paciente que llegue al servicio de neumología del Hospital Universitario de Neiva con orden de fibrobroncoscopia solicitada por el médico tratante
- Presentar enfermedad pulmonar no TBC (Enfermedad pulmonar obstructiva crónica, Neoplasia, Enfermedad intersticial pulmonar, neumonía)
- Pacientes mayores de 15 años.

#### **6.6 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DE GRUPO SOSPECHA TBC**

- La no obtención del consentimiento informado por escrito.
- Tener arritmias en el momento del procedimiento
- Angina inestable
- Coagulopatía no corregida o recuentos plaquetarios inferiores a 50.000
- Hipoxia durante el procedimiento
- Cuello inestable
- Anquilosis severa de columna cervical
- Estado cardiovascular inestable
- Pacientes con enfermedades autoinmunes (lupus eritematoso sistémico, espondiloartropatías, artritis reumatoidea, sarcoidosis)

#### **6.7 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DE GRUPO NO TUBERCULOSIS**

- La no obtención del consentimiento informado por escrito.
- Tener arritmias en el momento del procedimiento
- Angina inestable
- Coagulopatía no corregida o recuentos plaquetarios inferiores a 50.000

- Hipoxia durante el procedimiento
- Cuello inestable
- Anquilosis severa de columna cervical
- Estado cardiovascular inestable
- Pacientes con tuberculosis activa.
- Pacientes con enfermedades autoinmunes (lupus eritematoso sistémico, espondiloartropatias, artritis reumatoidea, sarcoidosis)

## 6.8 PROCESO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Como se mencionó antes, para la recolección de datos del presente estudio en el Hospital Universitario de Neiva durante el periodo comprendido entre Marzo de 2014 hasta el 31 de Mayo de 2015, todo paciente quien fuera sintomático respiratorio en quien se sospeche TBC pulmonar con baciloscopia negativa, que llegue al servicio de neumología del Hospital Universitario de Neiva con orden de fibrobroncoscopia solicitada por el médico tratante. Como controles se incluirán pacientes con indicación de fibrobroncoscopia por enfermedad pulmonar no TBC. Todos los voluntarios incluidos firman consentimiento informado previo ingreso al estudio y posteriormente se diligencia una ficha de recolección de datos que contiene información clínica y epidemiológica de importancia para el estudio (anexo 1).

La fibrobroncoscopia y lavado broncoalveolar lo realiza un neumólogo entrenado quien hace parte del estudio, empleando un equipo flexible, disponible en el servicio de Neumología del Hospital Universitario de Neiva.

Para el lavado se usaron 80cm de solución salina normal y el líquido recolectado fue enviado a laboratorio clínico y patológico institucional para la realización de las PCR para micobacterias, coloraciones especiales BK y cultivo. Un volumen de 20mL, fue transportado al Laboratorio de Infección e Inmunidad de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana, en donde la muestra codificada fue filtrada, centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos (454 xg) y de estas muestras alicuotadas pasaron a ser almacenadas a -70 °C. El sobrenadante obtenido fue utilizado para la detección de TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 analizadas por ELISA (estuches comerciales para la detección de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 (DuoSet, RyD, Cats: DY285, DY210 y DY206, respectivamente) y CytometricBeadArray (CBA) (Human Th1/Th2 Cytokines Kit [BD, Cat: 551809])

Adicionalmente, se hizo seguimiento médico posterior a la realización de la fibrobroncoscopia de forma mensual hasta los 3 meses posteriores, tiempo en el que se obtiene el reporte del cultivo del LBA.

## 6.9 VARIABLES

<b>CUALITATIVAS</b>	<b>CUANTITATIVAS</b>
Genero	Edad – Unidad de medida en años.
Antecedentes epidemiológico (de contacto con personas con TBC, antecedente de vacunación con BCG, antecedente de aplicación de prueba de tuberculina)	Peso -Unidad de medida en kilogramos.
Comorbilidades (Hipertension arterial, Diabetes Mellitus, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad renal crónica, enfermedad hematológica grave, antecedente de trasplante renal , enfermedad autoinmune, enfermedad cardiovascular grave)	Indice de masa coporal (IMC) – unidad de medida en kilogramas por metro cuadrado.
Anamnesis (sudoración, hiporexia, fiebre, tos, disnea, perdida de peso, hemoptisis)	Los niveles de TNF- e IFN- e IL-6.
Seguimiento	Antecedente de vacunación BCG en tiempo.
Tratamientos	Duración de sintomatología (días-meses).

## 6.10 ANALISIS ESTADISTICO

En el presente estudio, se tomaron variables cualitativas y cuantitativas en las que se empleó estadística descriptiva. Para las variables cuantitativas como edad se realizaron medianas y rangos. Además, se realizó categorización de esta variable por grupo étnico y se realizó estadísticas por frecuencias. Para el análisis

de las variables cualitativas se empleó proporciones, análisis bivariado como edad y género.

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPadPrism 5.0. La prueba de Shapiro-Wilk se empleó para contrastar la normalidad en la distribución de la población, así que pruebas estadísticas no paramétricas fueron elegidas para los análisis bivariados. Los resultados individuales serán mostrados en forma de mediana y rangos. Para el análisis de los tres grupos independientes se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Para hallar el grado de correlación entre dos variables se empleó el coeficiente de correlación de Spearman. Para el análisis de frecuencias se usó el test exacto de Fischer. Para determinar la sensibilidad y especificidad de los niveles de las citosinas para el diagnóstico de TBC, se generaron curvas ROC con diferentes puntos de cohorte, seleccionándose aquella que tuviera mayor área bajo la curva y el valor de P más bajo.

En todos los casos se tomará como significativo un valor de  $P < 0.05$ .

## **6.11 CONSIDERACIONES ÉTICAS**

De acuerdo con los principios establecidos en la Resolución 008430 de Octubre 4 de 1993, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, este estudio se desarrollará conforme a los siguientes criterios:

- Explicar brevemente los principios éticos que justifican la investigación de acuerdo a una normatividad a nivel internacional y a nivel nacional.
- Revelar que el conocimiento que se pretende producir no puede obtenerse por otro medio idóneo (fórmulas matemáticas, investigación en animales)
- Expresar claramente los riesgos y las garantías de seguridad que se brindan a los participantes
- Contar con el Consentimiento Informado y por escrito del paciente de la investigación o su representante legal.

- Establecer que la investigación se llevará a cabo cuando se obtenga la autorización del representante legal de la institución en donde se realice la investigación; el consentimiento informado de los participantes y la aprobación del proyecto por parte del comité de ética.

Es de aclarar que la decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria. Los investigadores cumplirán con la confidencialidad de los datos que obtengan, la información que se recoja se utilizaran solamente para este estudio. Todos los participantes firmarán un consentimiento informado que será plenamente explicado a los participantes. La participación o retiro del estudio es completamente voluntaria.

## **6.12 ENTIDADES PARTICIPANTES**

- Universidad Surcolombiana– Facultad de Salud
- Hospital Universitario de Neiva

## **6.13 RECURSOS**

**6.13.1 Recursos humanos.** En este estudio participaron un Médico Internista formado en Neumología. Además, un Médico con estudios de Doctorado en inmunología, dos residentes de Medicina Interna quienes están en tercer año de su residencia y un Médico Interno.

**6.13.2 Recursos financieros.** Los reactivos que se usarán en la propuesta actual, son provistos por el Laboratorio de Infección & Inmunidad de la Universidad Surcolombiana, que fueron obtenidos como donación de colaboradores internacionales. No habrá gastos en efectivo o especies asignados a personal.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 OPTIMIZACION DEL METODO DE DETECCION DE CITOCINAS EN LBA

Para la medición de citoquinas en LBA se empleó un estuche comercial de CBA, cuyo uso se ha extendido a diversos tipos de muestras como plasma, suero y sobrenadante de cultivo celular. Sin embargo, ya que hasta el momento en LBA no han sido determinados los niveles de citoquinas a través de éste ensayo y para empezar a comparar su confiabilidad en comparación con el ELISA, se llevó a cabo su optimización para la detección confiable de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IFN- $\gamma$  en éste tipo de muestra por los dos métodos.

Para ello, concentraciones conocidas de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IFN- $\gamma$  humanos recombinantes fueron añadidos a medio de cultivo celular (RPMI 1640, Gibco), una solución buffer estéril homóloga a la empleada para el lavado broncoalveolar y fueron analizadas por CBA, para determinar el porcentaje de recuperación (concentración de citoquina encontrada /concentración de citoquina esperada) x 100.

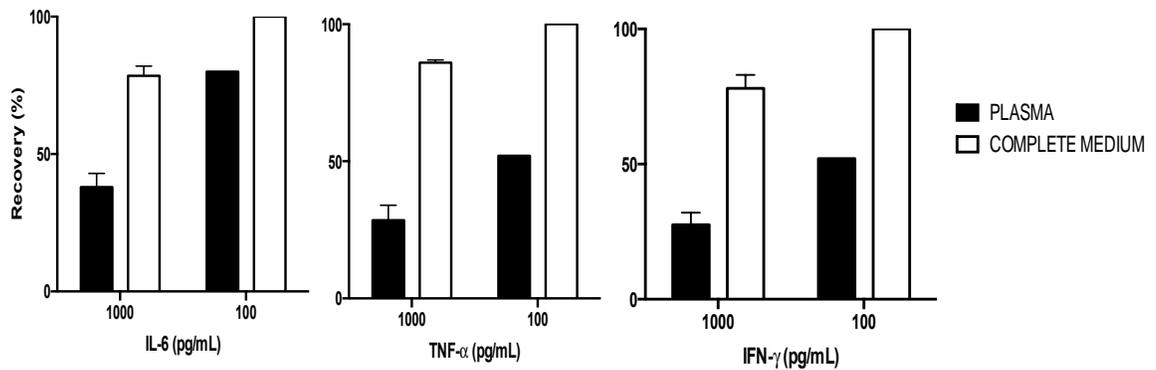
Éste análisis fue realizado además en plasma de voluntario sano para comparar el porcentaje de recuperación según el tipo de muestra. Como se muestra en la figura 1A, luego de la adición de 1,000 y 100 pg/mL de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IFN- $\gamma$  humanos recombinantes a los dos tipos de muestras, los porcentajes de recuperación obtenidos fueron del 86 y 100%, 78 y 100% y 78 y 100% en medio de cultivo y 28.5 y 52%, 38 y 80% y 27.5 y 52% en plasma, respectivamente. Éstos resultados demuestran una eficiente detección de las citoquinas en soluciones similares a las empleadas en el lavado broncoalveolar que fue mucho mejor que en plasma. Por lo tanto el uso del CBA para la medición de citoquinas puede ser extendido de forma segura a LBA.

Para confirmar los resultados obtenidos por CBA, los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6 en LBA de pacientes con sospecha de TBC y controles fueron analizados además con estuches comerciales de Elisa, ensayo ampliamente utilizado para la medición de estas citoquinas en LBA y se estableció una correlación entre los niveles encontrados por los dos ensayos. Como se observa en la Figura 1B, hubo una fuerte correlación entre los niveles de ambas citoquinas encontrados por CBA y Elisa ( $r=0.72$  y  $0.81$ , para TNF- $\alpha$  e IL-6, respectivamente;  $P<0.0001$ ), lo que demuestra la confiabilidad de los resultados obtenidos por ELISA. En resumen, los ensayos aquí empleados para la medición de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IFN- $\gamma$  en LBA

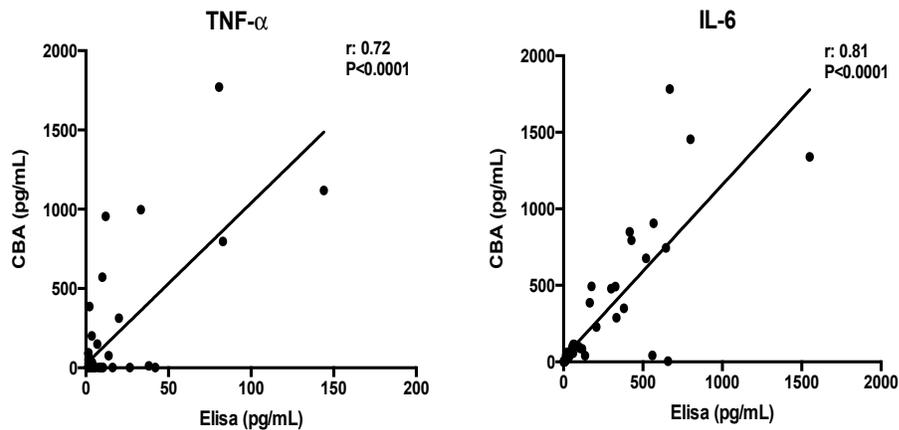
demonstraron su eficiencia y soportan la confiabilidad de los resultados de éste estudio.

**Grafica 2.** Optimización de los ensayos para la detección de las citoquinas en LBA.

A.



B.



A. Porcentaje de recuperación de IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  humanos recombinantes luego de la adición de 1000 y 100 pg/mL de cada una de ellos a muestras de plasma y medio de cultivo (n=2). Las muestras fueron analizadas usando estuches comerciales de CBA. B. Correlación entre los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6 en BAL de pacientes con sospecha de TBC pulmonar y controles, determinados por CBA y

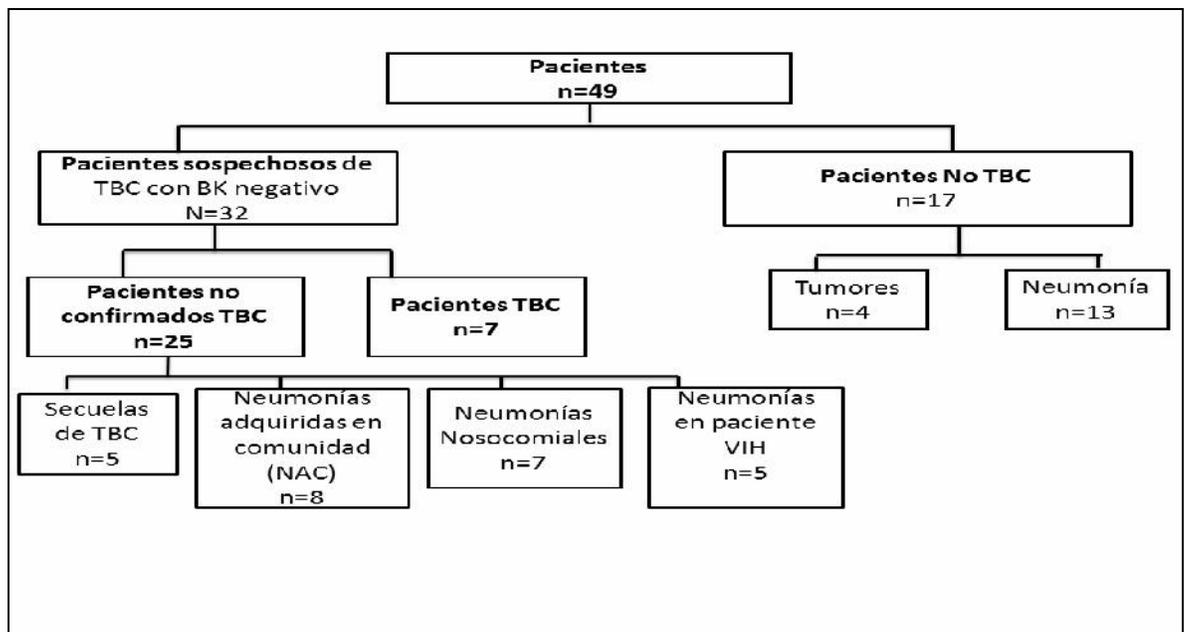
Elisa. En el extremo superior derecho se muestra el grado de correlación.  $r =$  Coeficiente de determinación de Pearson.

## 7.2 CARACTERISTICAS SOCIO EPIDEMIOLOGICAS DE LOS PACIENTES

Entre el lapso de 8 meses, en el Hospital Universitario de Neiva fueron ordenadas (por médicos tratantes) 32 fibrobronoscopias y lavados broncoalveolares en pacientes con alta sospecha de TBC pulmonar con baciloscopias negativas y 17 pacientes con patologías pulmonares no TBC. De estos pacientes sospechosos de TBC, 7 pacientes tenían confirmación microbiológica (por cultivo o PCR) por lo que se dejaron como TBC confirmados y 25 pacientes no confirmados TBC, que durante el seguimiento se estableció que tenían secuelas de TBC (n=5), neumonía adquirida en comunidad (n=8), neumonía nosocomial (n=7) y neumonía en paciente con VIH (n=5) en donde en 4 casos se estableció que era por *Pneumocystis jirovecii*, 1 por gérmenes gram positivos (imagen 2).

Los pacientes no TBC (con otras patologías pulmonares diferentes a TBC) fueron diagnosticadas como NAC (13 pacientes) y tumores con 4 pacientes. De éstos últimos se encontraron 2 cancer broncogénicos, un cáncer de cérvix y 1 tumor carcinoide como se muestra en la imagen 2.

**Gráfica 3.** Distribución de pacientes.



Cuando la frecuencia y porcentaje de las variables fueron analizadas en los 3 grupos (No TBC, sospechosos de TBC y TBC confirmada), no hubo diferencia entre ellos, excepto en el antecedente de tumores (Tabla 1).

El 71% de los casos del grupo de pacientes con TBC confirmada pertenecen al género masculino y 29% al femenino. (Tabla 1). En los tres grupos de pacientes se encontraron en mayor porcentaje el género masculino, con una edad media de 53 años (rango: 24-86) en el grupo de sospechosos de TBC, 42 años (rango: 17-88) de mediana de edad en los pacientes no TBC y 34 años (rango: 22-67) en pacientes TBC confirmados.

La mediana de peso fue 60 kg tanto en el grupo TBC como en los pacientes sospechosos y 58 kg en los pacientes no TBC ( $p > 0.06$ ). La mediana del índice de masa corporal en el grupo no TBC y TBC confirmado fue de 24 y 29 respectivamente, que es un peso normal pero el grupo de sospechosos era de 26 encontrándose en la clasificación del estado nutricional en rango de sobrepeso.

**Tabla 7.** Características clínicas de los pacientes.

Parámetros	Sospechosos TBC n=25	No TBC n= 17	TBC confirmados n=7	P value
Edad, mediana (rango)	53(24-86)	42 (17-88)	34(22-67)	>0.05*
Peso, mediana (rango)	60(40-83)	58 (23-82)	60(46-75)	>0.06*
IMC, mediana (rango)	26(14-28)	24 (15-32)	19(17-27)	0.8*
<b>Sexo</b>				
Femenino, n (%)	8(32)	6(35)	2(29)	0.97**
Masculino, n (%)	17(68)	11(65)	5(71)	0.99**
<b>Signos y síntomas</b>				
Sudoración, n (%)	5(20)	5(29)	2(29)	0.82**
Hiporexia, n(%)	3(12)	6(35)	2(29)	0.35**
Fiebre, n (%)	17(68)	7(41)	5(71)	0.6
Tos, n (%)	23(92)	12(71)	7(100)	0.8**
Hemoptisis, n (%)	4(16)	5(29)	4(57)	0.26**
Pérdida de peso, n(%)	13(52)	8(47)	4(57)	1**
Disnea, n(%)	13(52)	11(65)	4(57)	0.9**
<b>Antecedentes</b>				
De Tuberculosis, n(%)	5(20)	0 (0)	0 (0)	0.38**

De Contacto TBC, n(%)	0(0)	0(0)	0 (0)	1**
De BCG, n (%)	4(16)	3(18)	2(29)	0.7**
De PPD, n(%)	2(8)	1(6)	0 (0)	0.99**
HTA, n(%)	9(36)	2(12)	1(14)	0.44**
DM Tipo 2, n(%)	7(28)	0 (0)	1(14)	0.09**
EPOC, n(%)	0(0)	3(18)	0 (0)	0.09**
Enf. Hematológica, n(%)	2(8)	1(6)	0 (0)	0.99**
Enf. Renal Crónica, n(%)	8(32)	2(12)	1(14)	0.51**
Enf. Coronaria, n (%)	3(12)	2(12)	0 (0)	0.99**
Trasplante renal, n(%)	3(12)	0 (0)	0 (0)	0.38**
Tumores	0(0)	4(24)	0 (0)	0.04**
VIH positivo, n(%)	5(20)	0 (0)	2(11)	0.11**

\*Prueba de Kruskal-Wallis; \*\*Prueba de Fisher

En la Tabla 1 se muestra además que aunque sin diferencia significativa, la tos, fue un frecuente síntoma en los tres grupos con 94% en el grupo de sospechosos de TBC, 71% en no TBC y 100% en TBC, de los 7 pacientes del grupo TBC todos presentaron tos. Dentro de la anamnesis también se describió fiebre con 71% en el grupo TBC, 68% en sospechosos de TBC y 41% en no TBC.

El antecedente de mayor porcentaje en pacientes sospechosos de TBC fue HTA (36%) seguido por enfermedad renal crónica (32%) y en los pacientes no TBC fue tumores (24 %). 7 pacientes con diagnóstico de VIH (+) fueron encontrados en el estudio, de estos 5 casos (20%) en el grupo de sospechosos TBC y 2 (11%) en los pacientes confirmados de TBC, el grupo de no TBC no tenían ningún paciente con este diagnóstico.

De los 49 pacientes evaluados en el estudio, ninguno tenía antecedente de contacto con personas con diagnósticos de tuberculosis activa, 5 casos del grupo sospechoso de TBC referían haber tenido TBC, de los cuales 3 pacientes tenían antecedente de haber sido tratados para TBC pulmonar con un lapso de 15, 7 y 2 años en cambio en el grupo no TBC este hallazgo no se encontró. En el grupo de sospechosos TBC, 2 pacientes tenían el antecedente de la realización de la prueba de tuberculina con lectura negativa, 3 y 2 años antes y uno en el grupo no TBC hace 1 año. A ninguno de los pacientes con TBC confirmada se les había practicado la PPD.

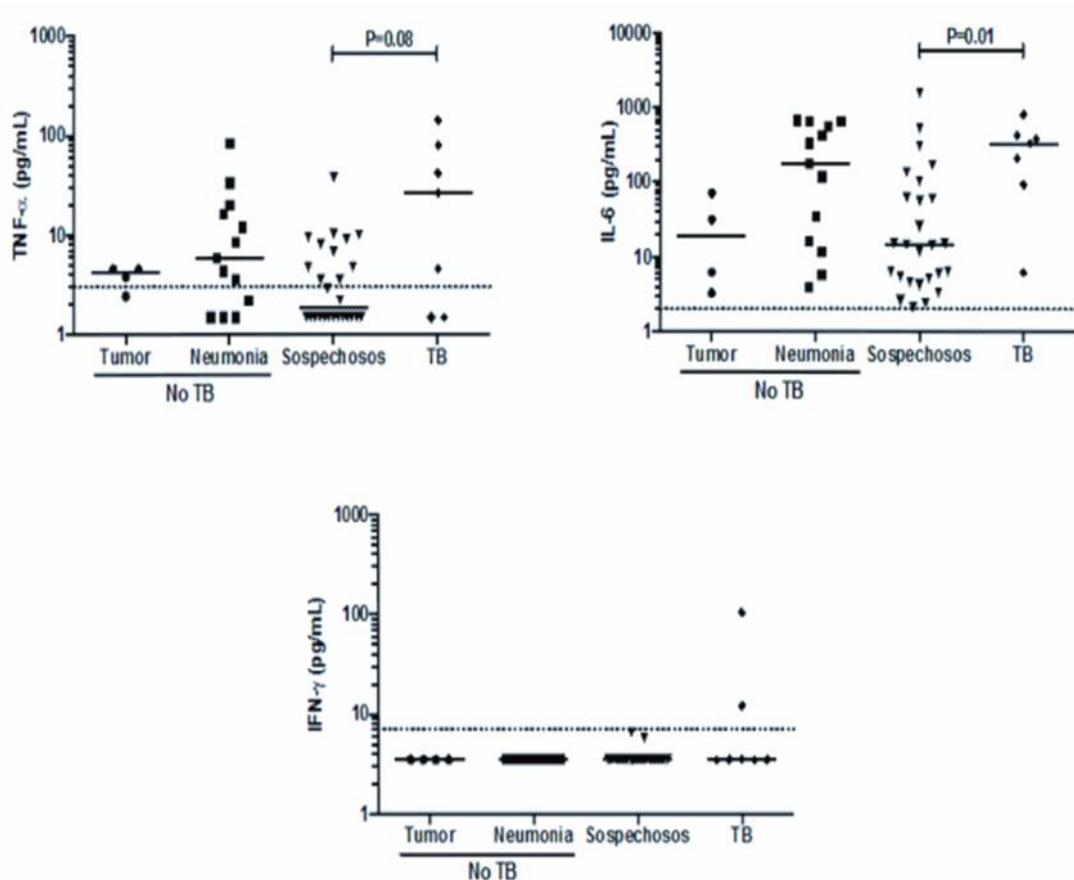
**Tabla 8.** Diagnóstico microbiológico de pacientes con sospecha de TBC.

Parámetro	Pacientes sospechosos de TBC
Baciloscopias seriadas negativas, n (%)	32(100)
Cultivo para <i>MTB</i> positivo, n (%)	6(19)
PCR para <i>MTB</i> , n (%)	4(12)
BK del LAB positivo, n (%)	0(0)

Como muestra la tabla 2, de los 32 pacientes del grupo sospechosos de TBC, 7 fueron confirmados con TBC pulmonary activa dado que tenían aislamiento microbiológico positivo, 6 de éstos por cultivo para *MBT* y un solo caso en donde el cultivo fue negativo pero la PCR positiva.

**7.2.1 Detección de IL-6, TNF- e IFN- en líquidos de LBA.** Para la IL-6, TNF- analizados por ELISA, se encontraron niveles detectables de en los tres grupos de pacientes, con una tendencia a encontrarse más elevados en los pacientes con TBC confirmada, también se debe tener en cuenta que del grupo de no TBC, los pacientes con neumonías presentaron elevación siendo esta más marcada en 2 casos en donde se documentó neumonía severa y terminaron con estancia en la unidad de cuidados intensivos. Un paciente del grupo de sospechosos de TBC en quien luego se diagnosticó neumonía *Pneumocystis jirovecii* también presentó una elevación importante (Grafica 4). Cuando se comparó el TNF- en el grupo de TBC confirmado con el grupo de sospechosos TBC no se encontró diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0.08$ ) aunque existió una clara tendencia (Grafica 4).

**Grafica 4.** Detección de los niveles de IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en LBA de pacientes sin TBC, con sospechade TBC y TBC confirmada, determinados por ELISA (IL-6 y TNF- $\alpha$ ) y CBA (IFN- $\gamma$ ).



La línea horizontal discontinua, representa el límite de sensibilidad del ensayo. El valor de P usando la prueba de Kruskal- Wallis y Bonferroni modificado es mostrado.

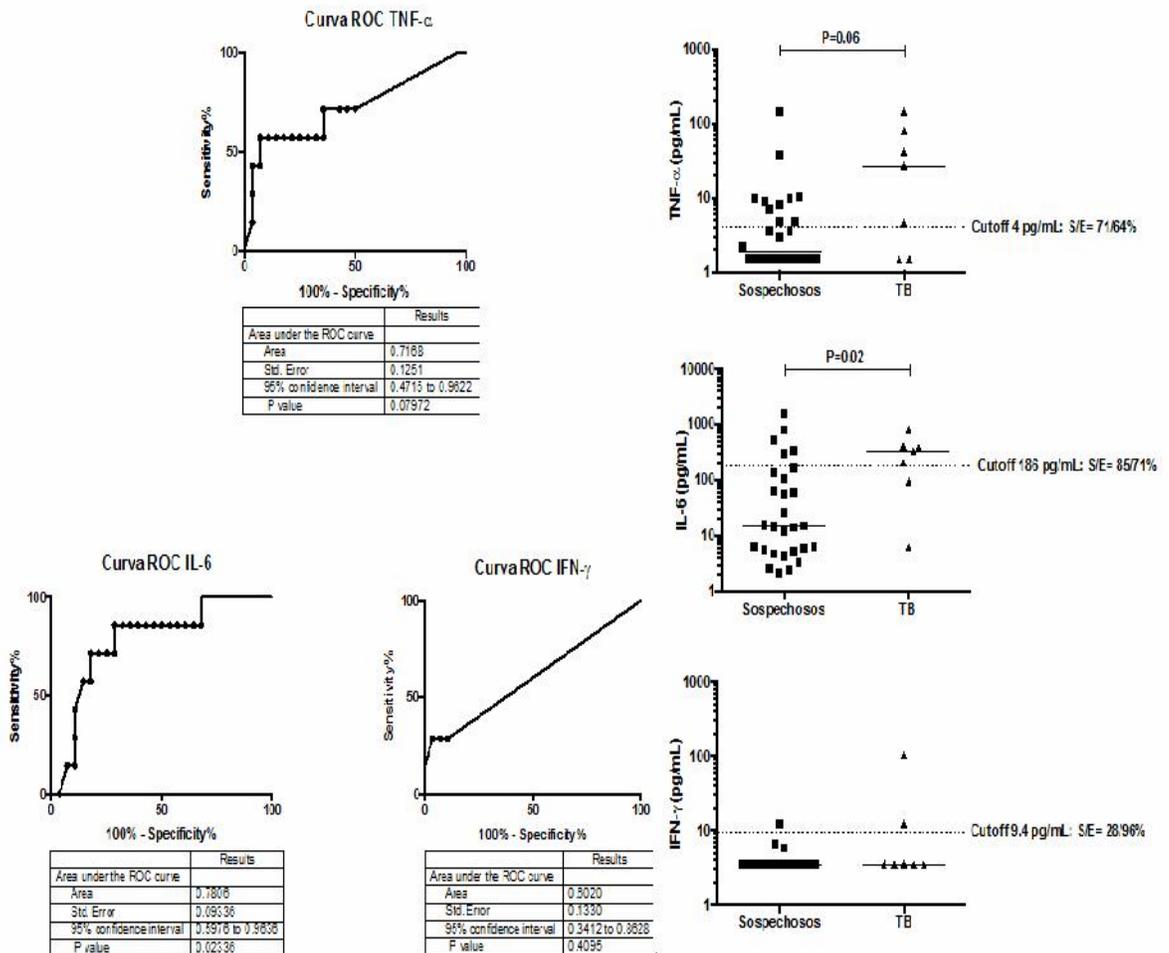
Cuando la IL-6 fue analizada, una importante diferencia significativa en su nivel fue encontrada entre los pacientes con sospecha de TBC y los que tuvieron TBC confirmada (Figura 2, P=0.01, Kruskal- Wallis y post hoc test), soportando el posible uso de esta citoquina en la diferenciación diagnóstica de los dos grupos (Anexo C y D).

Interesantemente, el IFN- $\gamma$  se detecto específicamente en pacientes con sospecha de TBC o TBC confirmados. Aunque no hubo diferencias significativas entre los

grupos analizados, los pacientes con los niveles más altos de IFN- de todos los incluidos en el estudio estuvieron en el grupo TBC confirmada.

### 7.2.2 Eficiencia de los niveles de IL-6, TNF- e IFN- para el diagnóstico de TBC pulmonar activa

**Grafica 5.** Curvas ROC comparando casos sospechosos vs TBC confirmada. Curvas ROC y valores cutoff de TNF- (A), IL-6 (B) e IFN-γ (C) para discriminar entre pacientes con sospecha y confirmación de TBC pulmonar.



Para cada una se muestran los respectivos valores de sensibilidad y especificidad. Valor P: Prueba de Mann-Whitney.

Para determinar el potencial uso de la determinación de los niveles de las citosinas aquí analizadas para el diagnóstico de TBC, se generaron curvas ROC usando diferentes puntos de corte para cada una de ellas, además de los resultados obtenidos con el estándar diagnóstico de oro (que en este caso es la detey/o PCR cuantitativa) De las tres citosinas analizadas, sólo la IL-6 con un punto de cohorte > 186pg/mL, mostro una adecuada área bajo la curva, con una P significativa (Grafica 5). Con este punto de cohorte, la IL-6 en LBA mostró una sensibilidad del 85% y especificidad de 71% para el diagnóstico de TBC pulmonar activa en pacientes con previo estudio de baciloscopia seriado negativo.

Para el TNF- y para el IFN- $\gamma$ , los diferentes puntos de corte probados no mostraron adecuadas áreas bajo la curva (aunque para el TNF- existió una importante tendencia) que soportaran el cálculo de valores de sensibilidad y especificidad. Los resultados con estas dos últimas citosinas probablemente se deben al bajo n con el que aún cuenta el estudio, pero que obviamente aumentará al final del mismo.

En corto, los resultados obtenidos hasta hora soportaran la posible utilidad como método diagnóstico complementario de la IL-6 y posiblemente el TNF- en LBA para el diagnóstico de TBC en pacientes con Baciloscopia negativas.

El análisis de la curva ROC fue significativa para la IL-6 con un área bajo la curva de 0.82. Ninguna otra curva ROC fue significativa entre los grupos de sospechosos de TBC y las otras citoquinas.

## 8. DISCUSIÓN

El reto diagnóstico que representa la TBC pulmonar activa (1,4), requiere mejorar los predictores y pruebas que permitan realizar un diagnóstico más certero y temprano permitiendo un tratamiento precoz y obteniendo desenlaces clínicos favorables.

Los estudios diagnósticos en TBC pulmonar son variados y proporcionan valores predictivos positivos distintos, comparados con el cultivo del lavado broncoalveolar que proporciona una especificidad del 98% y una sensibilidad del 85%, con la limitante de que sus resultados son demorados (2 a 3 meses) respecto al desenlace clínico que busca evitar (muerte del paciente con TBC no tratada) (9). Un 15% de pacientes en los que el cultivo no es concluyente y representa pacientes que se quedarán sin diagnóstico y se convertirán por lo tanto en portadores y transmisores de la misma, la propagación de la enfermedad. De ahí la importancia de contar con otros métodos diagnósticos complementarios.

El grupo de pacientes tomados en los escenarios a comparar mostraron poblaciones homogéneas con medianas similares. Los síntomas clínicos también mostraron un perfil similar siendo la tos el síntoma que se presentó en el mayor porcentaje de pacientes. Estas coincidencias prevén una difícil diferenciación desde el plano únicamente clínico de la TBC pulmonar respecto a otras enfermedades pulmonares (32), lo que genera un papel preponderante de los estudios diagnósticos directos o indirectos.

Dentro de los antecedentes de los grupos del estudio el de mayor porcentaje de no tuberculosos fue el de tumores siendo este un alto indicio de la asociación descrita entre enfermedades crónicas y enfermedades pulmonares.

Varios estudios han demostrado que las citoquinas están implicadas en la patogénesis de la TBC (10,11). Los niveles de citoquinas en lavados broncoalveolares han sido estudiados en pacientes con TBC activa. El presente trabajo busca determinar las diferencias de los niveles de IL-6, TNF- e IFN- en el LBA en los pacientes sospechosos de TBC activa con BKnegativas y pacientes no TBC y compararlos con los pacientes con cultivo positivo para TBC, determinando así el comportamiento de estos niveles en los distintos escenarios y evaluando su posible uso diagnóstico.

Los resultados que surgen de la determinación de las tres citoquinas demostraron producción de estas en los pacientes con TBC pulmonar activa frente a los pacientes no TBC, coinciden con las publicaciones del aumento de estas citoquinas en pacientes tuberculosos ( 9,11) .

La diferenciación de los niveles de medición de IFN- $\gamma$  en los distintos grupos mostró una elevación (más de 10 pg/mL) en el grupo de los pacientes sospechosos con TBC (pacientes con aislamiento microbiológico positivo para TBC) frente a unos niveles menores en los otros grupos.

El estudio del Dr. Nolan en el 2013 mostró una asociación entre los niveles de IL-6 en LBA con TBC no cavitaria, a diferencia nuestra investigación mostro hasta el momento la mayor sensibilidad y especificidad para la IL-6 en LBA para el diagnóstico de TBC pulmonar activa en pacientes con BK negativo.

Boras y col publicaron en el año 2007 el perfil de los niveles de citoquinas en lavado broncoalveolar y sangre periférica tipificando estos resultados en pacientes con tuberculosis pulmonar activa, evidenciando una mayor producción de IFN- $\gamma$  en el lavado broncoalveolar, hallazgos consistentes con el presente trabajo.

Los hallazgos publicados previamente comparados con los datos obtenidos en el presente trabajo muestran que el IFN- $\gamma$  cuantificado en el lavado bronco alveolar representa una citoquina que permitiría diferenciar a pacientes con TBC pulmonar de otras patologías pulmonares, obteniendo rendimientos diagnósticos en menor tiempo en comparación con el cultivo.

En el grupo de la tuberculosis, el nivel TNF- $\alpha$  fue mayor que en el grupo de no TBC lo que sugiere que puede ser más específica para TBC que a otras enfermedades. En nuestro estudio, la sensibilidad y la especificidad de TNF- $\alpha$  no fueron altas (71 y 64%, respectivamente), esto puede ser debido al hecho de que se cuentan con pocos casos confirmados de TBC y se presume que al aumentar la muestra de estos pacientes puedan sacarse conclusiones más certeras.

Los datos muestran una probabilidad alta para la utilización costo beneficio de este medio diagnóstico, sin embargo es necesario realizar una mayor casuística para obtener mayor poder estadístico en los presentes hallazgos.

## 9. CONCLUSIONES

Niveles de IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en LBA pueden ser detectados por ELISA y CBA, comparablemente entre los dos métodos.

El TNF- $\alpha$  y la IL-6 fueron significativamente más altos en los pacientes con TBC confirmada, que los pacientes con sospecha de TBC.

La IL-6 en LBA mostró hasta el momento la mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de TBC pulmonar activa en pacientes con BK negativo.

En este estudio se logró hacer el diagnóstico microbiológico de 7 pacientes con TBC pulmonar activa e iniciando tratamiento oportuno.

Aunque en nuestro estudio existe una tendencia y una probabilidad alta de que el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  estén significativamente elevados en TBC pulmonar activa, para poder afirmar que es una herramienta diagnóstica temprana, es necesario realizar una mayor casuística para obtener mayor poder estadístico en los presentes hallazgos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hopewell P, Kato-Maeda M. Mason: Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine. General Manifestations of Tuberculosis. 5th ed. Chapter 34. 2014. 754-759.
2. Evaluación de indicadores de eventos de salud pública. Informe de 1er y 2o trimestres de 2013. Departamento del Huila. Gobernación del Huila.
3. Mazurek G. Updated Guidelines for using interferon Gamma release assays to detect Mycobacterium tuberculosis infection. United States. CDC. 2010.
4. Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A. Predictive value of interferon- release assays and tuberculin skin testing for progression from latent TB infection to Disease state. Chest 2012; 142 (1): 63-75.
5. Küpeli E, Karnak D, Beder S, Kayacan O, Tutkak H. Diagnostic accuracy of cytokine levels (TNF-alpha, IL-2 and IFN-gamma) in bronchoalveolar lavage fluid of smear-negative pulmonary tuberculosis patients. Respiration. 2008. 75(1):73-8.
6. Syed AhamedKabeer et al. Interferon gamma and interferon gamma inducible protein-10 in detecting tuberculosis infection. Journal of Infection. 2012. 64, 573-579.
7. Tsao TC, Huang CC, Chiou WK, Yang PY, Hsieh MJ, Tsao KC. Levels of interferon-gamma and interleukin-2 receptor-alpha for bronchoalveolar lavage fluid and serum were correlated with clinical grade and treatment of pulmonary tuberculosis. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, Vol 6, Number 8, August 2002; 720-727(8).
8. Nolan A, Condos R, Huie ML, Dawson R, Dheda K, Bateman E, Rom WN, Weiden M. Elevated IP-10 and IL-6 from bronchoalveolar lavage cells are biomarkers of non-cavitary tuberculosis. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 2013. 17(7):922-927.

9. Jafari C, Kessler P, Sotgiu G, Ernst M, Lange C. Impact of a Mycobacterium tuberculosis-specific interferon- release assay in bronchoalveolar lavage fluid for a rapid diagnosis of tuberculosis. *Journal of Internal Medicine*. 2011 Nov;270(5):500.
10. Boras Z, Jureti A, Gagro A, Paveli L. Cytokine profile of t lymphocytes from peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid in patients with active pulmonary tuberculosis. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2007 Mar;65(3):257-64.
11. Wang F, Hou H, Xu L, Jane M, Peng J, Lu Y, Zhu Y, Sun Z. Mycobacterium Tuberculosis-Specific TNF- Is a Potential Biomarker for the Rapid Diagnosis of Active Tuberculosis Disease in Chinese Population. *PLoS One*. 8 (11): e79431. 2013.
12. Nemeth J, Winkler H. Recruitment of Mycobacterium tuberculosis specific CD4+ T cells to the site of infection for diagnosis of active tuberculosis. *Journal of Internal Medicine* 265; 163–168. 2008.
13. DuoSet, RyD, Cats: catalogo DY206.
14. Hanna B, EbrahimzadehA ,Elliott et al. Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. *J ClinMicrobiol*. 1999; 37: 748–52.
15. Robert-Koch-Institut. BerichtzurEpidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2007. Berlin: Robert-Koch-Institute, 2009.
16. Brighenti S, Andersson J. Local Immune Responses in Human Tuberculosis: Learning From the Site of Infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 205:S316–24. 2012.
17. Fitzgerald D, Sterling T, Haas D. Bennett: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 8th ed. Mycobacterium tuberculosis. 2014, 251: 2787-2793. Elsevier.
18. World Health Organization. Tuberculosis, fact sheet °104; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>. 2014.

19. Ernst JD, Trevejo-Nunez G, Banaiee N: Genomics and the evolution, pathogenesis, and diagnosis of tuberculosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 117(7): 1738–1745. 2007.
20. Jong B, Gagneux S: *Mycobacterium africanum*—review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 2010.
21. Gagneux S, Small PM: Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis* 2007.
22. Valenzuela M. Recomendaciones para la prevención y control de la tuberculosis en el personal de salud. *RevChil Infect* 1998; 15: 234-41.
23. Zumla A. Tuberculosis. *The New England journal of medicine*. 368:745-755. 2013.
24. Keshavjee S, Farmer P. Tuberculosis, Drug Resistance, and the History of Modern Medicine. *New England journal of medicine*. 367(10):931-936.2012..
25. Global tuberculosis report 2014. World Health Organization 2014.
26. Lineamientos para el manejo pragmático de pacientes con tuberculosis farmacorresistentes. Instituto nacional de salud, ministerio de salud. Colombia. 2013.
27. Mehta A, Leonard M. Acute Forms of Tuberculosis in Adults. *The American Journal of Medicine*. 122,1:12-17. 2009.
28. Guía de atención de la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. Guías de promoción de la salud y prevención de enfermedades en la salud pública. Programa de Apoyo a la Reforma de Salud/PARS • Ministerio de la Protección Social. 2010.

29. Herrera M. Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana. *Revista del instituto nacional de enfermedades respiratorias de México*. 18: 4. 327-336. 2005.
30. García M Figueroa. Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Una revisión de la literatura. *RevInstNalEnfRespMex*. 14, 12. 2001
31. Ellner J. Goldman: Goldman's Cecil Medicine, 24th ed. Saunders. 2011. 332: 1939-1947.
32. Rodriguez C. *Clinics in laboratory medicine*. 32, 2: 111-352.2012.
33. PunalRioboo J, Queiro Verdes T. Interferon-g release assays (IGRAs) for diagnosis of latent tuberculosis infection and active tuberculosis. Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad y Política Social. Axencia de Avaliacion de Tecnoloxias Sanitarias de Galicia; 2009. Informes de evaluación de tecnologías sanitarias: avalia-t Num. 2009/01-1.
34. Denkinger C. Challenges in the development of an immunochromatographic interferon – gamma test for diagnosis of pleural tuberculosis. *PLOS ONE*. Vol 8. 12: e85447. 2013.
35. Andronikou S, Vanhoenacker F, De Backer A. Advances in Imaging Chest Tuberculosis: Blurring of Differences Between Children and Adults. *Clinics in Chest Medicine*.30 717–744. 2009.
36. Restrepo B. Nuevas herramientas para la detección de la tuberculosis latente. *Biomédica* vol.24 suppl.1 Bogotá June 2004.
37. Vía E, Barón R, Molinsc E, Arriero J. Tuberculosis. *ArchBronconeumol*. 2011; 47(Supl 8):10-14.
38. Munang M, O'Shea M, Dedicoat M. Novel drugs and drug combinations for treating tuberculosis. *BMJ*. 2014; 349: 5948.

39. Kraemer HC. Medical test: Objective and Quantitative Guidelines. SAGE publications, Inc Newbury Park, cal, USA. 14. 1-15. 1992

# ANEXOS

**Anexo A.** Instrumento de recolección de datos del estudio.

UNIVERSIDAD SUCOLOMBIANA-  
FACULTAD DE SALUD  
HOSPITAL UNIVERSITARIO HERNANDO MONCALEANO PERDOMO



EVALUACIÓN DEL NIVEL DE INTERFERÓN GAMMA (IFN-G) EN LAVADO  
BRONCOALVEOLAR COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO PARA PACIENTES CON  
SOSPECHA DE TUBERCULOSIS PULMONAR

Nombre : \_\_\_\_\_ fecha de ingreso \_\_\_\_\_  
Edad: \_\_\_\_ años HC \_\_\_\_\_ CC \_\_\_\_\_  
Sexo: Femenino \_\_\_\_ masculino \_\_\_\_ Teléfono  
\_\_\_\_\_

1- Edad

< 65 años

> 65 años

2- Peso \_\_\_\_\_ Talla \_\_\_\_\_

3- Antecedente epidemiológico

• Antecedente de contacto con personas con Tuberculosis Si \_\_\_\_  
No \_\_\_\_

• Antecedente de vacunación con BCG Si \_\_\_\_  
No \_\_\_\_

Hace cuánto tiempo \_\_\_\_\_

• Antecedente de prueba de tuberculina Si \_\_\_\_ No \_\_\_\_  
Hace cuánto tiempo \_\_\_\_\_

4- Comorbilidades

• Hipertensión Arterial Si \_\_\_\_ No \_\_\_\_

• Diabetes Mellitus Si \_\_\_\_ No \_\_\_\_

• EPOC Si \_\_\_\_ No \_\_\_\_

• Enf. hematológicas crónicas (A.falciforme) Si \_\_\_\_ No \_\_\_\_

- ERC Si\_\_\_ No\_\_\_
- Enf. cardiovascular grave Si\_\_\_ No\_\_\_
- Enf. autoinmunes Si\_\_\_ No\_\_\_ Cual \_\_\_\_\_  
Tratamiento actual Si\_\_\_ No\_\_\_ Cual \_\_\_\_\_
- Antecedente de tuberculosis: Si\_\_\_ No\_\_\_ hace cuánto tiempo \_\_\_\_\_  
Recibió tratamiento Si\_\_\_ No\_\_\_ Cual \_\_\_\_\_
- Infección por retrovirus humano (VIH) Si\_\_\_ No\_\_\_ Hace cuánto tiempo \_\_\_\_\_  
Conteo Linfocitos CD4 Si\_\_\_ No\_\_\_ valor \_\_\_\_\_  
Carga viral Si\_\_\_ No\_\_\_ valor \_\_\_\_\_  
Tratamiento Si\_\_\_ No\_\_\_ Cual \_\_\_\_\_
- Otras infecciones en este momento Si\_\_\_ No\_\_\_ Cual \_\_\_\_\_

5- Anamnesis – Examen físico (alguno de estos)

- Sudoración Si\_\_\_ No\_\_\_ día de inicio \_\_\_\_\_ duración \_\_\_\_\_
- Hiporexia Si\_\_\_ No\_\_\_ día de inicio \_\_\_\_\_ duración \_\_\_\_\_
- Fiebre Si\_\_\_ No\_\_\_ día de inicio \_\_\_\_\_ duración \_\_\_\_\_
- Tos Si\_\_\_ No\_\_\_ día de inicio \_\_\_\_\_ duración \_\_\_\_\_
- Hemoptisis Si\_\_\_ No\_\_\_ día de inicio \_\_\_\_\_ duración \_\_\_\_\_
- Pérdida de peso Si\_\_\_ No\_\_\_ día de inicio \_\_\_\_\_ duración \_\_\_\_\_
- Disnea Si\_\_\_ No\_\_\_ día de inicio \_\_\_\_\_ duración \_\_\_\_\_

6- Lugar de atención

- Sala general- Hospitalización (observación) Si\_\_\_ No\_\_\_
- UCI (unidad de cuidados intensivos) Si\_\_\_ No\_\_\_

7- Hallazgos adicionales en la Fibrobroncoscopia

---

8- Condición al final de la estancia hospitalaria

- Vivo Si\_\_\_ No\_\_\_

9- Seguimiento

- Recibe tratamiento anti- TB Si\_\_\_ No\_\_\_
- Medicamentos anti-TBC actuales: \_\_\_\_\_

- Complicaciones:

---

- BK en cultivo Positivo \_\_\_\_\_ Negativo\_\_\_\_\_

- Cultivo para micobacterias Positivo \_\_\_\_\_ Negativo\_\_\_\_\_

Parámetro	1 MES	2 MESES	3 MESES
Suspensión de tratamiento			
Nueva hospitalización			
Diagnostico clínico radiológico y bacteriológico			
Otros datos			

**Anexo B.** Consentimiento informado.

**UNIVERSIDAD SUCOLOMBIANA-  
FACULTAD DE SALUD  
HOSPITAL UNIVERSITARIO HERNANDO MONCALEANO PERDOMO**



**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPANTES DE INVESTIGACIÓN  
“NIVELES DE INTERFERÓN GAMMA EN LAVADO BRONCOALVEOLAR DE  
PACIENTES ADULTOS CON SOSPECHA DE TUBERCULOSIS PULMONAR  
CON BK NEGATIVO Y SU POSIBLE USO DIAGNÓSTICO”**

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Carlos Fernando Narvaez

SEDE DONDE SE REALIZA EL ESTUDIO: Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo

NOMBRE DEL PACIENTE: \_\_\_\_\_

A usted se le está invitando a participar en el estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad de preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

**Objetivo del estudio:** Determinar si hay elevación del nivel de IFN-g en lavado broncoalveolar en pacientes con sospecha de TBC pulmonar y establecer su sensibilidad y especificidad frente a los métodos diagnósticos localmente

**Justificación del estudio** Este estudio evaluara una aproximación diagnostica complementaria temprana para tuberculosis pulmonar que se espera permita el inicio oportuno del tratamiento

**Procedimientos del estudio:** Si usted accede a participar en este estudio, se le pedirá responder preguntas y el consentimiento para la manipulación de las muestras obtenidas en la fibrobroncoscopia.

**Aclaraciones:** Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria. No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación. Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad. No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio. No recibirá pago por su participación. En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable. La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.

Si tiene alguna pregunta o si desea alguna aclaración por favor comunicarse con la Dra a Marcela Castro al teléfono 3112579527 y a la Dra Carol Salcedo al teléfono 3177540349

Yo, \_\_\_\_\_ c.c N° \_\_\_\_\_  
de \_\_\_\_\_ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria por el investigador que me entrevisto. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos, por lo tanto deseo participar voluntariamente en el proyecto de investigación.

\_\_\_\_\_  
Nombres y Apellidos del Participante

\_\_\_\_\_  
Firma del Participante.  
C.C N°

\_\_\_\_\_  
Nombre del Testigo

\_\_\_\_\_

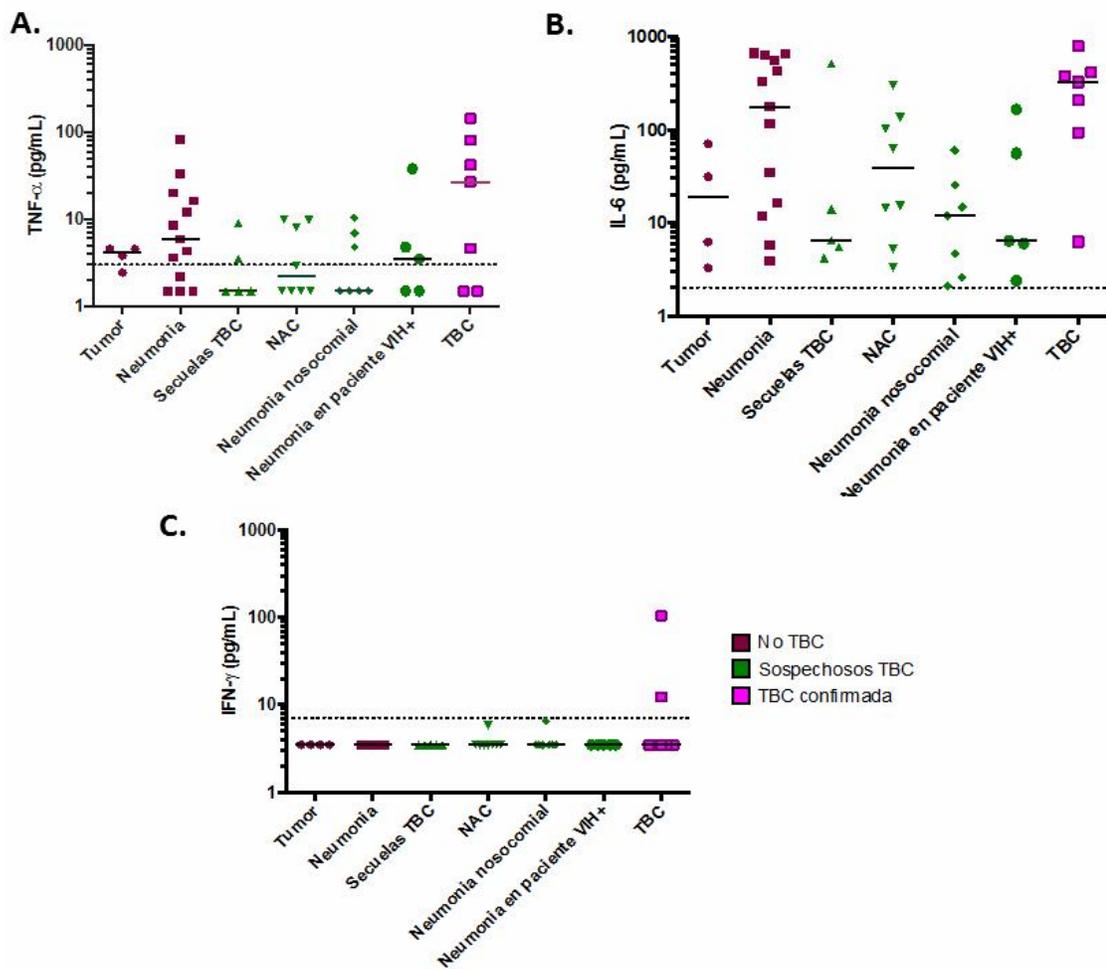
Firma del Testigo.  
C.C N°

Esta parte debe ser completada por el investigador (o su responsable) He explicado al Sr.(a) \_\_\_\_\_ el propósito de la investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implican su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apegó a ella (Resolución 8430 de 1993) una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

\_\_\_\_\_  
Firma del Investigador

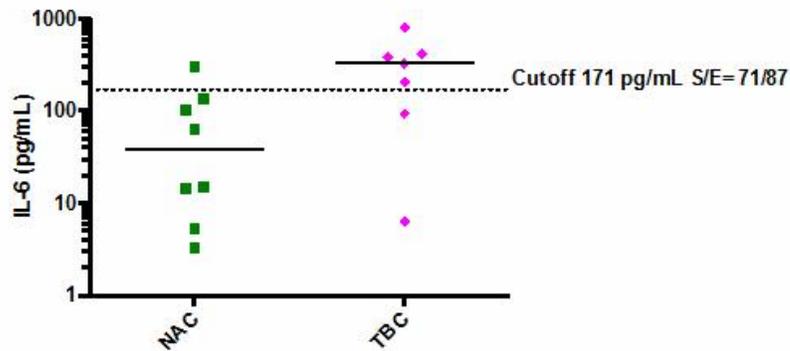
\_\_\_\_\_  
Fecha

**Anexo C.** Niveles de TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B) e TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (C) en LBA de pacientes con TBC pulmonar confirmada, sospecha de TBC pulmonar y controles.

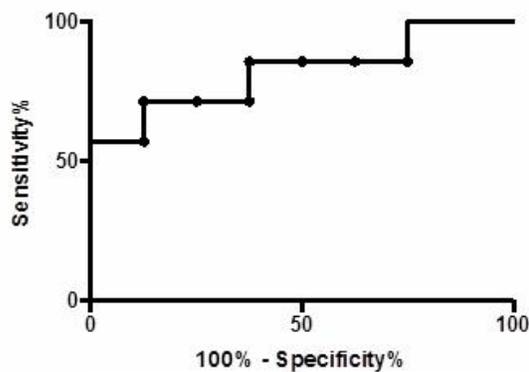


Niveles de TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B) e TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (C) en LBA de pacientes con TBC pulmonar confirmada, sospecha de TBC pulmonar y controles. Para los dos últimos grupos se muestran los diagnósticos respectivos. La línea a trazos indica el límite de detección del ensayo para cada citoquina. Valor P: Prueba de Kruskal-Wallis.

**Anexo D.** Curvas ROC comparando casos sospechosos con dx de NAC vs TBC confirmada.



Curva ROC IL-6 NAC vs TBC



	Results
Area under the ROC curve	
Area	0.8214
Std. Error	0.1163
95% confidence interval	0.5935 to 1.049
P value	0.03729

Curva ROC comparando casos sospechosos de TBC con diagnosticos de neumonía adquirida en comunidad vs TBC.

El análisis de la curva ROC fue significativa para la IL-6 con un área bajo la curva de 0.82. Ninguna otra curva ROC fue significativa entre los grupos de sospechosos de TBC y las otras citoquinas.