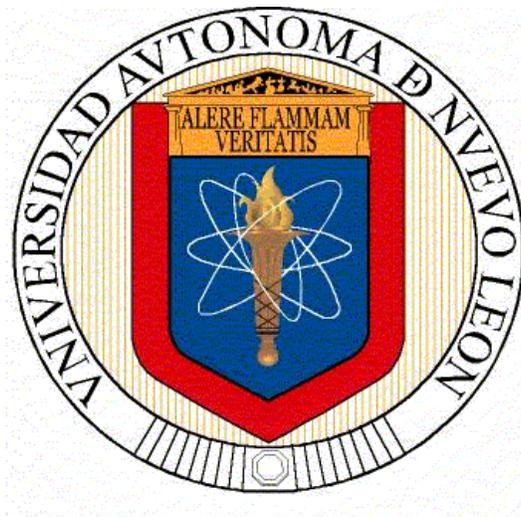


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS

***DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE TUBERCULOSIS PULMONAR
MEDIANTE LA DETECCIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE
ANTICUERPOS IgM E IgG CONTRA MICROESFERAS
CUBIERTAS CON ESAT-6 Y CFP-10***

POR

LUIS ADRIÁN RENDÓN PÉREZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN MEDICINA**

NOVIEMBRE 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



***DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE TUBERCULOSIS PULMONAR
MEDIANTE LA DETECCIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE
ANTICUERPOS IgM E IgG CONTRA MICROESFERAS
CUBIERTAS CON ESAT-6 Y CFP-10***

Por

DR. LUIS ADRIÁN RENDÓN PÉREZ

**Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN MEDICINA**

Noviembre, 2013

**DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE TUBERCULOSIS PULMONAR
MEDIANTE LA DETECCIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE
ANTICUERPOS IgM E IgG CONTRA MICROESFERAS
CUBIERTAS CON ESAT-6 Y CFP-10**

Aprobación de la Tesis:



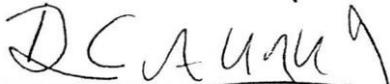
Dr. C. Adrián G. Rosas Taraco
Director de Tesis



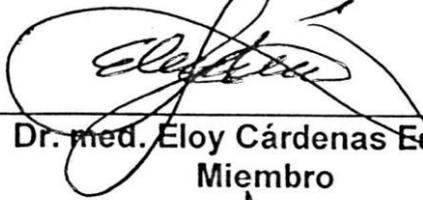
Dr. C. Mario César Salinas Carmona
Co-Director



Dr. C. Alma Yolanda Arce Mendoza
Co-Director



Dr. med. Dionicio Angel Galarza Delgado
Miembro



Dr. med. Eloy Cárdenas Estrada
Miembro



Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A mis amados padres Carlos Rendón y Ma. Teresa Pérez, que siempre fomentaron en mí ser la honestidad, el respeto y los logros conseguidos a través del trabajo.

A mi esposa Ruth y a mis hijas Adriana y Alexandra que día a día me estuvieron motivando y ayudando a sacar adelante este nuevo reto.

A mis pacientes que con su sufrimiento en la enfermedad y su gozo en la salud, son el máximo aliciente para seguirme superando en el conocimiento médico.

A las autoridades de esta prestigiada institución que facilitaron el poder terminar proyecto.

Al Dr. Adrián Rosas, a quien agradezco su apoyo, tiempo, y sobre todo su confianza y paciencia en estos años de desarrollo del proyecto.

A todos los profesores integrantes del comité de Tesis Doctoral, Dra. med. Alma Yolanda Arce Mendoza, Dr. med Mario Cesar Salinas Carmona, Dr. med. Dionicio Angel Galarza Delgado y Dr. med. Eloy Cardenas Estrada, quienes

siempre estuvieron ahí para apoyarme y motivarme durante todo el desarrollo del Doctorado.

Al personal del Centro de Investigación, Prevención y Tratamiento de Infecciones Respiratorias (CIPTIR) del Servicio de Neumología: A la Lic. Susana Covarrubias, pieza fundamental en la articulación de todos los que participamos en este proyecto y que siempre fue más allá de lo que se le solicitaba realizar. A las Dras. Mara Olivo, Alba Castillo, Sylvia de la Rosa y Adriana Rendón, quienes como pasantes de investigación en el CIPTIR, se convirtieron en mis más cercanas colaboradoras, sin las cuales no se hubieran podido realizar las múltiples tareas que requirió este estudio. A Ivonne Ramírez y Addis Flores, que desde su laboratorio de Micobacterias participaron procesando incontables muestras. A Marcela Ibarra, que mantuvo al día las agendas y los pormenores de logística de este posgrado.

Al personal del Servicio de Inmunología de la Facultad de Medicina de Monterrey UANL, por toda la ayuda y las facilidades ofrecidas en el almacenamiento y procesamiento de muestras.

Y a todos aquellos que con sus comentarios, críticas y muestras de apoyo, me incentivaron a no dejar inconclusa esta investigación.

GRACIAS A TODOS

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I	Página
1. RESUMEN.....	1
Capítulo II	
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 Antecedentes.....	3
2.2 Importancia.....	11
2.3 Originalidad.....	12
2.4 Justificación.....	13
Capítulo III	
3. HIPOTESIS.....	14
Capítulo IV	
4. OBJETIVOS.....	15
4.1 Objetivo general.....	15
4.2 Objetivos específicos.....	16
CAPITULO V	
5. MATERIAL Y METODOS.....	17
5.1 Población de estudio.....	17
5.2 Recursos biológicos.....	18
5.3 Recursos materiales.....	18
5.4 Recursos financieros.....	20
5.5 Recurso metodológicos.....	21
5.5.1 Diseño experimental.....	21

5.5.2	Selección de pacientes.....	22
5.6	Enrolamiento.....	23
5.6.1	Criterios de inclusión.....	24
5.6.2	Criterios de exclusión.....	24
5.6.3	Clasificación de pacientes.....	25
5.7	Procedimientos durante el estudio.....	26
5.7.1	PPD.....	26
5.7.2	Baciloscopía y cultivo para micobacterias.....	27
5.7.3	QuantiFERON TB Gold In-Tube(Cellestis).....	28
5.7.4	Inmunoensayo con microesferas Y ESAT-6 CFP-10.....	29
5.7.5	Validación del inmunoensayo.....	30
5.7.6	Análisis de datos.....	33
Capítulo VI		
6.	RESULTADOS.....	34
Capítulo VII		
7.	DISCUSIÓN.....	45
Capítulo VIII		
8.	CONCLUSIÓN.....	53
Capítulo IX		
9.	ANEXOS.....	55

9.1 Cuestionarios.....	55
9.2 Carta de consentimiento.....	59
Capítulo X	
10. BIBLIOGRAFÍA.....	61
Capítulo XI	
12. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....	67

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Datos demográficos.....	34
2. Comorbilidades: Casos vs Controles.....	35
3. Diagnósticos identificados en los casos sin TB.....	36
4. Resultados de baciloscopías y PPD entre los casos de TB.....	37
5. Resultado de la detección de anticuerpos contra ESAT-6 y CFP-10: Sens, Esp, VPP y VPN.....	38
6. Comparativo de IgG e IgM contra CFP-10.....	41
7. Comparativo de IgG e IgM contra ESAT-6.....	42
8. Comparativo de IgG contra ESAT-6 o CFP-10 y de IgM Contra ESAT-6 o CFR-10.....	42
9. Valores de concordancia para cada una de las pruebas diagnósticas realizadas.....	43

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Detección de anticuerpos IgG humanos anti CFP10.....	31
2. Detección de anticuerpos IgG humanos anti ESAT-6.....	32
3. Valores de sensibilidad para Ac contra ESAT-6 y CFP-10.....	39
4. Valores de especificidad para Ac contra ESAT-6 y CFP-10.....	39
5. Valor predictivo positivo para Ac contra ESAT-6 y CFP-10.....	40
6. Valor predictivo negativo para Ac contra ESAT-6 y CFP-10.....	40
7. Cuestionario página 1.....	56
8. Cuestionario página 2.....	57
9. Cuestionario página 3.....	58
10. Carta de consentimiento página 1.....	59
11. Carta de consentimiento página 2.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

- CFP-10:** Culture Filtrate Protein 10
- COMBE:** Convivencia con un caso activo de TB
- DM:** Diabetes mellitus
- EPOC:** Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
- ERC:** Enfermedad renal crónica
- ESAT-6:** Early Secretory Antigen Target 6
- FDA:** Food and Drug Administration
- HTA:** Hipertensión arterial
- IFN- γ :** Interferón gamma
- IGRA:** Interferón Gamma Release Assays
- IVRS:** Infección de vías respiratorias superiores
- LTBI:** Infección latente por M. tuberculosis
- MDR-TB:** Tuberculosis Multidrogo Resistente
- OH:** abuso de alcohol
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- PPD:** Derivado Proteínico Purificado
- QFT- IT:** QuantiFERON-TB Gold In-Tube
- QFIT:** Quantiferon
- TBP:** Tuberculosis
- VIH:** Virus de la Inmunodeficiencia Humana
- VPN:** Valor predictivo negativo
- VPP:** Valor predictivo positivo

CAPÍTULO I

RESUMEN

La Tuberculosis sigue siendo la infección más prevalente en el mundo afectando a un tercio del planeta. Debido a la baja sensibilidad diagnóstica de la baciloscopía, otras alternativas como la serología han sido retomadas incorporando en su aplicación nuevas tecnologías que la provean de una buena sensibilidad y especificidad.

Objetivo: Validar un nuevo inmunoensayo para la detección de anticuerpos contra los antígenos ESAT-6 y CFP-10 y su comparación con los métodos convencionales usados en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar (TBP) tales como la baciloscopía, el cultivo, el PPD, y el QuantiFERON.

Material y Métodos: Se usaron microesferas cubiertas con ESAT-6 y CFP-10 para facilitar la detección de anticuerpos por citometría de flujo empleando anti-anticuerpos conjugados con fluorocromos.

Se estudiaron pacientes sintomáticos respiratorios con y sin TBP activa. Se determinaron la sensibilidad y especificidad, así como los valores predictivos negativos y positivos de cada prueba. Se determinó además la concordancia entre las pruebas con el índice de kappa.

Resultados: se incluyeron 106 pacientes, 53 con TB y 53 controles. La mejor sensibilidad, 58.5%, se obtuvo al combinar la detección de cualquiera de las dos inmunoglobulinas contra cualquiera de los antígenos (58.5%). La mejor especificidad fue para la detección individual de visual de IgM contra CFP-10, 94.3%. la cual tuvo un VPP de 87%. La mejor concordancia se observó entre el cultivo y los anticuerpos IgM (kappa 0.321).

Conclusiones: El inmunoensayo no mostró ser superior al cultivo pero se observó un VPP alto que puede ser útil en la toma de decisiones terapéuticas. La poca concordancia con la baciloscopía y el cultivo señalan que esta prueba debe ser complementaria en el estudio de pacientes con sospecha de TB.

CAPITULO II

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

La tuberculosis (TB) es considerada como un problema de salud mundial debido a su alta prevalencia e índices de morbi-mortalidad.¹⁻³ La OMS calculó que en el 2011 hubo 8,7 millones de casos nuevos (un 13% coinfectados por el VIH) y que 1,4 millones de personas murieron por esta causa. En los 90's fue estimado que aproximadamente 2,000 millones de personas (una tercera parte de la población mundial) se encontraban infectados con *M. tuberculosis*. En América Latina se presentan entre 250-300 mil nuevos casos y 20-25 mil muertes por año, lo anterior coloca a esta región en el tercer lugar de incidencia por debajo de África y Asia, siendo Brasil, México y Perú los países más afectados.

La infección inicia con la inhalación del bacilo tuberculoso y su depósito en los alvéolos pulmonares.⁴ El desarrollo de enfermedad dependerá de la virulencia del bacilo y de la respuesta inmune del huésped. La fase inicial de la infección habitualmente es autolimitada. Después de la primoinfección el 90% de los enfermos pasan a una fase de latencia. Solo el 10% de los casos latentes pasaran posteriormente a la fase de reactivación. Es en esta última etapa se presentan las manifestaciones clínicas características de la TB y en donde se hace el diagnóstico. Es también en esta etapa donde los pacientes transmiten la infección a otras personas siendo el grupo con mayor riesgo de contagio, los contactos cercanos (30%). El diagnóstico rápido es necesario para poder iniciar un tratamiento que evite la diseminación de la enfermedad.

El diagnóstico tradicional incluye la evaluación clínica y radiológica apoyada en la búsqueda microscópica de la micobacteria en muestras de esputo, procedimiento conocido como baciloscopía.⁵⁻⁸ La sospecha clínica y radiológica es muy útil para iniciar la detección de casos pero los datos pueden ser inespecíficos y se requiere un entrenamiento intencionado para la interpretación correcta de los hallazgos. Por lo tanto, la baciloscopía ha sido tradicionalmente el método más usado para el diagnóstico y es la principal recomendación de la OMS. Desafortunadamente solo 45% de los casos esperados se diagnostican de esta manera. La baciloscopía es simple y barata pero su sensibilidad no es la ideal ya que varía de 40 a 80% siendo peor en los países de bajos recursos. Su especificidad varía de 50 a 90% siendo mejor en las zonas más endémicas. De la manera como se usa en la actualidad, la baciloscopía está diagnosticando

los casos más avanzados lo cual contribuye a la propagación de la TB. La baciloscopía en muestras broncoscópicas tiene una sensibilidad mayor al 90% pero con el inconveniente de ser un procedimiento invasivo además de costoso.

Debido a las limitaciones de la baciloscopía se han intentado utilizar otros métodos diagnósticos.⁶⁻⁹ El cultivo se considera como el estándar dorado para el diagnóstico de la TB (especificidad del 99%), sin embargo, la sensibilidad es de un 80%. Su principal inconveniente es que se requiere un laboratorio especializado, lo que incrementa el costo, y que los resultados toman tiempo en reportarse, alrededor de 8 semanas si se utiliza el tradicional medio de Lowenstein-Jensen (L-J) que es el más económico. Se cuenta con medios de cultivo líquido como el BACTEC que pueden dar resultados más rápidos, en 2 semanas, pero son más caros y requieren más apoyo tecnológico.

La intradermorreacción con PPD también ha sido usada por muchos años en el estudio de pacientes con TB.¹⁰ Su principal utilidad en la actualidad es en el estudio de contactos y en la detección de casos latentes. Su papel en los casos activos es muy controversial, la misma TB puede ocasionar una prueba negativa por anergia y una prueba positiva no necesariamente indica infección activa. En los países en los que se aplica la BCG, su interpretación se ve aún más afectada por la reacción inmune que genera la vacuna que pudiera dar una prueba falsa positiva.

Los métodos serológicos prometían ser un procedimiento diagnóstico muy útil cuando se empezaron a utilizar hace más de 100 años. Los antígenos utilizados eran obtenidos por métodos fisicoquímicos y los resultados fueron desalentadores. La serología evolucionó y aparecieron las pruebas de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima o ELISA (del inglés, Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) en 1976,¹¹ la cual emplea antígenos altamente purificados. En la actualidad, se han analizado una serie de antígenos con mejores resultados, como las proteínas de 38 kDa, Ag-60, 30kDa, complejo 45/47kDa, Kp90 y el más reciente ESAT-6.¹¹⁻¹⁶ Los resultados de la serología pueden variar en relación a la naturaleza del antígeno, la pureza del mismo, la técnica usada (ELISA directa o indirecta), el sistema de detección, el estadio de la TB y si el paciente es bacilífero o no. La sensibilidad usando los antígenos individuales varía entre un 60-80% con especificidades de 84-100%. La combinación de antígenos en la misma prueba puede aumentar la sensibilidad, pero disminuye la especificidad.¹⁷⁻¹⁹ Aunque se dispone de paquetes comerciales de uso sencillo, la detección de anticuerpos no ha podido posicionarse como una prueba rutinaria de diagnóstico.

Los métodos basados en la identificación de ácidos nucleicos de la micobacteria en esputo se han visto que funcionan muy bien en ensayos *in vitro*²⁰ donde se puede tener un límite de detección de hasta 1-10 bacterias y pueden diferenciar micobacterias tuberculosas de las no tuberculosas. Su uso clínico tiene ciertas limitantes: su utilidad en aquellos casos no bacilíferos es

afectada por la presencia de inhibidores en el esputo, la pérdida de ADN al tratar de eliminar los inhibidores, amplificación de ADN de bacterias muertas y costos elevados. Su uso actual se recomienda principalmente para la diferenciación de micobacterias tuberculosas de no tuberculosas en pacientes con baciloscopía positiva.

En la era de nuevos desarrollos tecnológicos, recientemente se introdujeron al mercado dos pruebas inmunológicas que inicialmente se promovieron para el diagnóstico de TB latente pero que ahora se estudian para su posible uso en el estudio de casos activos; el QuantiFERON (QFT) ²¹ y el ELISpot²². Ambas pruebas se basan en la producción de IFN- γ antígeno específico por células T en respuesta a los antígenos ESAT-6 y CFP-10 de *M. tuberculosis*.²³⁻²⁹ Esto solo ocurre cuando los linfocitos T tienen memoria inmunológica generada por la infección previa con *M. tuberculosis*. El QFT es un método actualmente aprobado por la FDA de Estados Unidos de América para el diagnóstico de la TB latente. Su sensibilidad y especificidad son del 89 y 99%, respectivamente. El ELISpot tiene una sensibilidad del 98.8% y una especificidad del 100%. Estas pruebas tienen la ventaja de requerir solo una muestra sanguínea y tenerse el reporte en 1 a 2 días. Para el QFT ya existen paquetes comerciales muy simples de usar. La lectura de la reacción, producción de IFN- γ , se hace mediante ELISA. Los procedimientos empleados en el ELISpot, aunque usan el mismo principio, son más laboriosos. Se requiere la extracción de células para cultivarlas con los antígenos. El costo alto es el principal inconveniente de estas

2 pruebas. Su principal ventaja es que discriminan muy bien a aquellos sujetos que tienen vacunación con BCG, problema común en nuestro medio. Mientras que el resultado cualitativo no discrimina entre infección latente o activa, el resultado cuantitativo teóricamente pudiera detectar enfermedad (infección activa). Esto último no se ha podido validar clínicamente y la FDA solo ha aprobado el uso del QFT para la detección de casos latentes .³⁰⁻³⁵

La tecnología de las microesferas se ha diversificado en los últimos años.³⁶⁻
⁴⁵ Las microesferas han sido empleadas en el desarrollo de ensayos multiplex que pueden ayudar a la detección de antígenos o anticuerpos usando una cantidad de muestra mínima. El uso de microesferas ha sido estandarizado y validado por diferentes grupos y compañías para la detección multiplex de citocinas empleando citometría de flujo con microesferas de diversos tamaños. En un estudio, se compararon el método de ELISA y el método de microesferas por citometría de flujo (MCF), este último fue más rápido, sensible y de más bajo costo.³⁹ La técnica de MCF también se ha usado para determinar anticuerpos anti-peroxidasa tiroidea y anti-tiroglobulina. No hubo diferencias al compararla con los paquetes comerciales.⁴⁰ La técnica de MCF se ha investigado en diversas enfermedades infecciosas tales como hepatitis C⁴¹, VIH⁴², papiloma⁴³ y malaria⁴⁴ con buenos resultados de rapidez y sensibilidad.

En TB, las microesferas han sido empleadas para evaluar el reconocimiento de moléculas del bacilo por receptores celulares expresados en la membrana

de los macrófagos y células dendríticas que favorecen el proceso de la fagocitosis.^{36, 38,45-46} En el campo de nuevas terapias para TB, las microesferas se han usado como acarreadoras de drogas aumentando su biodisponibilidad y regulando su liberación. Las microesferas también se han utilizado como acarreadoras de antígenos o secuencias de ADN con la finalidad de desarrollar nuevas vacunas para TB. Se ha evidenciado que el uso de las microesferas coadyuva al incremento de la respuesta inmune protectora contra *M. tuberculosis*.

Los antígenos ESAT-6 y CFP-10 son dos proteínas de bajo peso molecular presentes en 3 de las principales micobacterias patógenas responsables de la TB: *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. africanum* y ausentes en el bacilo de Calmette-Güerin utilizado en la vacuna BCG.^{16, 26, 27, 47,48} CFP-10 y ESAT-6 son considerados los antígenos más específicos de TB. La homología entre CFP-10 y ESAT-6 es del 40% y son secretadas como heterodímeros por micobacterias patogénicas de allí que se piense que ambas proteínas son factores de virulencia. Ambas proteínas son capaces de inducir una inmunidad que le confiere al hospedero resistencia a la infección por *M. tuberculosis*. Su uso diagnóstico ha sido enfocado a pruebas donde se estimula la respuesta celular, sin embargo estas técnicas no han sido útiles para la confirmación de casos activos. Existe evidencia de la inducción de la respuesta inmune humoral por CFP-10 y ESAT-6 pero esta ha sido poco explorada⁵⁰⁻⁵². La respuesta de anticuerpos para CFP-10 y ESAT-6 ha sido evaluada en cobayos, primates no humanos y en humanos. Otro estudio confirmó demostró la participación de

ESAT-6 y CFP-10 en la inducción de la respuesta inmune celular, pero también de una fuerte respuesta de anticuerpos detectada por ELISA ⁵². En estos estudios se ha buscado básicamente la presencia de los anticuerpos y su comportamiento en diferentes etapas de enfermedad experimental en animales o enfermedad natural en humanos.⁵⁰⁻⁵⁶ En un estudio con macacos infectados experimentalmente, 5 de 5 desarrollaron anticuerpos contra ESAT-6 y 1 de 5 contra CFP-10⁵⁰. En otro estudio con pacientes con coinfección de TB-VIH, estos tuvieron anticuerpos contra ESAT-6 y CFP-10 ⁵¹. En un estudio con cobayos y humanos infectados con *M. tuberculosis*, el 100% de los animales y el 75% de los pacientes desarrollaron anticuerpos contra ambos antígenos⁵². Otro trabajo con 20 primates no humanos reportó anticuerpos en el 90% de los animales con evidencia de TB por necropsia⁵³. Un estudio con 9 pacientes con TB y 9 controles mexicanos sugiere que ESAT-6 induce respuesta de IgG desde etapas tempranas de la infección. ⁵⁴ En otro trabajo se buscó correlación entre la presencia de anticuerpos (usando una mezcla de antígenos entre los que estaba CFP-10) y la baciloscopia encontrándose anticuerpos en >80% de los casos BAAR (+) y en >60% de los casos BAAR (-) con una especificidad de 98%.⁵⁵ En Tanzania, el 91% de 184 pacientes con TB tenían anticuerpos contra una proteína fusionada de ESAT-6/CFP-10⁵⁶. A pesar de todo lo anterior, a la fecha no existen estudios prospectivos en humanos en los que se determine la sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de casos activos.

Importancia

Todo lo mencionado previamente evidencia nuestras limitaciones en obtener un diagnóstico temprano de la TB, lo cual ha afectado en gran medida su control en todo el mundo, pero principalmente en los países en vías de desarrollo como México. La OMS lanzó una alerta mundial sobre el resurgimiento de la TB, considerándola como un problema de salud mundial. La aparición de cepas de *M. tuberculosis* drogoresistente y la coexistencia con VIH, han contribuido al incremento de casos. Los individuos con TB activa pueden contagiar hasta un tercio de sus contactos cercanos. La mejor manera de disminuir el riesgo de contagio es hacer diagnósticos tempranos e iniciar un tratamiento adecuado. La misma OMS ha reconocido que existe una necesidad urgente de desarrollar nuevas pruebas diagnósticas que sean eficientes, rápidas y simples. De hecho, ya existe un programa afiliado a la OMS y financiado por la Fundación Bill y Melinda Gates. Este programa llamado Foundation for Innovative New Diagnostics, lanzó un programa de apoyo a nivel mundial para el desarrollo de nuevas pruebas que puedan ser usados en países de bajos recursos. Actualmente, sabemos del uso potencial de las microesferas para el desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico y del poder discriminatorio de las proteínas ESAT-6 y CFP10. Con la combinación del uso de microesferas

con los 2 antígenos más específicos de TB y la detección de anticuerpos usando citometría de flujo es posible aumentar la sensibilidad de una prueba serológica sin perder especificidad. Por lo tanto, la validación clínica prospectiva del inmunoensayo basado en microesferas cubiertas con las principales proteínas que puedan diferenciar entre micobacterias patógenas y no patógenas ofrecerá una nueva alternativa de diagnóstico rápido de la TB.

Originalidad

La prueba que intentamos validar es totalmente nueva. La originalidad del proyecto se basó en el uso de microesferas cubiertas de antígenos que funcionaron como una matriz para facilitar la detección de anticuerpos específicos para las proteínas de *M. tuberculosis* por citometría de flujo. La validación en humanos se realizó detectando anticuerpos IgM e IgG específicos para ESAT-6 y CFP-10 en sueros de pacientes con TBP.

Justificación

La OMS ha reconocido la necesidad urgente de desarrollar nuevas pruebas diagnósticas que sean eficientes, rápidas y simples. Los métodos diagnósticos convencionales como la baciloscopía tienen una mala sensibilidad y detectan los casos tardíamente. Los métodos diagnósticos que usan tecnología avanzada aún no encuentran un lugar específico en el abordaje diagnóstico de los casos sospechosos y son altamente costosos. Los métodos serológicos son económicos pero su principal inconveniente ha sido su baja sensibilidad. El uso de los antígenos ESAT-6 y CPF-6, altamente específicos de *M. tuberculosis*, combinados con la tecnología de MCF, ofrece la posibilidad de aumentar la sensibilidad sin perder especificidad. Este método aportaría una prueba diagnóstica eficiente, fácil de realizar, económica y con un corto tiempo de entrega de resultados. Estas cualidades permitirían detectar mayor número de casos en menos tiempo, acortando así la cadena de transmisión.

CAPITULO III

HIPOTESIS

El inmunoensayo para el diagnóstico de la TBP activa usando microesferas cubiertas con ESAT-6 y CFP10 de *M. tuberculosis* es igual de sensible y específico que el cultivo (Estándar dorado).

CAPITULO IV

OBJETIVOS

Objetivo general

Validar clínicamente el diagnóstico serológico de TBP activa mediante un inmunoensayo basado en microesferas cubiertas con los antígenos ESAT-6 y CFP-10.

Objetivos específicos

- 1.- Realizar los exámenes para el diagnóstico convencional de TBP: PPD, baciloscopía, y cultivo en los pacientes con sospecha de esta infección.
- 2.- Realizar el ensayo de Quantiferon in tube (QFIT) en los pacientes con sospecha de TBP.
- 3.- Determinar la presencia de anticuerpos anti-ESAT6 y anti-CFP10 empleando microesferas cubierta con los antígenos.
- 4.- Determinar la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de las pruebas de laboratorios empleadas para el diagnóstico de TBP.
- 5.- Determinar los índices de concordancia entre cada uno de las pruebas de laboratorio.

CAPITULO V

MATERIAL Y METODOS

Población de estudio

Se incluyeron pacientes con los criterios de inclusión mencionados posteriormente en 4 instituciones médicas: Servicios Médicos UANL, Servicios Médicos del Municipio de Monterrey, Servicios Médicos de la Secc. 50 de los Trabajadores de la Educación y en el Hospital Universitario de la UANL.

Recursos biológicos

- 1.- Proteínas recombinantes ESAT-6 y CFP-10 de *M. tuberculosis*.
- 2.- Derivado proteico purificado (PPD).
- 3.- Anticuerpos anti-IgM y anti-IgG humanos conjugados con FITC o PE.
- 5.- Anticuerpos como controles de isótopo para citometría de flujo.
- 6.- Muestra de sangre venosa periférica.
- 7.- Esputo o lavado bronquial para baciloscopía y cultivo.
- 8.- QFIT

Recursos materiales

a) Lugar de Trabajo:

- 1) Servicio de Inmunología: Laboratorio de Inmunología Molecular
- 2) Servicio de Neumología: Laboratorio de Micobacteriología del CIPTIR

b) Equipos:

1. - FACS Sort (BD, San Jose, California)
- 2.- Campana de Bioseguridad nivel II (Nuaire)
- 3.- MGIT 960 (BACTEC)
- 4.- Microscopio de luz (CarlsZeiss)
- 5.- Incubadora de CO2 de 37 grados Celsius (Sanyo)
- 6.- Incubadora de 37 grados Celsius (Precision)
- 7.- Lector de microplacas (Biorad)
- 8.- Micropipetas (BioPette, Labnet)
- 9.- Ultracongelador -80 grados Celsius (Sanyo)
- 10.- Centrifuga refrigerada (Eppendorff)
- 11.- Vortex (Thermoline)
- 12.- Balanza analítica (Scientific)
- 13.- Hematocitómetro (Gibco)
- 14.- Computadora HP con Office XP 2000
- 15.- Software CellQuest (Análisis de muestras de citometría).
- 16.- Software GraphPrism (análisis Estadísticos).

c) Consumibles:

- 1.- Kits de QuantiFERON® TB Gold In-Tube (Cellestis)
- 2.- Tubos vacutainers con y sin heparina (BD)
- 3.- Aguja para vacutainer (BD)

- 4.- Puntillas para micropipetas de 10, 20, 200 y 1000 microlitros (Eppendorff)
- 5.- Caja para crioviales (Corning)
- 6.- Crioviales de 1.5 ml (Corning)
- 7.- Tubos eppendorff 1.5 ml (Eppendorf)
- 8.- Tubos para citometria de flujo (BD, Bioscience)
- 9.- FACS Flow (BD, Bioscience)
- 10.- Microesferas (Polyscience)
- 11.- Kit conjugación de microesferas (Polyscience)
- 12.- Placas de cultivo para micobacterias (Middlebrook 7H9, 7H10 Difco)
- 13.- Frascos de cultivo liquido con fluorescencia (BACTEC)
- 14.- Medio de cultivo L-J (Difco)
- 15.- Tubos cónicos 15 y 50 ml (Corning)

Recursos financieros

El costo aproximado de los consumibles y biológicos fue de \$267,310.00 y fue costado por fondos obtenidos en el Proyecto aprobado por SSA-ISSSTE-IMSS CONACYT con el número 68733 titulado “DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA PRUEBA DE DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR EMPLEANDO LOS ANTIGENOS ESAT-6 Y CFP-10 DE MYCOBACTERIUM

TUBERCULOSIS UNIDOS A MICROESFERAS” así como con fondos del CIPTIR.

Recursos metodológicos

Diseño experimental

Se realizó un estudio transversal para evaluar la utilidad clínica de una nueva prueba diagnóstica para TB. Para el cálculo del tamaño de muestra se consideró una prueba de dos colas con un valor de alfa de 0.05 y un poder de 0.9. El tamaño de muestra obtenido fue de 124 sujetos entre los que se incluyen los casos y los controles.

Se incluyeron de manera prospectiva todos los pacientes consecutivos evaluados por la sospecha clínica de TB durante un periodo de 12 meses. Se hizo la valoración clínica rutinaria completa y además se les extrajo en una sola ocasión una toma de sangre para los estudios propios de este protocolo. Las muestras de sangre de cada paciente se dividieron en 4 sets para su

procesamiento correspondiente para cada una de las pruebas diagnósticas inmunológicas. Las muestras de secreciones respiratorias se cultivaron para micobacterias y se revisó el resultado a las 8 semanas. Los pacientes fueron seguidos en la Clínica de TB para poder definir de manera clara el diagnóstico final de TBP activa. Se obtuvieron muestras de sujetos sanos PPD (+) y PPD (-) para ser usadas como controles en la estandarización del inmunoensayo. Se hizo el análisis estadístico comparativo de resultados y de concordancia solo en aquellos pacientes que tuvieron el diagnóstico de TB activa confirmado de manera categórica por un cultivo positivo para *M. tuberculosis*.

Selección de pacientes

Evaluación clínica al inicio del estudio: A todos los casos se les realizó una historia clínica y una exploración física completas. Se indicaron los estudios radiográficos pertinentes, incluyendo por lo menos una tele radiografía de tórax. Se hizo énfasis en determinar que el cuadro actual del paciente fuera un evento nuevo para descartar casos correspondientes a recaídas o fracasos terapéuticos. También se documentó la presencia o ausencia de cicatriz de BCG. Si después de esta valoración se consideró la posibilidad de TB activa, el paciente fue revalorado en el CIPTIR para su inclusión en el estudio. Se

realizaron baciloscopías de esputo las cuales fueron cultivadas para micobacterias. Si el paciente requirió una broncoscopía durante su evaluación preliminar, la muestra de lavado bronquioalveolar se procesó de la misma manera que el esputo.

Enrolamiento

Los pacientes con sospecha clínica de TB identificados en cualquiera de las áreas de atención del Hospital Universitario o de los servicios médicos previamente mencionados fueron referidos al CIPTIR para valorar su enrolamiento. La valoración se hizo por el Jefe de la Clínica de TB (Dr. Adrián Rendón), quién tiene amplia experiencia en la atención de esta enfermedad. Si el paciente reunió los criterios de Inclusión mencionados posteriormente, se le explicó el estudio y se le invitó a participar en él. Si el paciente aceptó participar, se le proporcionó y explicó la Carta de Consentimiento informado. Posteriormente, se le aplicó el PPD y se tomaron 2 muestras sanguíneas, una de ellas se procesó en el CIPTIR para QFIT y el resto se envió al Laboratorio de Inmunología. Se verificó que las muestras respiratorias previas de cada paciente se estuvieran procesando en el laboratorio de Micobacteriología del CIPTIR. De no ser así se tomaron nuevas muestras para baciloscopía y cultivo.

Criterios de inclusión

- 1.- Pacientes de cualquier raza o sexo ambulatorios u hospitalizados.
- 2.- Mayores de 18 años.
- 3.- Sospecha de TBP:
 - 3.1 Síntomas sugestivos de TBP: Tos por lo menos durante 2 semanas o hemoptisis o pérdida de peso sin otra causa obvia o diaforesis nocturna o fiebre,
 - 3.2 Hallazgos radiológicos compatibles con TB (con o sin síntomas): Afección de lóbulos superiores, cavitaciones, infiltrado fibrocavitario, nódulos.

Criterios de Exclusión

- 1.- Diagnóstico previo de TB (confirmado o presuntivo).
- 2.- Una semana o más de tratamiento antifímico.

- 3.- Sospecha o diagnóstico confirmado de infección con VIH.
- 4.- Infección por micobacterias no tuberculosas.
- 5.- Uso de inmunosupresores.

Clasificación de pacientes:

Se hizo una segunda evaluación clínica de cada paciente a los dos meses posteriores al enrolamiento. Durante esta se definió el diagnóstico final de cada uno en base a los resultados de cultivos, respuesta terapéutica y evolución clínica. Los pacientes se clasificaron como:

- TBP activa: cultivo (+)
- No TBP: otro diagnóstico o mejoró sin tratamiento para TB
- Sin diagnóstico final: información insuficiente

Para propósitos de este estudio los casos son aquellos con diagnóstico definitivo de TBP y el resto con otro diagnóstico se consideraron controles. Se excluyeron los casos con duda diagnóstica.

Procedimientos durante el estudio

PPD

Fue aplicado por una enfermera experta en la técnica de Mantoux: Intradermorreacción en el antebrazo derecho, con lectura a las 72 horas posteriores a la aplicación. Se usó PPD-TUBERSOL administrando 10UI (0.1ml). Se consideró un PPD (+) cuando se midió una induración ≥ 10 mm de diámetro. La medida se hizo con la técnica del bolígrafo. En los sujetos con PPD (-) se repitió la aplicación al mes de tratamiento para descartar la posibilidad de anergia inducida por la misma TB.

Baciloscopia y Cultivo para micobacterias:

Las muestras respiratorias fueron procesadas siguiendo los procedimientos convencionales usados en el Laboratorio de Micobacteriología del CIPTIR. Este laboratorio tiene un nivel III y capacidad para identificar los diferentes tipos de micobacterias. Se siguieron las recomendaciones publicadas por la Organización Panamericana de la Salud y del Center for Disease Control. Cada muestra fue digerida, descontaminada y concentrada. Se hizo una extensión para ser teñida con la coloración de Ziehl-Nielssen. Los resultados se expresaron en cruces de acuerdo a la cantidad de micobacterias observadas. Del mismo concentrado de la muestra se usó una porción para cultivo convencional en medio de L-J. Otra porción se sembró en medios líquidos de BACTEC. La lectura del cultivo de L-J se hizo al mes y a los 2 meses. La lectura (+) se reportó en el momento de tenerse. La lectura (-) se realizó hasta después de haber pasado 2 meses. Los cultivos en BACTEC se leyeron cada 24 horas y se dió un resultado positivo tan pronto se tuvo. El resultado (-) se dió hasta después de un mes de lecturas negativas.

QuantIFERON TB Gold In-Tube (Cellestis)

El sistema de QuantiFERON®-TB Gold IT emplea tubos especializados para la recolección de muestras por punción venosa que contienen antígenos de *M. tuberculosis* [ESAT-6, CFP-10 y TB7.7 (p4)] o controles. Una vez extraída la muestra sanguínea se vertió directamente dentro de los tubos y se agitó. La sangre fue incubada en los tubos por 16 a 24 horas. Posteriormente, los tubos se centrifugaron. El plasma se recuperó y almacenó a -20°C hasta su uso. 50 microlitros de plasma de cada tubo fueron transferidos a microplacas precubiertas con anticuerpos anti-IFN γ y se adicionaron 50 microlitros del conjugado a cada pocillo. Se incluyeron estándares de diferentes concentraciones de IFN- γ para realizar la curva estándar y calcular la concentración en nuestras muestras. Las placas se colocaron en un agitador automático y se incubaron a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las placas antes de agregarles 100 microlitros de sustrato e incubarlas nuevamente. Se adicionó una solución para detener la reacción y en seguida se usó un lector de ELISA para determinar la absorbancia a 450nm. Los resultados se cuantificaron usando el programa computarizado de Excel para obtener la curva estándar. Los valores de nuestros pacientes fueron extrapolados en dicha curva para obtener resultados cualitativos: positivo, negativo e indeterminado.

El personal encargado de realizar esta prueba recibió entrenamiento en las instalaciones del fabricante en Los Angeles EUA.

Inmunoensayo con microesferas y ESAT-6/CFP-10 leído con citometría de flujo

Las proteínas recombinantes ESAT-6 y CFP-10 de *M. tuberculosis* fueron producidas en el Servicio de Inmunología de esta Facultad usando la cepa BL21 de *E. Coli*. Se usó una cola de Histidina para facilitar su purificación mediante columnas de níquel. Una vez recuperadas las proteínas recombinantes, se llevó un control de calidad de expresión y reactividad a sueros mediante geles de poliacrilamida y Western blot. Después de este proceso, las proteínas recombinantes se conjugan con las microesferas con grupos COOH libre por el método de la carbodiimida. El método fue estandarizado para la detección de anticuerpos en sueros humanos en el Servicio de Inmunología. A continuación se describen los detalles del presente trabajo de tesis que pretende validar dicha prueba y compararla con las anteriormente mencionadas.

**Validación del inmuno ensayo con sueros de sujetos sanos PPD (+) y (-),
así como sueros de pacientes con TB cultivo (+):**

Los ensayos se realizaron empleando las microesferas cubiertas con los antígenos de *M. tuberculosis* y sueros de pacientes conocidos con Tuberculosis pulmonar cultivo (+) y controles sanos. Para estos se emplearon el siguiente panel Microesferas-ESAT-6, y Microesferas-CFP-10. Lo anterior se realizó para la detección de anticuerpos IgG de pacientes y sujetos sanos PPD-positivos/negativos. En este caso, se empleó un anticuerpo secundario anti- IgG humano conjugado con PE (ficoeretrina). Se realizaron lavados para eliminar el anticuerpo no unido y se resuspendieron. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FASC Sort (San Jose, California) y utilizando el software CellQuest. Se encontraron las diluciones a usar en nuestro estudio (1000c para ESAT-6 y 100c para CFP-10) y los puntos de corte para los valores de positividad en base a la intensidad media de fluorescencia: 50 para ESAT-6 y 200 para CFP-10.

Lo anterior se muestra en los siguientes histogramas (Fig. 1) (Fig.2 véase página siguiente.):

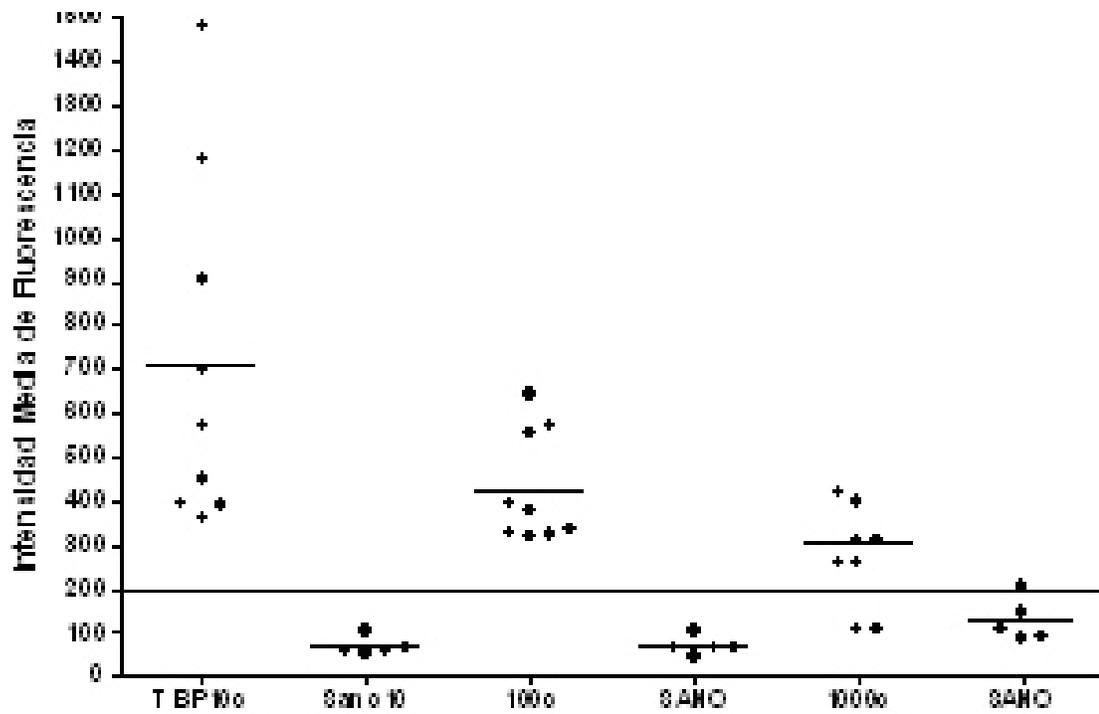


Figura 1 Detección de anticuerpos IgG humanos anti CFP10 usando microesferas

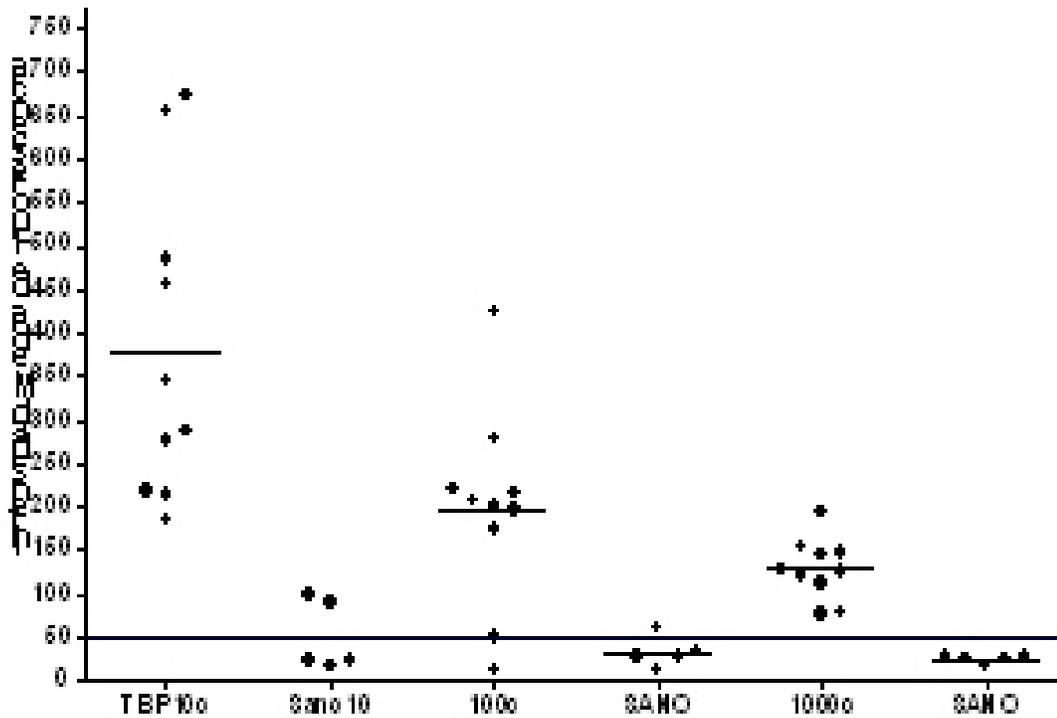


Figura 2 Detección de anticuerpos IgG humanos anti ESAT-6 usando microesferas

A diferencia de este ensayo preliminar, realizado retrospectivamente, nuestro estudio se hizo prospectivamente en pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar activa con el objeto de validar la utilidad clínica del ensayo.

Análisis de datos.

Se integró una base de datos computarizada. Los datos fueron analizados usando el programa estadístico SPSS y GraphPad. Se compararon los resultados del inmunoensayo de microesferas en 2 grupos: TB activa y No TB activa. Se calcularon la sensibilidad, especificidad y valores predictivo para cada prueba individual y en comparación de cada una de ellas contra la técnica de microesferas. Los resultados de concordancia de las pruebas cualitativas se determinaron por el índice de kappa y la significancia de la discordancia de las pruebas pareadas se hizo con la prueba de chi cuadrada de McNemar. Se usó el modelo paramétrico de Knottnerus para determinar si la combinación del inmunoensayo de microesferas con los otros métodos genera un valor diagnóstico adicional.

CAPITULO VI

RESULTADOS

Se incluyeron 106 pacientes, 53 casos (50%) y 53 controles (50%) tomando como gold standard el cultivo para micobacterias. Hubo 55 hombres (51.9%) y 51 mujeres (48.1%) con una edad media de 46.7 años (± 20.1) (Tabla 1).

Tabla 1

Datos demográficos

	Casos (n= 53)	Controles (n= 53)	<i>P</i>
Sexo			
Masculino	31	24	
Femenino	22	29	0.243
Edad media	40.4	52.98	0.001

Se analizaron las co-morbilidades presentes en cada uno de los grupos, no encontrándose diferencia estadísticamente significativa a excepción de los casos con diabetes mellitus. (Tabla 2)

Tabla 2

Comorbilidades: Casos vs controles

Co-morbilidad	Casos (n= 53)	Controles (n= 53)	<i>P</i>
OH	15 (28.3%)	13 (24.5%)	0.826
Drogas	2 (3.77%)	3 (5.66%)	0.538
Riesgo VIH	4 (7.5%)	3 (5.66%)	0.094
HTA	5 (9.4%)	6 (11.3%)	1
Trasplante	0	0	
Malnutrición	1 (1.8%)	1 (1.8%)	1
ERC	2 (3.77%)	2 (3.77%)	1
DM	13 (24.5%)	2 (3.77%)	0.004

Los diagnósticos de los controles (N=53) fueron los siguientes (Tabla 3)

Tabla 3.

Diagnósticos identificados en los casos sin TB (N=53)

Cáncer Pulmonar	28.3% (15)
Neumonía	11.3% (6)
IVRS	11.3% (6)
Asma	9.4% (5)
Bronquitis	9.4% (5)
Empiema	7.5% (4)
EPOC	7.5% (4)
Fibrosis Intersticial	3.7 % (2)
Neumoconiosis	3.7% (2)
Coccidioidomicosis	3.7% (2)
Atelectasia	1.8% (1)
Micobacteria no TB	1.8% (1)

Se analizó el riesgo de TBP en base a la historia de exposición: casos 19.6% vs controles 8.8%, OR 22.694, p 0.047.

A todos los pacientes se les realizaron baciloscopía y PPD. Los resultados en los casos fueron (Tabla 4):

Tabla 4

Resultados de Baciloscopia y PPD entre los casos con TBP

	Baciloscopía	PPD
Sensibilidad	69.8%	88.2%
Especificidad	98.1%	88.7%
Valor predictivo positivo	97.4%	88.2%
Valor predictivo negativo	76.5%	88.7%

Todos los controles tuvieron baciloscopías negativas con excepción de un caso positivo que resultó ser una micobacteria no tuberculosa identificada en el cultivo. El PPD fue negativo en 50 (94.3%) de 53 de los controles.

El QFIT fue positivo en el 83.1% (sensibilidad) de los casos y en el 32.2% de los controles, con una especificidad de 75.6%, un VPP de 73.9% y un VPN de 84.2%.

Se realizó serología en todos los pacientes utilizando microesferas cubiertas de los antígenos CFP-10 y ESAT-6. Primero se determinó la presencia de anticuerpos IgG o IgM contra los antígenos individuales y posteriormente se hicieron todas las combinaciones posibles (IgG y/o IgM, CFP-10 y/o ESAT-6) buscando la mejor sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos (Tabla 5) (Figura 3, 4, 5, 6 véase páginas siguientes).

Tabla 5

Resultado de la detección de anticuerpos contra ESAT-6 y CFP-10:
Sensibilidad, Especificidad, VPP y VPN

	CFP10IgG	ESAT6IgG	ComblgG	CFP10IgM	ESAT6IgM	ComblgM	ComblgG/IgM
Sensibilidad	18.9%	41.5%	49.1%	37.7%	20.8%	41.5%	58.5%
Especificidad	77.4%	79.2%	64.2%	94.3%	92.5%	90.6%	54.7%
VPP	45.5%	66.7%	57.8%	87%	73.3%	81.5%	56.4%
VPN	48.8%	57.5%	55.7%	60.2%	53.8%	60.8%	56.9%

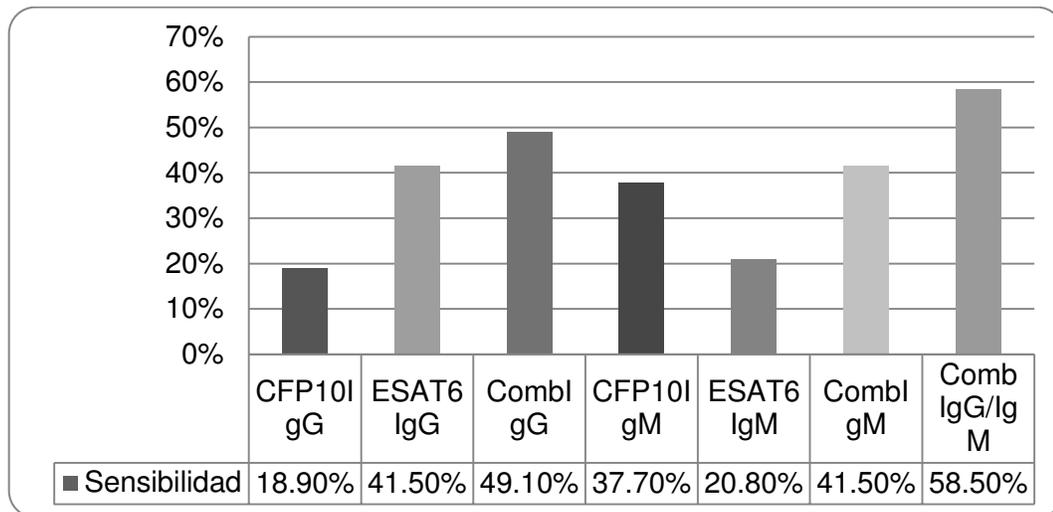


Figura 3 Valores de sensibilidad para Ac contra ESAT-6 y CFP-10

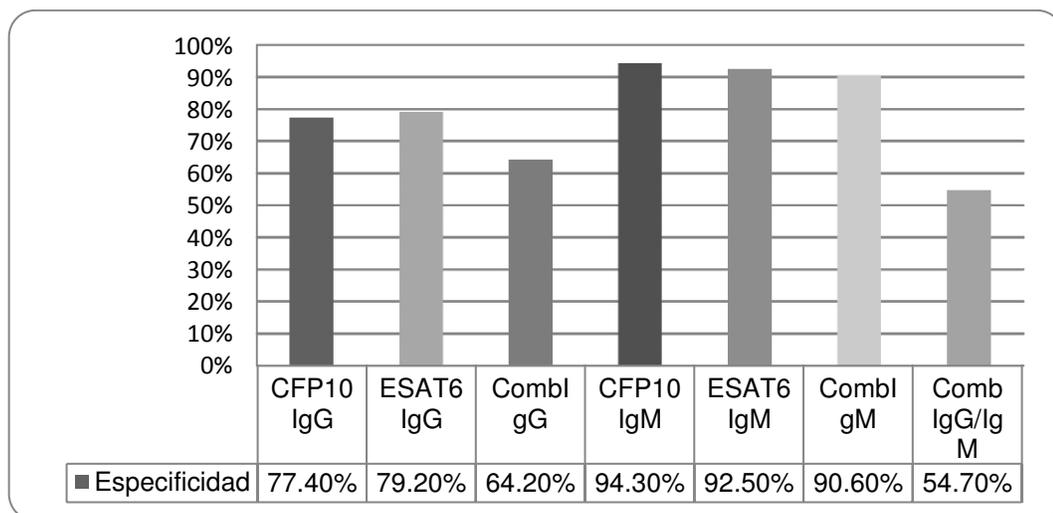


Figura 4 Valores de especificidad para Ac contra ESAT-6 y CFP-10

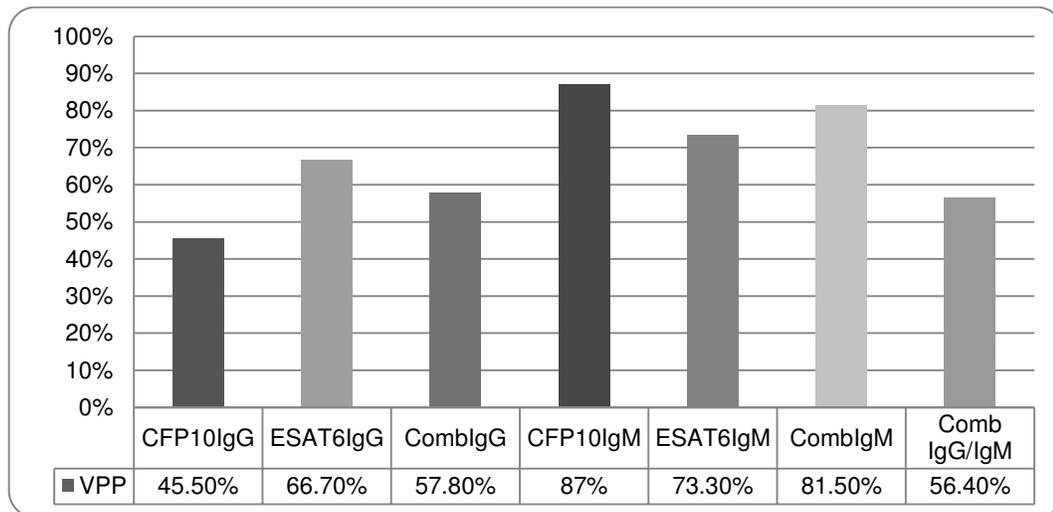


Figura 5 Valor predictivo positivo para Ac contra ESAT-6 y CFP-10

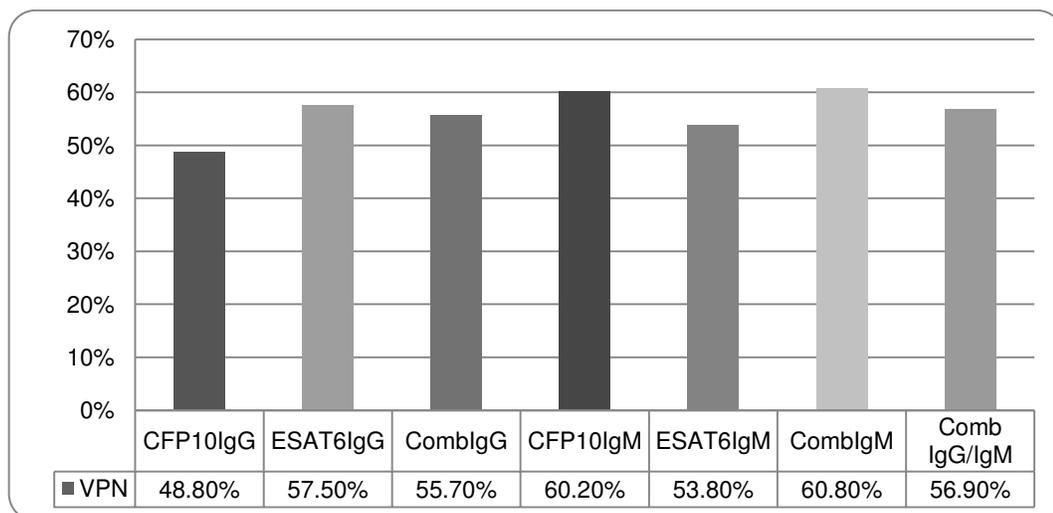


Figura 6 Valor predictivo negativo para Ac contra ESAT-6 y CFP-10

Se comparó la diferencia entre los anticuerpos IgG o IgM para cada uno de los antígenos mediante el LR+ (razón de verosimilitud) (Tablas 6) (Tabla 7 véase siguiente página).

Tabla 6

Comparativo de IgG e IgM contra CFP-10

	CFP-10 IgG	CFP-10 IgM
Sensibilidad	18.9%	37.7%
Especificidad	77.4%	94.3%
VPP	45.5%	87%
VPN	48.8%	60.2%
LR+	0.8362	6.614

Tabla 7

Comparativo de IgG e IgM contra ESAT-6

	ESAT-6 IgG	ESAT-6 IgM
Sensibilidad	41.5%	20.8%
Especificidad	79.2%	92.5%
VPP	66.7%	73.3%
VPN	57.5%	53.8%
LR+	1.99	2.77

Se hizo el mismo análisis combinando los dos antígenos para cada uno de los anticuerpos IgG o IgM (Tabla 8).

Tabla 8

Comparativo de IgG contra ESAT-6 o CFP-10
y de IgM Contra ESAT-6 o CFR-10

	IgG vs ESAT-6 y/o CPF-10	IgM ESAT-6 y/o CPF- 10
Sensibilidad	49.1%	41.5%
Especificidad	64.2%	90.6%
VPP	57.8%	81.5%
VPN	55.7%	60.8%
LR+	1.3715	4.414

Se analizó la concordancia entre cada una de las pruebas mediante el índice de kappa

Tabla 9

Valores de concordancia para cada una de las pruebas diagnósticas realizadas

Pruebas			Índice kappa
PPD	vs	BAAR	0.575
PPD	vs	CFP10IgG	-0.108
PPD	vs	ESAT6IgG	0.148
PPD	vs	CFP10IgM	0.184
PPD	vs	ESAT6IgM	0.064
BAAR	vs	CFP10IgG	-0.085
BAAR	vs	ESAT6IgG	0.218
BAAR	vs	CFP10IgM	0.348
BAAR	vs	ESAT6IgM	0.077
IgG vs ESAT-6 y/o CPF-10	vs	BAAR	0.074
IgG vs ESAT-6 y/o CPF-10	vs	PPD	0.036
IgM vs ESAT-6 y/o CPF-10	vs	BAAR	0.321
IgM vs ESAT-6 y/o CPF-10	vs	PPD	0.185
IgG/IgM vs ESAT-6 y/o CPF-10	vs	BAAR	0.123
IgG/IgM vs ESAT-6 y/o CPF-10	vs	PPD	0.040

La concordancia del QFTB con los anticuerpos fue: CFP-10 IgG, 0.210, CFP-10 IgM, 0.032, ESAT-6 IgG, 0.081, ESAT-6 IgM, 0.012.

CAPITULO VII

DISCUSIÓN

La OMS está promoviendo extensas campañas alrededor del mundo con la finalidad de revertir la epidemia creciente de TB. Los esfuerzos no han sido suficientes ya que el retraso en el diagnóstico sigue siendo un serio problema. En el 2011, solo el 66% de los casos nuevos en el mundo fue notificado y alrededor de un tercio de ellos no tuvo confirmación bacteriológica.³ Si bien el retraso en el diagnóstico es multifactorial, uno de los principales problemas es la falta de eficiencia de los procedimientos diagnósticos actuales como la baciloscopia y el cultivo.⁵⁷ El desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas se ha vuelto una prioridad para la OMS⁵⁸ pero la falta de fondos ha limitado su desarrollo.³

El cultivo de micobacterias sigue siendo el estándar dorado para el diagnóstico con serios inconvenientes, retraso de semanas a meses en el reporte del resultado y alto costo, lo cual lo hace inaccesible en los lugares de mayor endemia que tristemente son también los de menores recursos. La baciloscopia, simple y barata, tiene una alta especificidad en las zonas

endémicas de TB pero adolece de una sensibilidad adecuada lo cual ocasiona que se pierdan casi la mitad de los nuevos casos.⁵⁹

Las pruebas con ácido nucleicos siguen evolucionando pero aún no definen su lugar en el algoritmo diagnóstico y acarrear también el inconveniente de un alto costo.⁶⁰

El diagnóstico serológico de la TB ha sido explorado por años ya que ofrece la posibilidad de tener una prueba eficiente y costo efectivo que pueda ser realizada en una muestra sanguínea única. Cada vez es mejor comprendido el papel que juega la respuesta inmune humoral en la TB y su papel facilitador en el desarrollo de la respuesta de hiperreactividad celular tardía. Uno de los principales problemas en el desarrollo de una prueba serológica es que existen múltiples antígenos de la micobacteria que generan producción de anticuerpos, y que el patrón en el que se manifiesta este fenómeno es variable en cada una de las etapas fisiopatogénicas de la TB y además también es muy variable de paciente a paciente.⁶¹

La lista de antígenos conocidos a la fecha es larga lo mismo que las técnicas para identificarlos.⁵⁹ Existen diversos paquetes comerciales para el diagnóstico serológico de la TB los cuales son basados principalmente en ensayos de flujo lateral o en ELISA cuyo uso se volvió popular a pesar de no tenerse recomendaciones claras para su uso.⁵⁷ Desafortunadamente, los resultados de una revisión en la que se incluyeron 254 estudios en los que se

evaluaron 51 antígenos de manera individual, así como 30 antígenos en combinaciones diversas, concluyen que ninguna de las pruebas serológicas disponibles es suficientemente sensible para sustituir a la baciloscopía.⁶² La OMS hizo una evaluación semejante de 19 pruebas serológicas comerciales y llegó a la misma conclusión.⁶³ Otro estudio independiente más reciente, también tuvo los mismos hallazgos de la OMS. Los problemas observados en los estudios previos incluyen falta de estandarización de las técnicas, uso de diferentes antígenos, pacientes en diversas etapas de la TB y con enfermedades coexistentes y falta de controles entre los que se incluyan pacientes sintomáticos respiratorios sin TB.⁶⁴ A pesar de que no se tiene una buena prueba serológica aún, la OMS no descartó la posible utilidad de estas pruebas y ha incentivado a los investigadores a tratar de mejorarlas.⁶³

Dentro del proceso de desarrollo de una prueba serológica es clave seleccionar dentro de los antígenos conocidos, los más específicos y buscar una técnica para detectarlos con una alta sensibilidad.⁵⁹ Recientemente ESAT-6 y CFP-10 han sido usados ampliamente para retar la respuesta inmune celular debido a su alta especificidad y a que no tienen reacción cruzada con BCG. Lo interesante es que estas dos proteínas son antigénicas y capaces de provocar respuesta humoral, con la formación de anticuerpos que pueden ser detectados en el suero.⁵⁰⁻⁵⁶

La técnica tradicional de ELISA puede ser superada en su sensibilidad mediante el uso de microlechos que facilitan la detección de varios antígenos de forma simultánea. Las microesferas cubiertas con antígenos pueden servir

para el mismo objetivo. La citometría de flujo es un procedimiento útil para la detección de diversas partículas. Estas partículas pueden ser microesferas portadoras de diferentes proteínas antigénicas, las cuales al ser marcadas, pueden ser detectadas y medidas, convirtiendo el procedimiento en un inmunoensayo.³⁶⁻⁴⁵

A diferencia de los inmunoensayos previamente descritos, nosotros estudiamos un ensayo novedoso que incorporó el uso de dos de los antígenos más específicos conocidos de *M. tuberculosis*, ESAT-6 y CFP-10 los cuales fueron acoplados a microesferas con la finalidad de facilitar la detección de anticuerpos contra ellos mediante citometría de flujo. El propósito fué aumentar la sensibilidad del ensayo sin sacrificar su especificidad. Nuestra hipótesis fue que la detección de anticuerpos contra ESAT-6 y CFP-10 acoplados a microesferas era un inmunoensayo igual de sensible y específico que el cultivo.

Decidimos usar como controles pacientes con síntomas respiratorios que pudieran ser confundidos con TB y como casos usamos a pacientes con diagnóstico definitivo de TB confirmado por cultivo. Las características de nuestros dos grupos de estudio fueron semejantes en cuanto a género y la mayoría de las comorbilidades. Si hubo diferencia en la edad media siendo los casos más jóvenes que los controles (40 años vs 53, p 0.0001). También la presencia de DM fue mayor en el grupo de los casos que en los controles (24.5% vs 3.8%, p 0.0004). Como era de esperarse, la baciloscopía y el PPD tuvieron una alta sensibilidad (69.8% y 88.2% respectivamente) y especificidad

(98.1 y 88.7% respectivamente). Para la detección de anticuerpos usamos varias estrategias que incluyeron todas las combinaciones posibles: la búsqueda de anticuerpos anti IgG o IgM contra los antígenos individuales, la búsqueda simultánea de los dos anticuerpos contra los dos antígenos. De esta manera tuvimos un panel de 7 posibles resultados, a cada uno de los cuales se le determinó la sensibilidad y especificidad así como los valores predictivos positivo y negativo, con el objetivo de poder determinar su posible utilidad clínica. La sensibilidad para encontrar anticuerpos IgG o IgM contra ESAT-6 fue 41.5% y 20.8% respectivamente. La sensibilidad para encontrar anticuerpos IgG o IgM contra el antígeno CFP-10 fue 18.9% y 37.7% respectivamente. La mejor sensibilidad se obtuvo al encontrar anticuerpos IgG o IgM contra cualquiera de los dos antígenos, 58.5%. Estos resultados por sí solos no son alentadores. Nuestra prueba mostró el mismo problema reportado previamente con otros antígenos, la falta de sensibilidad.⁶³⁻⁶⁵ Esto pudiera ser debido a que la respuesta inmune humoral no muestra su máxima manifestación en la etapa inmediata previa al diagnóstico, etapa en la que estudiamos a nuestros pacientes, lo cual puede condicionar que los niveles de anticuerpos sean bajos y por lo tanto no detectables. Debe considerarse además que los antígenos que usamos no sean realmente muy inmunogénicos y generadores de títulos altos de anticuerpos. Otra explicación también muy pertinente, pudiera ser un defecto inherente a la técnica que empleamos para la identificación de los anticuerpos. Un estudio reciente que usó una proteína fusionada ESAT 6-CFP10 reportó una mejor sensibilidad usando ELISA indirecta pero el tipo de pacientes estudiado fue diferente al nuestro.⁶⁶ Si bien la sensibilidad que observamos no fue con

mucho la que anticipábamos, probablemente lo más importante que encontramos en nuestro estudio fue lo relacionado a la especificidad. Al buscar anticuerpos IgG ya sea contra ESAT-6 o contra CPF-10, la especificidad de una prueba positiva fue de 64.2 y 77.4% respectivamente, números aun no muy espectaculares. Pero al ver los resultados de la detección de IgM contra cualquiera de los antígenos, lo que observamos fue una especificidad excelente de 92.5 y 94.3% (ESAT-6 y CPF-10) con valores predictivos positivos de 73.3 y 87% respectivamente. Los valores de alta especificidad en un inmunoensayo usando ESAT 6 y CFP 10 ha sido reportado recientemente en otros estudios.⁶⁷⁻

⁶⁸ En el contexto de la evaluación de un paciente con síntomas respiratorios en el que se está tratando de llegar a un diagnóstico que incluye TB en el diferencial, una prueba diagnóstica con una alta especificidad puede ser de mucha utilidad para el clínico, sobre todo en el caso de los pacientes con diagnóstico difícil mientras se espera el resultado de los cultivos, o cuando se carece de ellos. El tener una prueba de anticuerpos de este tipo negativa no descartaría el diagnóstico de TB. Por otro lado, el tener anticuerpos IgM positivos contra cualquiera de los antígenos haría mucho más probable que nuestro paciente estuviera sufriendo de TB. El otro aspecto que nosotros quisimos estudiar fue la concordancia de la determinación de anticuerpos contra los otros estudios diagnósticos, principalmente la baciloscopía y el cultivo. Utilizando nuevamente diferentes combinaciones posibles de antígenos y anticuerpos, ya sea que se compararan aisladamente o en combinaciones, no encontramos en ninguna comparación una concordancia que fuera por lo menos buena; la mejor fue entre los anticuerpos IgM contra CFP-10 y la

baciloscopía (índice de kappa de 0.348). Esta discordancia era esperada y se explica porque las pruebas que usamos miden actividades diferentes que se desarrollan durante la infección tuberculosa. Los anticuerpos miden inmunidad humoral, el PPD mide inmunidad celular, la baciloscopía y el cultivo miden carga bacilar. Esta falta de concordancia debe entenderse en el contexto clínico de los enfermos y deben considerarse como pruebas complementarias y/o secuenciales en el abordaje diagnóstico. La negatividad de una prueba no descarta la positividad de las otras.

En nuestro estudio tuvimos la fortaleza de incluir casos con diagnóstico confirmado de TB en base a tener el estándar dorado, un cultivo positivo para *M. Tuberculosis* y además controles sintomáticos en los que se tenía la sospecha de TB, lo cual refleja más el dilema al que se enfrenta un clínico en la vida diaria. Por motivos de diseño no incluimos pacientes con TB y cultivo negativo, grupo de pacientes que no son tan inusuales en la práctica habitual y en el que no podemos transpolar nuestros resultados directamente. Otro factor a considerar como influyente en nuestros resultados es la diferencia en edad en ambos grupos y el predominio de diabéticos en el grupo de los casos con TB. El como la edad pueda influenciar la respuesta humoral en TB se desconoce pero la DM claramente se ha relacionado con alteraciones inmunológicas.⁶⁹

Nuestros resultados confirman que la técnica de las microesferas puede ser útil para la detección de anticuerpos. Además de aportar una nueva técnica diagnóstica en TB, también aportamos resultados que pudieran ser de mucha

utilidad clínica. La demostración de esto último ameritaría un estudio con un diseño diferente.

CAPITULO VIII

CONCLUSIÓN

La detección por citometría de flujo de IgG o IgM contra ESAT-6 y/o CFP-10 en microesferas cubiertas con estos antígenos, tiene una mayor sensibilidad y especificidad cuando se hace combinada que cuando se hace contra los antígenos individuales. Una prueba positiva para IgM contra los dos antígenos combinados tiene una especificidad y un valor predictivo positivo muy alto. Debido a que la concordancia de nuestro inmunoensayo (combinado) con el BAAR o el cultivo no es buena, estas pruebas pueden considerarse como complementarias pero el cultivo debe seguir siendo considerado como el estándar dorado.

Las recomendaciones para el clínico que pudiéramos hacer en base a nuestros resultados son que usando la detección combinada de IgG e IgM contra la combinación de antígenos ESAT-6 y CFP-10 se tiene una herramienta diagnóstica que nos ofrece una buena sensibilidad y una alta especificidad con un valor predictivo positivo alto que puede tener mucho valor en los pacientes

con sospecha de TB que son BAAR (-) ya que ahorraría el tiempo de espera que requiere el cultivo.

CAPITULO IX

ANEXOS

Cuestionarios

A continuación se anexan los formatos (véase siguientes páginas).

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA PRUEBA DIGNÓSTICA
DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR EMPLEANDO LOS ANTÍGENOS
ESAT-6 Y CFP-10 DE M. TUBERCULOSIS UNIDOS A MICROESFERAS**

Evaluidor _____ Fecha _____ No. _____

I – Sección 1:

a) **DIAGNÓSTICO FINAL** *(Lo llenará el Dr. Rendón)*

1. TB pulmonar activa – cultivo positivo
2. TB pulmonar activa – cultivo negativo, (BAAR, RX y síntomas, respuesta a antifímicos)
3. TB inactiva (tuvo TB)
4. TB latente (asintomático PPD+)
5. Tb extrapulmonar
6. No TB – se hizo otro diagnóstico _____
7. No se logra hacer un diagnóstico con certeza

b) **CLASIFICACIÓN PARA EL PROTOCOLO** *(Se llena al final)*

Caso (TB pulmonar presente, de recién diagnóstico) _____ BCG _____

Sospecha de TB _____ BCG _____

II – Sección 2: deberá ser completada para todos los Casos y todos los Controles

a) **DEMOGRÁFICOS**

Nombre _____

Registro _____ Género _____ Año de nacimiento: _____ Edad _____

Dirección _____

Teléfono _____

País de Nacimiento _____

Ciudades en que ha vivido y fechas:

Ascendencia

1. Categoría Étnica: Hispánica No Hispánica
2. Categoría Racial: (una ó más)

<input type="checkbox"/> Amerindio / Nativo de Alaska	<input type="checkbox"/> Blanco
<input type="checkbox"/> Asiático	<input type="checkbox"/> Negro
<input type="checkbox"/> Nativo de Hawaii o Islas del Pacífico	
<input type="checkbox"/> Indígena nacional	<input type="checkbox"/> Mestizo
3. Ascendencia de los padres: _____

Comentarios: _____

b) HISTORIA SOCIAL

1. ¿>500cc de alcohol por semana >2 meses? Sí No Desconocido

2. ¿Consumo de drogas ilícitas en los últimos 2 años? Sí No Desconocido

3. ¿Riesgo de VIH? Sí No Desconocido

4. ¿Contacto con alguien enfermo de tuberculosis? Sí No Desconocido

5. ¿Historia de tuberculosis en la familia? Sí No Desconocido

6. ¿Historia personal de TB?
Si es así, Fecha _____

7. ¿Se ha realizado un PPD?
 Sí resultado (+) _____, (-) _____ No sabe _____ No Desconocido

8. Comorbilidades

<input type="checkbox"/> Diabetes Mellitus	<input type="checkbox"/> Insuficiencia renal	<input type="checkbox"/> CA cuello / Ca pulmón
<input type="checkbox"/> Trasplante	<input type="checkbox"/> Leucemia / Linfoma	<input type="checkbox"/> Silicosis
<input type="checkbox"/> Pobre nutrición	<input type="checkbox"/> Droga inmunosupresora (15mg de prednisona/día 1 mes)	
<input type="checkbox"/> VIH	<input type="checkbox"/> Alcoholismo	<input type="checkbox"/> Cirrosis
<input type="checkbox"/> Drogadicción		
<input type="checkbox"/> Otros: _____		

9. BCG Sí No Desconocido (Busque en ambos hombres la cicatriz)
Año de vacunación: _____

III - Sección 3: CLASIFICACIÓN (Solo para los CASOS: pacientes con TB o con sospecha de TB activa).

1. ¿Caso de TB pulmonar?
 No (pase a la siguiente sección)
 Sí: Activo Edad al diagnóstico _____

2. Confirmación de diagnóstico por:
Cultivo (+) _____
BAAR (+) más cuadro clínico-radiológico _____
Cultivo y BAAR (-), Cuadro clínico- radiológico, respuesta terapéutica _____
BAAR _____ (esputo _____, lavado _____, biopsia _____)
Cultivo _____
RX; ni _____ ni compatible con TB _____ otro dx _____

Comentarios: _____

IV- Sección 4: HISTORIA CLÍNICA (Solo para los CONTROLES ASINTOMÁTICOS - no han tenido TB) INVESTIGAR SI ESTO SUCEDIÓ EN EL PASADO

1. ¿Ha padecido TB? Sí Cuando _____ No Desconocido _____

2. Alguna vez, ¿tos por más de dos semanas? Sí No Desconocido

3. ¿Fiebre por más de dos semanas? Sí No Desconocido

4. ¿Sudores? (Mojar las sábanas >3 veces/semana) Sí No Desconocido

5. ¿Pérdida de peso más de 5 kg sin causa? Sí No Desconocido

6. ¿Hemoptisis? Sí No Desconocido

7. ¿Terapia por tiempo prolongado (meses) que pudieran ser antifímicos? _____

8. Afirmativo a cualquiera: diagnóstico que se hizo _____

V – Sección 5: HISTORIA CLÍNICA (solo para los que no se sabe que tengan TB y que tengan síntomas actualmente – **CONTROLES SINTOMÁTICOS**)

1. ¿Tos por más de dos semanas?	<input type="checkbox"/> Sí	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Desconocido	
Si es así, ¿desde cuándo?	<input type="checkbox"/> <7 días	<input type="checkbox"/> 8-13 días	<input type="checkbox"/> 14-20 días	<input type="checkbox"/> >21 días
2. ¿Fiebre?	<input type="checkbox"/> Sí	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Desconocido	
Si es así, ¿desde cuándo?	<input type="checkbox"/> <7 días	<input type="checkbox"/> 8-13 días	<input type="checkbox"/> 14-20 días	<input type="checkbox"/> >21 días
3. ¿Sudores? (Moja las sábanas >3 veces/semana)	<input type="checkbox"/> Sí	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Desconocido	
Si es así, ¿desde cuándo?	<input type="checkbox"/> <7 días	<input type="checkbox"/> 8-13 días	<input type="checkbox"/> 14-20 días	<input type="checkbox"/> >21 días
4. ¿Pérdida de peso?	<input type="checkbox"/> Sí	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Desconocido	
Si es así, ¿cuánto?	<input type="checkbox"/> <2kg	<input type="checkbox"/> 2-5kg	<input type="checkbox"/> 6-10kg	<input type="checkbox"/> >10kg
Si es así, ¿en qué periodo?	<input type="checkbox"/> <1 mes	<input type="checkbox"/> 1-3 meses	<input type="checkbox"/> 3-6 meses	<input type="checkbox"/> >6 meses
5. ¿Hemoptisis?	<input type="checkbox"/> Sí	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Desconocido	
Si es así, ¿desde cuándo?	<input type="checkbox"/> <7 días	<input type="checkbox"/> 8-13 días	<input type="checkbox"/> 14-20 días	<input type="checkbox"/> >21 días
6. Otro diagnóstico que no sea TB:				
<input type="checkbox"/> Neumonía _____				
<input type="checkbox"/> EPOC _____				
<input type="checkbox"/> Cáncer pulmón _____				
<input type="checkbox"/> Asma _____				
<input type="checkbox"/> Coccidioidomicosis _____				
<input type="checkbox"/> Otro: _____				

VI – Sección 6: SEGUIMIENTO A 2 MESES (Para pacientes sintomáticos sin diagnóstico inicial)

1. Basado en el seguimiento, el paciente está:
<input type="checkbox"/> Sano <input type="checkbox"/> Aún enfermo
2. Diagnóstico de seguimiento (<i>Marque uno</i>):
<input type="checkbox"/> TB pulmonar activa Cultivo (+) _____ BAAR (+) _____ CC y RX _____
<input type="checkbox"/> No TB – se hizo otro diagnóstico _____
<input type="checkbox"/> TB inactiva
<input type="checkbox"/> TB latente
<input type="checkbox"/> Tb extrapulmonar

VII – Sección 7: Resultado de Pruebas Diagnósticas para M. Tuberculosis

Baciloscopia	Cultivo	PPD	Quantiferon	Serología	Microesferas IgM IgG

Evalrador: _____

Carta de consentimiento



SUB-DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN
DE POST-GRADO

CARTA DE CONSENTIMIENTO

Yo _____ se me ha invitado a participar en el estudio de investigación titulado "Desarrollo y validación de una prueba diagnóstica de la tuberculosis pulmonar empleando los antígenos ESAT-6 y CFP-10 de *Mycobacterium tuberculosis* unidos a microesferas". Durante los estudios relacionales de manera rutinaria, se realizarán tomas de muestras de sangre. Se me ha informado que se me realizará una toma de muestra de sangre para la obtención de sueros y células que serán empleados para la optimización de la prueba y se me determinará mi positividad a la prueba de PPD a través de una intradermoreacción. Se me ha comunicado que se parte de dichas muestras se utilizarán para la realización de estudios de investigación en los que se buscará la presencia de anticuerpos contra los antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* causante de la tuberculosis. Se me ha dicho que al aceptar participar en el proyecto de investigación los resultados obtenidos serán manejados en forma confidencial, que en ningún momento se violará mi privacidad, ya que las muestras se tomarán durante los procedimientos de rutina indicados en el estudio clínico convencional. Entiendo también que el análisis de mis muestras durante este estudio no implicará ningún costo extra para mí y que los gastos serán absorbidos por los investigadores.

Entiendo que estoy en mi derecho de solicitar cualquier aclaración y obtener información sobre la investigación que solicite en cualquier momento del desarrollo de la misma. En caso de que tenga cualquier duda o pregunta me puedo dirigir al Dr. Adrián Rendón o al Dr. Adrian Rosas al teléfono 83 45-52-16.



SUB-DIRECCION DE INVESTIGACIÓN
DE POST-GRADO

ACEPTO
PACIENTE

TESTIGO

NOMBRE:
DIRECCION:

NOMBRE:
DIRECCION:

TESTIGO

INVESTIGADORES

NOMBRE:
DIRECCION:

NOMBRE: Dr. Ashah Rendon/Dr. Arhten Rojas
DIRECCION: Gonzalez 235 Norte
Minas Centro, Monterrey, NL.

LITERATURA CITADA

1. Raviglione MC, Snider DE, Jr., Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA*. 1995;273(3):220-226.
2. Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC, et al. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med*. 2003;163(9):1009-1021.
3. http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr12_executivesummary_es..pdf.
4. Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(3 Pt 1):679-691.
5. Garg SK, Tiwari RP, Tiwari D, Singh R, Malhotra D, Ramnani VK, et al. Diagnosis of tuberculosis: available technologies, limitations, and possibilities. *J Clin Lab Anal*. 2003;17(5):155-163.
6. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(4 Pt 1):1376-1395.
7. Aber VR, Allen BW, Mitchison DA, Ayuma P, Edwards EA, Keyes AB. Quality control in tuberculosis bacteriology. 1. Laboratory studies on isolated positive cultures and the efficiency of direct smear examination. *Tubercle*. 1980;61(3):123-133.
8. Richeldi L. An update on the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(7):736-742.
9. Perkins MD, O'Brien RJ. New Diagnostics for Tuberculosis: an Essential Element for Global Control and Elimination. In: Raviglione MC, editor. *Tuberculosis: A Comprehensive, International Approach*. New York: Informa Healthcare, 2006: 1115-1133.
10. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. American Thoracic Society. *MMWR Recomm Rep*. 2000;49(RR-6):1-51.
11. Nassau E, Parsons ER, Johnson GD. The detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Tubercle*. 1976;57(1):67-70.
12. Sada E, Ferguson LE, Daniel TM. An ELISA for the serodiagnosis of tuberculosis using a 30,000-Da native antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 1990;162(4):928-931.
13. Krishnan VV, Mathai A. Isolation of two antigens from the culture filtrates of *Mycobacterium tuberculosis* and their applications in the laboratory diagnosis of the tuberculous meningitis. *Medical Microbiology and Immunology*. 1991;180(2):101-107.
14. Diagbouga S, Fumoux F, Zoubga A, Sanou PT, Marchal G. Immunoblot analysis for serodiagnosis of tuberculosis using a 45/47-

- kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1997;4(3):334-338.
15. Pottumarthy S, Wells VC, Morris AJ. A comparison of seven tests for serological diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2000;38(6):2227-2231.
 16. Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, Rosenkrands I, Andersen P. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun.* 1996;64(1):16-22.
 17. Lyashchenko KP, Singh M, Colangeli R, Gennaro ML. A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases. *J Immunol Methods.* 2000;242(1-2):91-100.
 18. Davies DH, Liang X, Hernandez JE, Randall A, Hirst S, Mu Y, et al. Profiling the humoral immune response to infection by using proteome microarrays: high-throughput vaccine and diagnostic antigen discovery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(3):547-552.
 19. Kanaujia GV, Lam PK, Perry S, Brusasca PN, Catanzaro A, Gennaro ML. Integration of microscopy and serodiagnostic tests to screen for active tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2005;9(10):1120-1126.
 20. Dinnes J, Deeks J, Kunst H, Gibson A, Cummins E, Waugh N, et al. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technol Assess.* 2007;11(3):1-196.
 21. Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, Iademarco MF, Metchock B, Vernon A, et al. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States. *MMWR Recomm Rep.* 2005;54(RR-15):49-55.
 22. Meier T, Eulenbruch HP, Wrighton-Smith P, Enders G, Regnath T. Sensitivity of a new commercial enzyme-linked immunospot assay (T SPOT-TB) for diagnosis of tuberculosis in clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005;24(8):529-536.
 23. Skjot RL, Oettinger T, Rosenkrands I, Ravn P, Brock I, Jacobsen S, et al. Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-cell antigens. *Infect Immun.* 2000;68(1):214-220.
 24. Pathan AA, Wilkinson KA, Klenerman P, McShane H, Davidson RN, Pasvol G, et al. Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN-gamma-secreting CD4 T cells in *Mycobacterium tuberculosis*-infected individuals: associations with clinical disease state and effect of treatment. *J Immunol.* 2001;167(9):5217-5225.
 25. Pollock JM, Andersen P. The potential of the ESAT-6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis. *J Infect Dis.* 1997;175(5):1251-1254.
 26. Ravn P, Munk ME, Andersen AB, Lundgren B, Lundgren JD, Nielsen LN, et al. Prospective evaluation of a whole-blood test using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for

- diagnosis of active tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12(4):491-496.
27. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, Takashima T, Kawabe Y, Nagao K, et al. Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170(1):59-64.
 28. Mustafa AS, Oftung F, Amoudy HA, Madi NM, Abal AT, Shaban F, et al. Multiple epitopes from the Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 antigen are recognized by antigen-specific human T cell lines. *Clin Infect Dis.* 2000;30 Suppl 3:S201-205.
 29. van Pinxteren LA, Ravn P, Agger EM, Pollock J, Andersen P. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000;7(2):155-160.
 30. Lee JY, Choi HJ, Park IN, Hong SB, Oh YM, Lim CM, et al. Comparison of two commercial interferon-gamma assays for diagnosing Mycobacterium tuberculosis infection. *Eur Respir J.* 2006;28(1):24-30.
 31. Pai M, Riley LW, Colford JM, Jr. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2004;4(12):761-776.
 32. Hill PC, Brookes RH, Fox A, Jackson-Sillah D, Jeffries DJ, Lugos MD, et al. Longitudinal assessment of an ELISPOT test for Mycobacterium tuberculosis infection. *PLoS Med.* 2007;4(6):e192.
 33. Diel R, Loddenkemper R, Meywald-Walter K, Niemann S, Nienhaus A. Predictive value of a whole blood IFN-gamma assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with Mycobacterium tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177(10):1164-1170.
 34. Dosanjh DP, Hinks TS, Innes JA, Deeks JJ, Pasvol G, Hackforth S, et al. Improved diagnostic evaluation of suspected tuberculosis. *Ann Intern Med.* 2008;148(5):325-336.
 35. Ferrara G, Losi M, D'Amico R, Roversi P, Piro R, Meacci M, et al. Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with Mycobacterium tuberculosis: a prospective study. *Lancet.* 2006;367(9519):1328-1334.
 36. Wilkinson KA, Belisle JT, Mincek M, Wilkinson RJ, Toossi Z. Enhancement of the human T cell response to culture filtrate fractions of Mycobacterium tuberculosis by microspheres. *J Immunol Methods.* 2000;235(1-2):1-9.
 37. Kellar KL, Kalwar RR, Dubois KA, Crouse D, Chafin WD, Kane BE. Multiplexed fluorescent bead-based immunoassays for quantitation of human cytokines in serum and culture supernatants. *Cytometry.* 2001;45(1):27-36.
 38. Morgan E, Varro R, Sepulveda H, Ember JA, Apgar J, Wilson J, et al. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clin Immunol.* 2004;110(3):252-266.

39. Maier R, Weger M, Haller-Schober EM, El-Shabrawi Y, Theisl A, Barth A, et al. Application of multiplex cytometric bead array technology for the measurement of angiogenic factors in the vitreous. *Mol Vis*. 2006;12:1143-1147.
40. Gonzalez C, Garcia-Berrocal B, Talavan T, Casas ML, Navajo JA, Gonzalez-Buitrago JM. Clinical evaluation of a microsphere bead-based flow cytometry assay for the simultaneous determination of anti-thyroid peroxidase and anti-thyroglobulin antibodies. *Clin Biochem*. 2005;38(11):966-972.
41. McHugh TM. Performance characteristics of a microsphere immunoassay using recombinant HCV proteins as a confirmatory assay for the detection of antibodies to the hepatitis C virus. *Cytometry A*. 2005;67(2):97-103.
42. Opalka D, Pessi A, Bianchi E, Ciliberto G, Schleif W, McElhaugh M, et al. Analysis of the HIV-1 gp41 specific immune response using a multiplexed antibody detection assay. *J Immunol Methods*. 2004;287(1-2):49-65.
43. Opalka D, Lachman CE, MacMullen SA, Jansen KU, Smith JF, Chirmule N, et al. Simultaneous quantitation of antibodies to neutralizing epitopes on virus-like particles for human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18 by a multiplexed luminex assay. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10(1):108-115.
44. van der Heyde HC, Burns JM, Weidanz WP, Horn J, Gramaglia I, Nolan JP. Analysis of antigen-specific antibodies and their isotypes in experimental malaria. *Cytometry A*. 2007;71(4):242-250.
45. Kellar KL, Douglass JP. Multiplexed microsphere-based flow cytometric immunoassays for human cytokines. *J Immunol Methods*. 2003;279(1-2):277-285.
46. Pataki J, Szabo M, Lantos E, Szekvolgyi L, Molnar M, Hegedus E, et al. Biological microbeads for flow-cytometric immunoassays, enzyme titrations, and quantitative PCR. *Cytometry A*. 2005;68(1):45-52.
47. Nolan JP, Mandy F. Multiplexed and microparticle-based analyses: quantitative tools for the large-scale analysis of biological systems. *Cytometry A*. 2006;69(5):318-325.
48. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*. 1999;284(5419):1520-1523.
49. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol*. 1996;178(5):1274-1282.
50. Khan IH, Ravindran R, Yee J, Ziman M, Lewinsohn DM, Gennaro ML, et al. Profiling antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by multiplex microbead suspension arrays for serodiagnosis of tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15(3):433-438.
51. Gennaro ML, Affouf M, Kanaujia GV, Brusasca PN, Mangura B, Reichman L. Antibody markers of incident tuberculosis among HIV-

- infected adults in the USA: a historical prospective study. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007;11(6):624-631.
52. Brusasca PN, Colangeli R, Lyashchenko KP, Zhao X, Vogelstein M, Spencer JS, et al. Immunological characterization of antigens encoded by the RD1 region of the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Scand J Immunol.* 2001;54(5):448-452.
 53. Kanaujia GV, Motzel S, Garcia MA, Andersen P, Gennaro ML. Recognition of ESAT-6 sequences by antibodies in sera of tuberculous nonhuman primates. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004;11(1):222-226.
 54. Lopez-Vidal Y, de Leon-Rosales SP, Castanon-Arreola M, Rangel-Frausto MS, Melendez-Herrada E, Sada-Diaz E. Response of IFN-gamma and IgG to ESAT-6 and 38 kDa recombinant proteins and their peptides from *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients and asymptomatic household contacts may indicate possible early-stage infection in the latter. *Arch Med Res.* 2004;35(4):308-317.
 55. Abebe F, Holm-Hansen C, Wiker HG, Bjune G. Progress in serodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Scand J Immunol.* 2007;66(2-3):176-191.
 56. Hoff ST, Abebe M, Ravn P, Range N, Malenganisho W, Rodrigues DS, et al. Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis*--specific antibody responses in populations with different levels of exposure from Tanzania, Ethiopia, Brazil, and Denmark. *Clin Infect Dis.* 2007;45(5):575-582.
 57. Pai NP, Pai M. Point-of-care diagnostics for HIV and tuberculosis: landscape, pipeline, and unmet needs. *Discov Med.* 2012;13(68):35-45.
 58. World Health Organization WHO Tuberculosis Diagnostics Workshop: Product Development Guidelines, 1–27, 2007. Cleveland, OH: WHO, 1997.
 59. Lange C, Mori T. Advances in the diagnosis of tuberculosis. *Respirology.* 2010;15(2):220-240.
 60. World Health Organization. Policy Statement: Automated Real-time Nucleic Acid Amplification Technology for Rapid and Simultaneous Detection of Tuberculosis and Rifampicin Resistance: Xpert MTB/RIF System. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2011c.
 61. Abebe F, Bjune G. The protective role of antibody responses during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Exp Immunol.* 2009;157(2):235-243.
 62. Steingart KR, Henry M, Laal S, Hopewell PC, Ramsay A, Menzies D, et al. Commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. *PLoS Med.* 2007;4(6):e202.
 63. World Health Organization. Policy Statement: Commercial Serodiagnostic Tests for Diagnosis of Tuberculosis. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2011d.

64. Singh S, Singh J, Kumar S, Gopinath K, Balooni V, Singh N, et al. Poor performance of serological tests in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: evidence from a contact tracing field study. *PLoS One*. 2012;7(7):e40213.
65. Min F, Zhang Y, Huang R, Li W, Wu Y, Pan J, et al. Serum antibody responses to 10 *Mycobacterium tuberculosis* proteins, purified protein derivative, and old tuberculin in natural and experimental tuberculosis in rhesus monkeys. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18(12):2154-2160.
66. Feng X, Xiu B, Chen K, Yang X, Zhang H, Yue J, Tan Y, Li H, Nicholson RA, Tam AW, Zhao P, Zhang L, Liu J, Song X, Wang G, Zhang H. Enhanced serodiagnostic utility of novel *Mycobacterium tuberculosis* polyproteins. *J Infect*. 2013 Apr;66(4):366-75.
67. Zhang X, Su Z, Zhang X, Hu C, Yu J, Gao Q, et al. Generation of *Mycobacterium tuberculosis*-specific recombinant antigens and evaluation of the clinical value of antibody detection for serological diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Int J Mol Med*. 2013;31(3):751-757.
68. Wu X, Yang Y, Zhang J, Li B, Liang Y, Zhang C, et al. Comparison of antibody responses to seventeen antigens from *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Chim Acta*. 2010;411(19-20):1520-1528.
69. Harries AD, Lin Y, Satyanarayana S, Lonnroth K, Li L, Wilson N, et al. The looming epidemic of diabetes-associated tuberculosis: learning lessons from HIV-associated tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011;15(11):1436-1444, i.

RESÚMEN AUTOBIOGRÁFICO

Luis Adrián Rendón Pérez

Candidato para el Grado de

Doctor en Medicina

Tesis: DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE TUBERCULOSIS PULMONAR MEDIANTE LA DETECCIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE ANTICUERPOS IGM E IGG CONTRA MICROESFERAS CUBIERTAS CON ESAT-6 Y CFP-10

Campo de Estudio: Ciencias de Salud

Biografía:

Datos Personales: Nacido en Córdoba, Veracruz el 5 de Marzo de 1961, hijo de Carlos Rendón Alvarado y María Teresa Pérez López

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Médico Cirujano y Partero en 1985 con mención honorífica, primer lugar de generación.

Experiencia Profesional: Maestro de Tiempo Completo de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 1995

RESÚMEN AUTOBIOGRÁFICO

Luis Adrián Rendón Pérez

Candidato para el Grado de

Doctor en Medicina

Tesis: DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE TUBERCULOSIS PULMONAR MEDIANTE LA DETECCIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE ANTICUERPOS IgM E IgG CONTRA MICROESFERAS CUBIERTAS CON ESAT-6 Y CFP-10

Campo de Estudio: Ciencias de Salud

Biografía:

Datos Personales: Nacido en Córdoba, Veracruz el 5 de Marzo de 1961, hijo de Carlos Rendón Alvarado y María Teresa Pérez López

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Médico Cirujano y Partero en 1985 con mención honorífica, primer lugar de generación.

Experiencia Profesional: Maestro de Tiempo Completo de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 1995