



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN
TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.



**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE
ANTICUERPOS CONTRA LOS ANTÍGENOS DE
Mycobacterium tuberculosis HspX, Ag85A,
Ag38kDa, Mpt64 y ESAT6-CFP10**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTORADO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN
BIOTECNOLÓGICA**

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA MÉDICA FARMACÉUTICA

PRESENTA:

MC. WENDY LÓPEZ ROMERO

DIRECTOR:

DR. MARIO ALBERTO FLORES VALDEZ

CO-DIRECTORA:

DRA. TANYA AMANDA CAMACHO VILLEGAS

ASESORES:

DR. ROGELIO HERNANDEZ PANDO

DRA. ERIKA NAHOMY MARINO MARMOLEJO

GUADALAJARA, JALISCO, 13 DE DICIEMBRE DEL 2021



GOBIERNO DE
MÉXICO



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



Guadalajara, Jalisco, a 23 de noviembre de 2021
CP/1344/2021

WENDY LÓPEZ ROMERO
ESTUDIANTE DEL DOCTORADO EN
CIENCIAS EN INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA
NÚMERO DE MATRÍCULA 1702AS6339
PRESENTE

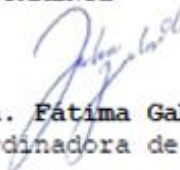
Por este medio le informo que el trabajo de tesis "Evaluación de la respuesta de anticuerpos contra los antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* HspX, Ag85A, Ag38kDa, Mpt64 y ESAT6-CFP10" desarrollado bajo la dirección del siguiente comité tutorial:

Dr. Mario Alberto Flores Valdez. Director de tesis
Dra. Tanya Amanda Camacho Villegas. Co-directora de tesis
Dra. Erika Nahomy Marino Marmolejo. Asesora de tesis
Dr. Rogelio Hernández Pando. Asesor de tesis

ha sido aprobado para su impresión definitiva y defensa correspondiente para la obtención del grado de Doctora en Ciencias en Innovación Biotecnológica.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE


Mtra. Fatima Gabriela Ordóñez de la Cruz
Coordinadora de Posgrados

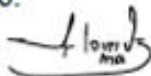


Guadalajara, Jalisco a 08 de Noviembre de 2021

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del (la) estudiante **Wendy López Romero**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “*EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS CONTRA LOS ANTÍGENOS DE Mycobacterium tuberculosis HspX, Ag85A, Ag38kDa, Mpt64 y ESAT6-CFP10*” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el/la estudiante para aspirar al grado de Doctor/Maestro en (Nombre del posgrado y opción terminal en la que tiene inscripción) durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 08 del mes de Noviembre del año dos mil veintiuno.



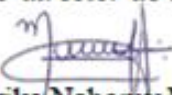
Mario Alberto Flores Valdez

Director de tesis



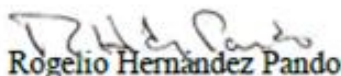
Tanya Amanda Camacho Villegas

Co-director de tesis



Erika Nahomy Marino Marmolejo

Asesora



Rogelio Hernández Pando

Asesor

DECLARACIÓN

Por medio de la presente, declaro que la investigación aquí presentada fue llevada a cabo por mí. Este trabajo es original y no se ha sometido con anterioridad, todo o en parte, para la obtención de otro grado en esta u otra institución.

Guadalajara, México.

Diciembre 2021.

**A mi compañero de vida,
por tus interminables palabras de aliento y apoyo constante.**

AGRADECIMIENTOS PROFESIONALES

Al Dr. Mario Alberto Flores Valdez por su dirección, confianza y asesoría constante para la realización de este proyecto y mi formación tanto profesional como personal.

A la Dra. Tanya Camacho por su mentoría y colaboración tanto académica como con reactivos para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Francisco Gonzalez Salazar por la colaboración y compromiso con el proyecto.

Al Dr. Rogelio Hernández Pando por el reto constante de llevar mas allá la discusión de resultados.

A la Dra. Erika Nahomy Marino Marmolejo por el apoyo y comentarios acertados durante las revisiones del proyecto.

A los Dres. Pavel Hayl Lugo Fabres y Cristian Alfredo Segura Cerda por el apoyo y la constante asesoría en el análisis de datos.

A mis compañeros de laboratorio Lorena, Nayeli, Elia, Mirna, Alejandra, Marissa, Edwin, Azucena, Sandeep, Jonahtan y Michel por sus enseñanzas y apoyo.

A mis compañeros de doctorado con quienes aprendí y siempre me han apoyado.

A CIATEJ por abrirme sus puertas, por incentivar mi investigación y el apoyo económico otorgado con la extensión de la beca.

A CONACYT por el apoyo económico otorgado a los jóvenes e instituciones para el crecimiento científico de nuestro país. Fondo FONCICYT GACD265795. Folio de beca 337689.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Mario Flores, por los retos, la constante motivación y el tiempo dedicado para formarme en la investigación y personalmente. Por no dejar que me diera por vencida en ningún momento.

A Tanya Camacho, por su empatía, comprensión y gran apoyo tanto personal como profesional. Gracias por la amistad y por creer en mí, incluso mas que yo misma.

A mis compañeros del laboratorio, que más que compañeros se convirtieron en apreciadas amistades.

A mis padres Mercedes e Hipólito, quienes siempre me han apoyado e impulsado a seguir mis metas sin importar lo difícil que parezcan.

A mis hermanos Faviel y Edel, por apoyarme incondicionalmente siempre, ayudarme a crecer y ser más fuerte día con día.

A Lupita y Erick, por acompañarme durante esta importante etapa y fungir como gran ejemplo profesional y personal a pesar de la distancia. Siempre apreciaré sus consejos.

A Omar, mi compañero de vida, por brindarme su constante motivación, por creer en mi, apoyarme y acompañarme en todo momento.

I. ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS PROFESIONALES	v
AGRADECIMIENTOS PERSONALES	vi
I. ÍNDICE DE CONTENIDO	vii
II. ÍNDICE DE FIGURAS	x
II. ÍNDICE DE CUADROS	xii
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
4. ANTECEDENTES	9
4.1. Métodos estándar para el diagnóstico de tuberculosis	9
4.2. Ensayos basados en componentes celulares para diagnóstico de infección por <i>M. tuberculosis</i>	10
4.3. Pruebas moleculares para diagnóstico de TB.....	13
4.4. Pruebas serológicas para el diagnóstico de TB	19
4.5. Desarrollo de un método serológico de diagnóstico basado biomarcadores ..	21
4.6. Selección de muestras biológicas utilizadas para la búsqueda de nuevos biomarcadores	23
4.7. Identificación y validación de biomarcadores para el diagnóstico de TB empleando muestras diferentes de esputo	24
4.7.1. Antígenos de fusión	27
4.7.2. Segmentos de antígenos de fusión.....	28
4.7.3. Antígenos recombinantes	29
4.8. Desarrollo y validación de una prueba serodiagnóstica para TB	31

4.9. Respuesta inmune a la infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en comorbilidad con Diabetes Mellitus.....	34
4.9.1. Rol de la inmunidad innata en la susceptibilidad a TB en individuos con DM	35
4.9.2. Rol de la inmunidad adaptativa en la susceptibilidad a TB en DM	37
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
6. JUSTIFICACIÓN	40
7. HIPÓTESIS	41
8. OBJETIVOS	41
8.1. General	41
8.2. Específicos.....	41
9. METODOLOGÍA.....	42
9.1. Obtención de muestras biológicas y criterios de inclusión	42
9.2. Plásmidos recombinantes	42
9.3. Expresión de proteínas recombinantes.....	44
9.4. Purificación por cromatografía de afinidad a metales no movilizados (IMAC)	45
9.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	45
9.6. Diálisis.....	46
9.7. Western blot.....	46
9.8. Estandarización de ELISA para la evaluación de la respuesta de anticuerpos a los antígenos de <i>Mtb</i>	47
9.8.1. Optimización de la concentración del antígeno	47
9.8.2. Titulación de sueros.....	48
9.8.3. Evaluación de la respuesta de anticuerpos	48
10. RESULTADOS	50
10.1. Características clínicas de la población de estudio.....	50

10.2. Expresión y purificación de antígenos recombinantes	51
10.3. Optimización de la concentración de antígeno.....	54
10.4. Optimización del título de suero	56
10.5. Evaluación de los sueros en ELISA y curvas ROC	58
11. DISCUSIÓN	66
12. CONCLUSIONES.....	70
13. PERSPECTIVAS.....	70
14. BIBLIOGRAFÍA	71
15. ANEXOS	80
ANEXO I: PUBLICACIONES Y DIVULGACIÓN.....	80
ANEXO II: PRESENTACIONES EN CONGRESO	81

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Digestión de plásmidos recombinantes. Tamaños de inserto obtenidos después de digerir con enzimas de restricción (Cuadro 1) por 1h a 37°C. A) Carriles E: marcador de peso molecular (NEB, Cat. B7025, USA), Carriles 2, 4, 7 y 9: 100 ng de plásmido recombinante pET15b sin digerir; Carriles 3, 5, 8 y 10: 1 µg de plásmido recombinante pET15b digerido. B) Carril E: marcador de peso molecular, Carriles 2 y 3: 1 µg de plásmido recombinante pUC57 digerido, Carriles 4 y 5: 100 ng de plásmido recombinante pET28 sin digerir..... 52

Figura 2. Análisis de la expresión y purificación de la fracción soluble de las proteínas recombinantes por SDS-PAGE. A) HspX, B) Mpt64, C) ESAT6-CFP10, D) Ag38kDa y E) Ag85A, E: marcador de peso molecular (BioRad), N: fracción no retenida, L: lavado con 50 mM imidazol, 1 a 5: fracciones recuperadas eluidas con 300 mM de imidazol. Condiciones de expresión empleadas: 1 mM IPTG, 37°C, 300 rpm, 4 h. 53

Figura 3. Proteínas recombinantes purificadas. A) SDS-PAGE E: marcador de peso molecular, 2: HspX (Rv2031c) 16 kDa, 3: Mpt64 (Rv1980) 25 kDa, 4: Ag85A (Rv3803c) 32 kDa, 5: Ag38kDa (Rv0934) 38 kDa y 6: ESAT6-CFP10 (Rv3875-Rv3874) 25 kDa, se cargaron 2 µg de proteína purificada en cada pocillo. B) Western blot, 7: TVK proteína control positivo de 25 kDa, 8: 20 µL de lisado bacteriano BL21 sin transformar. 54

Figura 4. Optimización de la cantidad de antígeno empleada para sensibilizar microplaca. Cada barra corresponde a la media de tres réplicas de la absorbancia registrada a 450 nm de distintas cantidades de los antígenos A) HspX, B) Mpt64, C) Ag38kDa, D) Ag85A y ESAT6-CFP10, el control negativo corresponde al sandwich sin suero (C-) y el control positivo (C+) a 50 ng de proteína recombinante producida en *E. coli*. Significancia estadística determinada por prueba de Dunnett ($p < 0.0001$). 55

Figura 5. Titulación de anticuerpos IgG y evaluación del efecto de hemólisis. Cada barra representa la media tres muestras PPD- de suero o hemolizadas (de un mismo individuo) evaluadas por triplicado de manera individual. Significancia

estadística del efecto de dilucion y estado de la muestra determinada por prueba de Tukey ($p < 0.0001$). 57

Figura 6. Validación de la dilución de suero. Titulación de anticuerpos anti IgG en suero sano (PPD-), suero TB (QFT+) y suero TB-VIH. Cada barra representa la media de tres réplicas, se comparó respecto del control negativo sin suero. Significancia estadística determinada por prueba de Dunnett ($p < 0.0001$). 57

Figura 7. Comparación de la respuesta de anticuerpos IgG a cinco antígenos recombinantes de *Mtb*. TBA (TB QFT+) y voluntarios sanos (HC QFT-) (izq) y en presencia de diabetes (DM QFT+ y DM QFT-) (der). (A) HspX (Rv2031c), (B) Mpt64 (Rv1980c), (C) Ag38kDa (Rv0934), (D) Ag85A (Rv3803c), (E) ESAT6-CFP10 (Rv3875-3874). La línea roja horizontal indica el valor de la media de cada grupo, las líneas punteadas corresponden al valor de cuttoff, derivado de la curva ROC. CS QFT- ($n=36$), *Mtb*, CS QFT+ ($n=11$), DM QFT- ($n=61$) y DM QFT+ ($n=22$). Significancia estadística determinada por prueba de Dunnett ($p < 0.0001$). 60

Figura 8. Análisis ROC de la respuesta de anticuerpos IgG a cinco antígenos recombinantes de *Mtb*. TBA (TB QFT+) y voluntarios sanos (HC QFT-) (izq) y en presencia de diabetes (DM QFT+ y DM QFT-) (der). Comparación de las curvas ROC para la detección específica de IgG anti (A) HspX (Rv2031c), (B) Mpt64 (Rv1980c), (C) Ag38kDa (Rv0934), (D) Ag85A (Rv3803c), (E) ESAT6-CFP10 (Rv3875-3874)..... 61

II. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Métodos utilizados para el diagnóstico de TBA.	20
Cuadro 2. Características de desempeño de una prueba rápida para TB (WHO,2014).	22
Cuadro 3. Biomarcadores potenciales para diagnóstico de TB.	26
Cuadro 4. Construcción de plásmidos recombinantes.	43
Cuadro 5. Características clínicas el grupo de estudio.	51
Cuadro 6. Productos de la digestión de los plásmidos recombinantes.	52
Cuadro 7. Resultado de la prueba de Kolmogorov-Smirnov.	59
Cuadro 8. Análisis de Curva ROC de la respuesta de anticuerpos IgG a los antígenos recombinantes de <i>Mtb</i> HspX (Rv2031c), Ag38KDa (Rv0934), Mpt64 (Rv1980c), ESAT6-CFP10 (Rv3875-Rv3874) y Ag85A (Rv3804c) en presencia o ausencia de DM.	62
Cuadro 9. Punto de corte derivado del análisis de curvas ROC de la respuesta de anticuerpos IgG a cinco antígenos recombinantes de <i>Mtb</i> en voluntarios con TB, controles sanos e individuos con DM.	63
Cuadro 10. Sensibilidad y especificidad de cinco antígenos de <i>Mtb</i> en una prueba tipo ELISA en presencia o ausencia de DM.	65

1. RESUMEN

La infección por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) es un problema de salud de gravedad global, sobre todo en regiones con difícil acceso a servicios públicos y clínicas donde se favorece la progresión hacia la enfermedad conocida como tuberculosis activa (TBA). México para el 2019 reportó una incidencia de 19 mil casos, de los cuales 787 corresponden al estado de Jalisco. Uno de los factores que incrementa el riesgo de TBA, es la diabetes mellitus (DM), ya que incrementa el riesgo de infección hasta 8 veces, y un 10% de personas diabéticas con infección latente (TBL) desarrollan TBA. Por lo que, actualmente tanto la OMS como la Unión Internacional contra la Tuberculosis y la Enfermedad Pulmonar, recomiendan examinar a todos los pacientes recién diagnosticados con TBA para ver si tienen o desarrollan DM, y considerar la detección de *Mtb* en todos los pacientes con DM. La prueba para diagnosticar TBA en México es la baciloscopia de esputo, la cual tarda hasta 12 semanas en brindar un resultado. Hoy en día, se cuenta con más de un antecedente, donde han probado diferentes proteínas como potenciales biomarcadores de TB. Sin embargo, se desconoce su desempeño en una población con DM y que pudiera tener infección con *M. tuberculosis*. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la respuesta de anticuerpos contra antígenos potenciales de TBA y TBL en poblaciones con y sin diabetes, además, que la evaluación no requiera de personal o equipo altamente especializado para su resultado e interpretación. También que cumpla con las especificaciones mínimas requeridas por la OMS para una prueba diagnóstica. Se evaluaron los antígenos HspX, Ag85A, Ag38kDa, Mpt64 y ESAT6-CFP10 con sueros obtenidos de voluntarios con TBA, controles sanos QFT-, controles aparentemente sanos QFT+ (considerados para los fines de este trabajo como infectados con *Mtb*), diabéticos QFT+ y diabéticos QFT-. El antígeno Ag38kDa mostró características de desempeño para el diagnóstico de infección por *Mtb* en presencia de DM (sensibilidad 66%, especificidad 40%), compatibles con criterios establecidos por la OMS. Mientras que las otras proteínas biomarcadoras mostraron entre 50-56% de sensibilidad y 50% de especificidad para la detección de una infección por *Mtb*, en individuos no diabéticos. En personas con DM, la sensibilidad y especificidad se reportaron en intervalos del 57 al 66% y del 40 al 45% respectivamente. De los

antígenos evaluados, ninguno cumplió con el $\geq 80\%$ de sensibilidad y especificidad hipotetizados en nuestro trabajo. En cuanto a los requerimientos mínimos de la OMS ($>65\%$ y $\geq 98\%$, respectivamente) para una prueba diagnóstica de TB, en presencia de DM, no fue posible declarar si se cumple o no con ellos, dado que no se contó con un grupo TB clínico en comorbilidad con DM.

2. ABSTRACT

Infection with *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) is a health problem of global relevance, especially in regions with difficult access to public services and clinics, where it favors development of active tuberculosis (ATB) disease. In 2019, Mexico reported an incidence of 19,000 cases, of which 787 corresponded to the state of Jalisco. One of the factors that increases the risk of ATB is diabetes mellitus (DM), since it increases the risk of infection up to 8 times, and 10% of diabetic patients with latent tuberculosis infection (LTBI) develop ATB. Therefore, currently both the WHO and the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease recommend examining all newly diagnosed TB patients for DM, and consider the detection of *Mtb* in all patients with DM. The standard test to diagnose ATB in Mexico is sputum smear microscopy, which takes up to 12 weeks to provide a result. Nowadays, there is more than one antecedent, where different proteins with potential as TB biomarkers have been tested in different studies. However, their performance in a population with TB-DM comorbidity is unknown. The objective of this work was to evaluate antibody responses against potential antigens of ATB and LTBI in populations with and without DM, moreover, that the evaluation does not require highly specialized personnel or equipment for its result and interpretation, in addition to meeting the minimum specifications required by the WHO for a diagnostic test. The HspX, Ag85A, Ag38kDa, Mpt64 and ESAT6-CFP10 antigens were evaluated using sera obtained from volunteers with ATB, QFT- healthy controls, QFT+ apparently healthy controls (considered here to be infected with *Mtb*), QFT+ diabetics and QFT- diabetics. The Ag38kDa antigen showed performance characteristics for *Mtb* diagnosis in presence of DM (sensitivity 66% and specificity 40%) compatible with criteria recommended by the World Health Organization (WHO). While the rest showed between 50-56% sensitivity and 50% specificity for the detection of *Mtb* infection, in non-diabetic individuals. In people with DM, the sensitivity and specificity were reported to range from 57 to 66% and 40 to 45%, respectively. From the antigens evaluated, none of them met the hypothesized $\geq 80\%$ sensibility and specificity. Regarding the minimum requirements of the WHO ($>65\%$ and $\geq 98\%$, respectively) for a TB diagnostic test, it

was not possible to declare whether they were met in people with DM, since there was no clinical TB group in comorbidity with DM.

3. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el agente *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), el cual es diseminado a través del aire, cuando personas infectadas expulsan el bacilo al toser, estornudar o hablar. En un periodo de un año, una persona con TB activa puede infectar de 10 a 15 personas por contacto estrecho. La enfermedad en su forma activa (TBA), genera signos y síntomas como tos crónica con esputo, fiebre, dolor torácico y pérdida de peso, los cuales pueden ser leves durante meses y conllevar a postergar la búsqueda de atención médica y por ende, un diagnóstico y tratamiento adecuado (Lyon and Rossman 2017). Las pruebas de diagnóstico para TBA incluyen microscopía de frotis de esputo, pruebas moleculares rápidas y métodos basados en cultivos; estos últimos tardan hasta 12 semanas en proporcionar resultados, pero siguen siendo el estándar de referencia (InDRE, 2016). En el algoritmo del Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (InDRE), para el diagnóstico por laboratorio de tuberculosis pulmonar de un paciente sintomático respiratorio, hay dos vías a seguir a partir de una muestra de expectoración: 1) realizar una baciloscopia y confirmar con cultivo en caso de resultado positivo, generalmente es la ruta más empleada para llegar a un diagnóstico en México, o bien como metodología alterna, 2) emplear una prueba de PCR (Xpert MTB/RIF) para diagnosticar tuberculosis a partir de secuencias de aminoácidos, así como su posible resistencia a rifampicina.

Una vez que el bacilo se aloja en los pulmones del hospedero, genera una infección primaria derivada de la reproducción del mismo lo cual, da paso a la formación de tubérculos característicos de la enfermedad. Cerca de las tres semanas post-infección, el sistema inmunitario suele contrarrestar el crecimiento bacilar para mantenerla en un estado de dormancia o latencia (TBL) en caso contrario, se generará una reactivación y se agravarán las lesiones pulmonares para dar lugar a TBA (aproximadamente un 10% de infectados con TBL progresan a TBA) (Furin, Cox et al. 2019). En un 80% de los casos, la TB pulmonar presenta un grado variable de daño, dependiente tanto del microorganismo como del estado inmunitario del hospedero, el cual se modifica fácilmente por diversas condiciones como tabaquismo, malnutrición, alcoholismo,

VIH/SIDA y diabetes mellitus (DM), particularmente DM tipo 2 (Jimenez-Corona et al., 2013; (Kumar Nathella and Babu 2017).

Adicional a lo anterior, puede presentarse tuberculosis extrapulmonar (TBE), como resultado de la diseminación de la infección por *Mtb* a otros órganos y tejidos (ganglios linfáticos, pleura, huesos y articulaciones, aparato genitourinario, meninges, pericardio y peritoneo) (E. Martínez et al., 2010). En dicho caso, establecer un diagnóstico diferencial es complicado ya que, tanto síntomas clínicos como pruebas de imagen (rayos X), pueden parecer inespecíficos, por lo que se recurre a métodos invasivos de examinación como punciones guiadas con ecografía o tomografías; en cuanto a tratamiento, suelen indicarse los mismos fármacos de primer línea (isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida) tanto para TBA como TBE, por un periodo aproximado de seis meses, dependiendo la evolución del paciente (Ramirez-Lapausa, Menendez-Saldana et al. 2015).

De acuerdo a estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la TB es la décimo tercera causa de muerte por un solo agente infeccioso (por encima del VIH) en el mundo. Para el año 2020, se reportaron 5.8 millones de casos nuevos de TBA y 1.3 millones de muertes adicionalmente, se estima que una cuarta parte de la población mundial presenta TB de forma latente; México por su parte, presentó una incidencia de 19 mil casos de TB en el 2019 (WHO, 2021). En el año 2018 acorde a estadísticas del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), el estado de Jalisco presentó una prevalencia de 121,710 pacientes con TB, localizados en su mayoría (65%) en la Zona Metropolitana de Guadalajara y Puerto Vallarta (IMSS, 2019). Para el cierre del 2018 se identificaron 787 nuevos casos y 101 durante el primer trimestre del 2019 (SINAVE, 2019).

Anualmente se suman 1.5 millones de nuevos casos con TB, es decir, un 15% de la incidencia global total, por efecto de la coinfección TB/DM (WHO, 2017). Lo anterior, debido a que, en presencia de DM, el riesgo de reactivación de TBL incrementa de 2.44 hasta 8.33 veces (respecto de una persona sin diabetes) (Dooley and Chaisson 2009) y por consecuencia, al menos un 10% de los individuos diabéticos progresan de TBL a TBA (Barron, Shaw et al. 2018). La Federación Internacional de Diabetes (FID),

ha predicho un incremento del 55% de diabéticos en el mundo durante los próximos 20 años (Hodgson, Morris et al. 2015), agravando de forma importante la incidencia de TB. De manera que, la OMS en conjunto con la Unión Internacional contra la Tuberculosis y la Enfermedad Pulmonar (The Union), actualmente recomiendan examinar a pacientes recién diagnosticados con TB y confirmar la presencia o ausencia de DM, de igual manera, sugieren considerar la detección de TB en todos los pacientes con DM (Fwoloshi, Hachaambwa et al. 2018), a fin de brindar un diagnóstico oportuno y tratamiento adecuado en cada caso. En México, los guías para la prevención, control y monitoreo tanto de TB como de la coinfección TB/DM, se encuentran en las NOM-006, NOM-015 y NOM-017 de la Secretaría de Salud, donde recomiendan de igual manera, la revisión de diabéticos con síntomas respiratorios sospechosos de TB, y en los enfermos con TB, buscar diabetes, a manera de prevenir complicaciones (NORMA, 2013; 2010; 1994).

La DM se asocia con la disminución de la inmunidad celular. En diabéticos se disminuye el conteo y función de linfocitos T y neutrófilos, responsables del incremento de la susceptibilidad a TB. También, disminuye la respuesta de citocinas T-helper1 (Th1) y producción de citocinas como TNF α (factor de necrosis tumoral alfa), IL-1 β (interleucina 1 beta) e IL-6 (interleucina 6), vitales en el control e inhibición de *Mtb*. La función de macrófagos se inhibe, ya que en personas con DM se deteriora la producción de EROs (Especies Reactivas de Oxígeno), así como la función fagocítica y quimiotáctica (Niazi and Kalra 2012).

En un individuo coinfectado TB/DM, se genera un incremento en la dosis de insulina, debido al estado de inflamación generado por la coinfección de TB, el cual puede exacerbar la hiperglucemia o favorecer su aparición, prolonga el tiempo de la baciloscopia positiva y produce un retraso en la obtención de cultivos negativos a *Mtb*, lo que implica un mayor tiempo de transmisión de TB. Aunado a lo anterior, el tiempo de tratamiento antituberculosis se prolonga e incrementa la tasa de fracaso asociado al abandono del tratamiento por los pacientes (Jiménez-Corona et al., 2013). Por lo que el tratamiento temprano de TB para los pacientes afectados con DM y evitar que

sean infecciosos por un tiempo prolongado, es esencial para mejorar el control de TB y disminuir las tendencias mencionadas anteriormente.

La prueba tradicional para suponer una infección por *Mtb* en personas asintomáticas e inmunosuprimidas, es la respuesta inmune de hipersensibilidad retardada a una mezcla compleja de antígenos de un derivado proteico purificado (PPD) o tuberculina, cuyos componentes más abundantes son compartidos por otras micobacterias no tuberculosas, lo cual impacta en los valores de especificidad y sensibilidad de la prueba ($\leq 80\%$). Además, se ha reportado una correlación directa de una reacción positiva al PPD por efecto de hiperglucemia en pacientes con DM, lo cual puede arrojar falsos positivos en estos individuos (Baghaei, Marjani et al. 2013). De manera alterna, existen kits basados en la respuesta celular ex vivo (producción de interferón gamma por los linfocitos T) generada por antígenos particulares de *Mtb*; el más conocido comercialmente es Quantiferon®-TB Gold in Tube (QFT-GIT). Sin embargo, algunos estudios han asociado niveles bajos de IFN- γ en diabéticos, resultando en una sensibilidad baja (incluso menor a la de la prueba de PPD), lo cual dificulta su validez en condiciones de inmunosupresión o en estado de latencia de *Mtb* (Faurholt-Jepsen, Aabye et al. 2014, Choi, Jarlsberg et al. 2015, Shin, Kim et al. 2017).

Sumado a la necesidad de ensayos de diagnóstico complementarios para determinar con precisión la infección por *Mtb* en etapas tempranas de la infección, este estudio propone emplear proteínas recombinantes con potencial biomarcador de TB pulmonar, para el posterior desarrollo y validación de un prototipo de prueba de tamizaje tipo ELISA para TB, así como su evaluación con sueros de voluntarios con ausencia y presencia de DM, a fin de sustentar la toma de una decisión informada sobre el momento de iniciar el tratamiento antituberculoso; con ello se reduciría el riesgo de transmisión, se mejoraría la monitorización del tratamiento y se evitarían complicaciones a largo plazo.

4. ANTECEDENTES

4.1. Métodos estándar para el diagnóstico de tuberculosis

Con respecto a los protocolos diagnósticos sugeridos por la OMS, la TB activa generalmente es diagnosticada mediante microscopía de frotis de esputo (desarrollada hace más de 100 años), por medio de tinción de Ziehl Neelsen o fluorescencia convencional, además del cultivo bacteriano en medios sólidos de Lowenstein-Jensen. La microscopía de frotis de esputo es a menudo el método estándar utilizado en la mayoría de los países con recursos limitados para diagnóstico de TB, donde los pacientes muestran signos y síntomas de presunción por infección por *Mtb* de manera endémica. Desafortunadamente, puede conducir a resultados falsos negativos cuando se ha producido una replicación bacteriana muy baja en los pulmones de los pacientes infectados, o bien en pacientes pediátricos, debido a la naturaleza de la muestra que producen, así como requerir la toma de muestra de forma invasiva en casos con TBE, causando estrés adicional al paciente (Bates and Zumla 2016, Tyagi, Sharma et al. 2017).

Generalmente, la microscopía de frotis de esputo es menos sensible que el cultivo en medios sólidos, lo que puede dar como resultado la identificación de diferentes especies de micobacterias en función de su velocidad para producir colonias, pigmentación de las mismas y su patrón de crecimiento en inclinación (parte superior/inferior de la inclinación); por otra parte, permite probar la susceptibilidad de las micobacterias cultivadas a medicamentos antituberculosis. Sin embargo, tiene los inconvenientes de alto costo y el largo tiempo necesario para la obtención de resultados, aunado a la falta del empleo de un anticuerpo específico para *Mtb* (p. ej., para microscopía de inmunofluorescencia), no es posible hacer una distinción entre *Mtb* y otras micobacterias mediante esta metodología. En casos de pacientes que no pueden producir esputo o aquellos en los que no se han encontrado bacilos usando microscopía, se suele emplear la radiografía de tórax (placa de tórax). En ésta, los pacientes con TB presentan varios tipos de lesiones como cavidades, consolidación pulmonar, nódulos, agrandamiento de los ganglios linfáticos mediastínicos, calcificación y/o derrame pleural (Bhalla, Goyal et al. 2015, Hashemian, Tabarsi et al. 2015).

La prueba cutánea de tuberculina (TST), continúa como el ensayo más utilizado en la actualidad para detectar TB en personas asintomáticas. Se basa en una respuesta inmune de hipersensibilidad retardada a una mezcla compleja de antígenos proteicos denominada derivado proteico purificado (PPD). El PPD contiene muchos componentes que se comparten tanto en las micobacterias del complejo *Mtb* (incluida la BCG) como micobacterias no tuberculosas, lo cual reduce su especificidad y sensibilidad (Lardizabal and Reichman 2017). Una de las dificultades que presenta además del largo periodo para la obtención de un resultado (de 42 a 72 horas), es la necesidad de personal altamente capacitado y experimentado tanto en la interpretación de resultado como en la administración del PPD, para llegar a un diagnóstico correcto (Orme and Cooper 1999). Aunado a lo anterior, una serie de afecciones pueden dar resultados falsos negativos, en algunas personas cuya respuesta de hipersensibilidad retardada se reduce, o incluso presenta daño severo (anergia), incluida la infección por VIH, otras infecciones virales (p. ej., sarampión, varicela-zóster) o infecciones bacterianas, por administración de drogas inmunosupresoras, así como cáncer o desnutrición (Snider, Kelly et al. 1985).

4.2. Ensayos basados en componentes celulares para diagnóstico de infección por *M. tuberculosis*

Además del TST, existen ensayos que reproducen la estimulación que producen los antígenos de *Mtb* en las células T de memoria, dando como resultado la producción de IFN- γ en respuesta a algunos antígenos micobacterianos presentados previamente tras la infección por *Mtb* o bien, por bacterias que comparten algunos de sus componentes antigénicos. Estos ensayos se conocen como ensayos de liberación de IFN- γ (IGRA) donde, para evitar reacciones inespecíficas como las que ocurren en respuesta al PPD, se basan en el empleo de antígenos específicos de *Mtb*, incluidos los codificados por el operón *esxAB* (ESAT-6 y CFP-10), los cuales están ausentes en todas las cepas de *M. bovis* BCG (Behr et al., 1999) y en otras micobacterias no tuberculosas. Hay dos tipos de sistemas IGRA comercialmente disponibles, un sistema incluye QiantiFERON-TB Gold (QFT-G) y su variante QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFT-GIT). Ambos consisten en tubos de ensayo que contienen antígenos de *Mtb* y son llenados con muestras heparinizadas de sangre completa e incubados de 16 a 24

horas para posteriormente, medir la concentración de IFN- γ en plasma separado liberado por los linfocitos T que reconocen antígenos micobacterianos (comparados contra los controles negativos), en un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). Algunas de las limitantes técnicas del QFT es colectar la muestra y separarla con 12 horas de anticipación a la prueba y experiencia en la interpretación de ésta. La utilidad del QFT en sus dos variantes para la predicción de la progresión de TB, aún no ha sido evaluada (Bartalesi, Spinicci et al. 2017).

En cuanto al desempeño de estos ensayos en personas inmunocomprometidas, se disponen pocos estudios a la actualidad. En sujetos infectados con VIH y TBA confirmada por cultivo, las sensibilidades de QFT-GIT y TST fueron de 81 y 85% ($p > 0.99$), respectivamente. QFT-GIT no mostró diferencia significativa de sensibilidad en presencia o ausencia de VIH (81 y 73% respectivamente, $p = 0.59$) (Tsiouris, Coetzee et al. 2006) . En una población de Zambia de 112 personas (59 infectadas con VIH) diagnosticadas con esputo se demostró que tanto QFT-GIT como TST disminuyen su sensibilidad en coinfección con VIH respecto de aquellos pacientes infectados sólo con TB (76% comparado con 97% para QFT-GIT, $p > 0.02$ y 55% comparado con 81% para TST, $p > 0.04$). Sin embargo, en este estudio la sensibilidad reducida de la TST podría deberse a una lectura tardía, ya que los autores declaran que las lecturas fueron tomadas entre 48 y 164 horas posterior a la inyección de PPD (Raby, Moyo et al. 2008).

Otro sistema igualmente basado en la respuesta inmune mediada por células T es el T-SPOT.TB, el cual emplea un método de inmunospot ligado a enzimas (ELISPOT). A diferencia de las pruebas basadas en QuantiFERON, este ensayo tiene en cuenta el número de células mononucleares de sangre periférica presentes en las muestras, de modo que cuenta el número de células T secretoras de IFN- γ , después de la estimulación con antígenos exclusivamente presentes en *Mtb*. Aunque las lecturas de las dos pruebas son diferentes (cantidad de IFN- γ presente en el sobrenadante de la muestra de sangre total estimulada versus el número de células T individuales que producen IFN- γ después de la estimulación antigénica para Quantiferon® y T-

SPOT.TB, respectivamente), al final ambos generan resultados similares (Wang, Wu et al. 2018).

En un meta análisis reciente, se encontró que la sensibilidad combinada de los ensayos QFT es de 76%, mientras que la del método T-SPOT.TB es de 90%. Por otro lado, la especificidad combinada para QFT resulta en 98% (variando de 96-99% dependiendo del estado de inmunización o no con BCG), mientras que la de T-SPOT.TB se encuentra en 93%. Para el TST, la estimación de sensibilidad agrupada fue del 77%, por su lado la especificidad fue del 97% en personas no vacunadas con BCG (Pai, Zwerling et al. 2008). A partir de este estudio, parece que QFT-G y QFT-GIT tienen una excelente especificidad, y no se ve afectada por la vacunación con BCG. Desafortunadamente, las sensibilidades de IGRA y TST no son consistentes entre poblaciones, T-SPOT.TB parece ser más sensible que QFT o TST. De forma similar, se encontró que TST tenía una sensibilidad combinada del 70%, mientras que QFT-IT alcanzaba el 81% y T-SPOT.TB el 88% (Diel, Goletti et al. 2011, Diel, Loddenkemper et al. 2011, Diel, Loddenkemper et al. 2012, Diel, Loddenkemper et al. 2013). La especificidad de QFT-IT fue del 99%, en comparación con el 86% del T-SPOT.TB. La variación observada para los valores de especificidad y sensibilidad determinados por diferentes grupos, puede ser la consecuencia de la incapacidad actual para diagnosticar con confianza la tuberculosis latente, y los métodos variables para aplicar y leer la prueba TST, así como los valores de corte y otras variables para considerar un resultado como positivo.

Durante el transcurso de este trabajo, hubo información limitada con respecto a la especificidad del ensayo comercial T-SPOT.TB para poblaciones de alto riesgo, como personas inmunocomprometidas y niños pequeños, que es un vacío que debe completarse, porque los resultados no concluyentes para las pruebas basadas en IGRA tienden a aumentar en estos grupos. Un hallazgo interesante es que, en comparación con TST, el QFT-GIT pareció predecir mejor a los pacientes susceptibles a desarrollar TB activa, porque un 14.6% de ellos evolucionó a TB activa, en comparación con solo el 2.3% de pacientes que dieron un resultado positivo de TST (Diel, Loddenkemper et al. 2008). Este hallazgo también respalda la noción de que la

única reactividad observada en estas pruebas no constituye un indicador fiel de una infección activa, ya que podría ser el resultado de una infección ya eliminada.

A pesar del avance en el diagnóstico oportuno que representan este tipo de métodos, se ha demostrado que su uso en diversas poblaciones, no es del todo satisfactorio. Debido a la creciente incidencia de la tuberculosis en el mundo, es necesario aumentar la búsqueda de nuevas estrategias de diagnóstico, ya que gran parte de la mortalidad se puede prevenir con tratamiento adecuado a través del diagnóstico rápido y preciso.

4.3. Pruebas moleculares para diagnóstico de TB

Durante la última década, por medio de un esfuerzo global concertado se ha intentado aprovechar la tecnología más reciente para diseñar pruebas de diagnóstico molecular para TB, principalmente a través de la detección de ADN del patógeno, aunque también se han empleado ensayos dirigidos a la detección de proteínas o lípidos de la micobacteria, así como de la respuesta inmune a la infección de TB (McNerney, Maeurer et al. 2012, Wallis, Kim et al. 2013, Bates and Zumla 2016)

El uso de pruebas que amplifican directamente ácidos nucleicos (NAA), ofrece un tiempo de respuesta reducido para el diagnóstico de TB, en comparación con la detección convencional de crecimiento en medios sólidos. Por lo tanto, su uso se ha incorporado como rutina en muchos laboratorios en países desarrollados, donde la prevalencia de TB es baja (Moore, Evans et al. 2006). Las pautas emitidas por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, en EUA), recomiendan que al menos una muestra respiratoria de cada paciente con signos y síntomas de TB pulmonar se analice mediante pruebas NAA, independientemente de los resultados obtenidos con microscopía de frotis (CDC, 2009). Este tipo de prueba se emplea de manera conjunta a la microscopía de frotis de esputo, preferentemente en pacientes no tratados, debido a que tanto el tipo de muestra como el entorno clínico, puede afectar de manera negativa el resultado por lo que, es de suma importancia que los médicos mantengan un reporte detallado y un buen seguimiento del historial clínico del paciente.

Actualmente, se ofrecen cinco tipos de pruebas en el mercado, que son capaces de detectar miembros de aislamientos del complejo *Mtb* en diversas muestras obtenidas

de pacientes, en éstas se enumeran (1) reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (2) amplificación mediada por transcripción, (3) GenoType Mycobacteria Direct assay, (4) amplificación con desplazamiento de la polimerasa (PCDR) y (5) amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, por sus siglas en inglés) (Ryu 2015). En distintos estudios se ha evaluado la precisión diagnóstica de las pruebas NAA, en una revisión y metaanálisis basados en 125 estudios separados basados en la precisión de este tipo de prueba comercial para el diagnóstico de TB, encontraron que la sensibilidad y especificidad agrupadas en estas pruebas fueron del 85% y del 97%, respectivamente (Ling, Flores et al. 2008). A pesar del alto valor de ambas medidas de precisión, los autores argumentan que los resultados entre pruebas comerciales son muy variables y en ocasiones inconsistentes, esto por el hecho de que cada prueba posee un punto de corte distinto, así como también el empleo de distintas muestras de esputo. Por lo que, a pesar de que las pruebas NAA emplean tecnología altamente especializada no son recomendables para reemplazar las pruebas convencionales empleadas para el diagnóstico de *Mtb* hasta no mejorar su precisión y sensibilidad.

El ensayo LAMP consiste en un método NAA que aplica la síntesis de ADN de desplazamiento de cadena de autociclo, y se dirige a seis regiones de los genes *gyrB* y 16S rRNA. Este ensayo ofrece simplicidad, rapidez, alta especificidad, no necesita instrumentos costosos y la plataforma puede usarse para organismos distintos de *Mtb*. Para muestras de esputo con frotis y cultivo positivo, el ensayo LAMP mostró una sensibilidad del 97.7%, mientras que en el caso donde no se encontraron bacilos ácido-alcohol resistentes, se obtuvo una sensibilidad del 48.8%, cuando se usaron en centros ubicados en Perú, Bangladesh y Tanzania (Boehme, Nabeta et al. 2007), aunque se correlacionó con la capacidad de las micobacterias para crecer en medios sólidos.

Vale la pena señalar que el ADN de *Mtb* puede detectarse en sangre y orina obtenida de pacientes con tuberculosis pulmonar y, en algunos casos, mejora la sensibilidad en comparación con el cultivo en medios con muestras obtenidas del mismo fluido biológico (Cannas, Goletti et al. 2008, da Cruz, de Albuquerque Montenegro et al. 2011, Theron, Peter et al. 2014). Por lo tanto, debemos tener en cuenta que el ADN

de *Mtb* no se puede detectar de manera confiable en todas las muestras, porque: (1) podría estar sometido a degradación parcial cuando las bacterias mueran a través de mecanismos de inmunidad innata, por lo que los sitios de unión para los cebadores ya no están disponibles, (2) el número de bacterias presentes en la muestra clínica está por debajo de los límites de detección, (3) la presencia de inhibidores de las reacciones de NAA en algunas muestras conducen a la no amplificación. Además, de estos posibles inconvenientes, las pruebas NAA son óptimas para los laboratorios que cuentan con personal técnicamente competente y tienen suficientes reactivos y controles para controlar el rendimiento de los ensayos (Noordhoek, Mulder et al. 2004). También deben incluir controles negativos durante el análisis de las muestras, para detectar cualquier posible contaminación de amplicones y es altamente deseable realizar pruebas de limpieza una vez al mes, para garantizar que las áreas de trabajo permanezcan limpias. Con el advenimiento de nuevas estrategias técnicas como la PCR digital por gotas (ddPCR), ha sido posible detectar y cuantificar ADN de los antígenos CFP-10 y Rv1768 en sangre humana de TB pulmonar activa, TB extrapulmonar y TB en niños (Song, Wallstrom et al. 2017). Además, el ARNm no codificante de micobacterias podría detectarse a partir del plasma de los pacientes en cerca del 55% de las muestras analizadas (Fu, Li et al. 2018), ampliando así el repertorio de biomarcadores que podrían ser útiles en el diagnóstico de TB.

En un esfuerzo por ampliar la identificación de biomarcadores en sangre periférica completa, se empleó el método Xpert MTB/RIF (prueba de amplificación de ADN de *Mtb*), a fin de obtener una medida semicuantitativa de la carga bacilar correlacionada a la cantidad de transcritos. De una cohorte de 51 voluntarios con baja y alta carga bacilar de *Mtb* se generaron firmas transcripcionales, encontrando 20 transcritos diferenciados como potenciales biomarcadores, los cuales mostraron una respuesta diferenciada tras seis meses de tratamiento anti tuberculosis, por lo que dichos transcritos pueden revelar información valiosa sobre los mecanismos para el control de *Mtb* durante la infección activa, así como validar su potencial como indicadores de la evolución del paciente durante su tratamiento (Dupnik, Bean et al. 2018). Cabe recalcar que para lograr homogenizar los análisis de transcriptomas, se requiere la estandarización de factores que puedan ejercer un efecto significativo en el resultado

como, la definición de casos y momento de toma de muestra (idealmente antes de cualquier tratamiento anti-TB), aspectos técnicos como el empleo de las mismas plataformas de análisis y el tamaño adecuado de muestra ya que, puede alterar el rendimiento del algoritmo a emplear (Haas, Roe et al. 2016).

En ensayos similares, la transcriptómica empleando RNA Seq permitió detectar una firma de 5 genes que mostró buena correlación con el riesgo de falla de antibióticos en pacientes humanos (Thompson, Du et al. 2017), y también para predecir el riesgo de desarrollar TB activa (Zak, Penn-Nicholson et al. 2016). Estos informes nos llevan a hipotetizar que, si se emplean cohortes bien definidas, podría ser factible encontrar firmas similares para el riesgo de TB diseminada, falta de protección tras la vacunación y cualquier otra manifestación clínica relevante relacionada con la TB.

Hoy en día, el diagnóstico activo de TB puede emplear suero, plasma, orina o sangre. Ya mencionamos que el suero o el plasma, podrían ser la fuente de anticuerpos específicos que se utilizarán más eficazmente, si se sigue un enfoque de detección de alto rendimiento. En este sentido, se ha descrito una variedad de biomarcadores de TB transcripcionales. Por ejemplo, en el perfil genético inducible por interferón (IFN) derivado de neutrófilos, se reportó que representaba una firma de TB significativa, que podía detectarse en células de sangre periférica obtenidas de pacientes con TB pulmonar; esta firma ya ha demostrado permitir la diferenciación de la TB de otras infecciones respiratorias y enfermedades inflamatorias (Berry, Graham et al. 2010, Maertzdorf, Weiner et al. 2012, Maertzdorf, Weiner et al. 2012, Bloom, Graham et al. 2013). Por supuesto, el análisis de cómo se conserva la firma en diferentes grupos (pacientes con VIH, ancianos, casos de tuberculosis pediátrica, extrapulmonar, etc.) aún no se ha determinado, y se puede prever que será posible usar estas firmas como pruebas rutinarias cuando se traducen a un dispositivo o ensayo compatible con laboratorios clínicos (Joosten, Fletcher et al. 2013).

Las micromatrices de proteomas, son otra plataforma molecular ampliamente empleada para la identificación de biomarcadores de TB. Éstas permiten perfilar globalmente miles de interacciones moleculares (con otras proteínas, ADN, ARN, lípidos y moléculas pequeñas) en un solo experimento. En un ensayo para la búsqueda

de biomarcadores séricos, se identificaron distintas proteínas (32% hipotéticas, 10% de membrana y 5% secretadas) con potencial como indicadores de la enfermedad, que posteriormente fueron ensayadas con 189 sueros de voluntarios con TBA y 150 de recuperados (posterior a seis meses de tratamiento), encontrando 14 proteínas como posibles indicadoras del funcionamiento del tratamiento anti-TB. Tras su evaluación por medio de ELISA con un segundo panel de muestras, se determinó la sensibilidad y especificidad de éstos mediante una curva ROC (80.2% y 79%, respectivamente), discriminando con éxito entre TBA y el grupo de recuperados (Deng, Bi et al. 2014).

En la búsqueda de biomarcadores del estado de latencia de *Mtb*, se probó una micromatriz de 4,262 antígenos (proteínas) con sueros de voluntarios diagnosticados con TBA y TBL. Los resultados mostraron que, en 152 de las proteínas, los niveles de IgG anti-antígeno eran significativamente más altos en los sueros de TBA. Once de éstos, fueron validados con ELISA mostrando resultados consistentes con los previos de la micromatriz. El análisis ROC mostró que los antígenos HspX, PPE y NadD tenían áreas bajo la curva (AUC) más altas de 0.85, 0.81 y 0.79, respectivamente. Además, tanto la combinación de antígenos como el análisis de regresión logística mejoraron la capacidad de diagnóstico (Cao, Chen et al. 2018).

Por su parte, las proteínas secretadas de *Mtb* son unas de los principales objetivos de la respuesta inmune específica de TB y constituyen candidatos prometedores tanto para el desarrollo de vacunas como para pruebas de diagnósticos. Tras el análisis del secretoma de *Mtb*, fueron identificadas 205 proteínas para serodiagnóstico de TB con sueros de 158 pacientes hindúes, de las cuales ocho fueron producidas por ADN recombinante y evaluadas en ELISA con 158 sueros de pacientes con TBA. Las proteínas recombinantes con mayor reactividad a los sueros con TBA fueron PE3 y PE4. Los valores de CFP-10 y ESAT-6, resultaron mayores en comparación del resto de las proteínas ensayadas (Ag85A, Ag85B, Ag85C y MycP1) (Tripathi, Srivastava et al. 2019).

En un enfoque basado en el análisis de marcos abiertos de lectura (ORF) para la codificación de proteínas, se empleó una biblioteca de fagos F15/LAM4/KZN (técnica

para identificar proteínas de unión a objetivos de interés) del secretoma de *Mtb*. Se identificaron 118 y 96 ORFs de TB y TBL respectivamente, con sueros policlonales inmovilizados obtenidos de voluntarios de África del Sur con TB ($n=20$), TST positivo ($n=15$) y sanos ($n=15$). Posterior a la secuenciación de las clonas seleccionadas, fueron categorizadas como proteínas esenciales para el crecimiento, virulencia y vías metabólicas de *Mtb*. Como biomarcadores de TBA se reportaron las proteínas TrpG, Alr, TreY, BfrA y EspR; y de TBL NarG, PonA1, PonA2 y HspR (Chiliza, Pillay et al. 2019).

En un estudio similar con voluntarios llevado a cabo en China (Zhou, Xu et al. 2017), se identificaron 409 proteínas de *Mtb* asociadas a distintas funciones del bacilo (de latencia, transmembrana, secretadas y de región de diferenciación). Tras su evaluación en ELISA con sueros de pacientes con TBA, TBL y sanos, Rv2659c y Rv3921c mostraron reacción cruzada con los sueros de TBA (sensibilidad 20 y 26% respectivamente). Por su parte, los antígenos MmpL13b, MTV051.15, MTCY164.01 y MoeB1 (todos novedosos como biomarcadores de TBL), presentaron una especificidad mayor a 98% y una sensibilidad de 32 a 43% tras su evaluación individual con sueros de TBL. Sin embargo, en una segunda evaluación conjunta de estos antígenos, se probó que se incrementa la sensibilidad a un 66% y la especificidad se reduce a 87%, ambos valores aceptables para biomarcadores de latencia.

La búsqueda de nuevos biomarcadores que detecten con precisión la infección por *Mtb* aprovecha la disponibilidad de plataformas tecnológicas avanzadas que permiten analizar simultáneamente todas las proteínas que pueden ser sintetizadas por micobacterias viables, así como perfilar globalmente miles de interacciones moleculares en un solo experimento (Song, Wallstrom et al. 2017). Estos nuevos enfoques que las ciencias “ómicas” pueden proporcionar la base para nuevos biomarcadores que conduzcan a un diagnóstico de TB eficaz, rápido, simple y de bajo costo. Lo más probable es que requerirá una combinación de biomarcadores que aumenten su valor predictivo de sensibilidad y especificidad, sobre todo para el estado de latencia.

4.4. Pruebas serológicas para el diagnóstico de TB

Las pruebas que usan suero como muestra para determinar el estado de salud, son adecuadas para países con recursos limitados porque a menudo requieren equipos fácilmente disponibles, aunque estos no sean 100% satisfactorios para la detección de TB. Actualmente, es común tener antígenos precargados en una membrana de nitrocelulosa y agregarles muestras de suero o sangre completa. La detección de reacciones antígeno-anticuerpo ocurre a través de un anticuerpo secundario anti-humano, que puede unirse al oro coloidal u otras moléculas que facilitan la visualización a simple vista. Estas pruebas llamadas en el punto de atención (PoC) a menudo se desarrollan en pocos minutos y, por lo tanto, son candidatos muy atractivos para el diagnóstico de TB simple, preciso, económico e idóneo, sobre todo en localidades donde es difícil conseguir atención médica (Steingart, Henry et al. 2006, Steingart, Henry et al. 2007, Streitz, Tesfa et al. 2007, Sturenburg and Junker 2009). Desafortunadamente, a pesar de las décadas empleadas para desarrollar una prueba serológica idealmente sensible y específica que pueda detectar con éxito la TB, hasta ahora no ha habido ningún avance real. De hecho, hoy en día existen cerca de 40 pruebas disponibles para diagnosticar TB basadas en suero. Estos ensayos difieren en aspectos tales como la composición del antígeno (proteína, carbohidrato o lípido), la naturaleza de la producción del antígeno (nativa o recombinante) y la inmunoglobulina detectada (IgG, IgM o IgA) en la sangre del paciente. De hecho, mediante el empleo de una colección de 355 muestras de suero archivadas y bien caracterizadas (WHO, 2008) se comparó la eficacia de la detección de TB de 19 pruebas comerciales diferentes. Los autores encontraron que la sensibilidad de las pruebas varió de 1 al 60%, con una especificidad que varía de 53 al 98.7%, cuando se comparó con un estándar de referencia combinado de cultivo de micobacterias y seguimiento clínico. Era común que las pruebas que mostraban alta especificidad (>95%) tuvieran una sensibilidad muy baja a baja (0.97 a 21%), con peores resultados en muestras procedentes de pacientes con TB que tenían resultados negativos en la tinción de esputo ácido-alcohol resistente, así como para los pacientes VIH positivos. Para algunas de las pruebas comerciales, se observó una alta variabilidad entre lotes, de funcionamiento, de operador e inter-lectores. De las 19 pruebas evaluadas, 12 de

ellas se consideraron apropiadas para el uso en entornos de atención primaria de salud en países en desarrollo; sin embargo, estos no funcionaron a un nivel lo suficientemente bueno como para reemplazar la microscopía de frotis (Steingart, Ramsay et al. 2007). En el Cuadro 1, se resumen los métodos de diagnóstico mencionados en líneas anteriores, así como las ventajas y desventajas técnicas que cada una ofrece.

Cuadro 1. Métodos utilizados para el diagnóstico de TBA.

Método de Diagnóstico	Ventajas	Desventajas	Referencias
Prueba cutánea de tuberculina con PPD	No requiere preparación de muestras o alta tecnología. Bajo costo y de fácil aplicabilidad.	Alta reactividad cruzada con BCG y micobacterias no tuberculosas.	Orme & Cooper, 1999; Snider, 1985; Lardizabal & Reichman, 2017
Baciloscopia de frotis de esputo	Prueba simple y rápida. Detecta la presencia del bacilo.	Toma de muestra difícil, no específica de <i>Mtb</i> , baja sensibilidad, requiere alta carga bacilar para detección (5,000-10,000 bacilos/mL).	Bates et al., 2016; Tyagi et al., 2017;
Cultivo	Fácil y económico.	Hasta 16 semanas para entrega de resultados.	Bates & Zumla 2016; Tyagi et al. 2017
Serodiagnóstico	Rápido y no requiere instalaciones sofisticadas de laboratorio.	Requiere pretratamiento de las muestras, dificultades en la interpretación de resultados por desconocimiento en la dinámica de la aparición de anticuerpos y su duración.	Steingart et al., 2006; 2007; 2007a; Streitz et al., 2007; Stürenburg & Junker, 2009; World Health Organization, 2008a
Técnicas moleculares	Alta sensibilidad y especificidad.	Requiere instrumentación específica y personal altamente capacitado. No es recomendable como uso rutinario en países endémicos de bajos ingresos	Wallis et al., 2013; Zumla et al., 2014; McNerney et al., 2015; Moore et al., 2006; Centers for Disease Control and Prevention, 2009; Ling et al., 2008.

PPD: siglas en inglés de prueba cutánea de derivado proteico purificado. BCG: bacilo de Calmette-Guérin. *Mtb*: *Mycobacterium tuberculosis*.

Debemos tener en cuenta que la elección de los biomarcadores empleados para el diagnóstico de TB se ha basado principalmente en antígenos y anticuerpos que se han utilizado durante décadas, y que a menudo se basan en criterios como la presencia/ausencia de diferentes micobacterias, sin prestar atención al hecho de que su utilidad puede variar con respecto a la expresión por *Mtb* durante la infección. Es posible que la detección efectiva por anticuerpos también se vea frustrada por la heterogeneidad de las respuestas inmunológicas del hospedero a los antígenos de *Mtb*. Además, es de esperar que el repertorio antigénico de *Mtb* difiera durante las diversas etapas de una infección, así como durante la progresión de la enfermedad.

4.5. Desarrollo de un método serológico de diagnóstico basado biomarcadores

A pesar de los avances en el diagnóstico y el tratamiento, todavía existe una gran carga de morbilidad, y el diagnóstico preciso de la tuberculosis sigue siendo difícil. Al abordar la necesidad de mejores diagnósticos, la OMS lanzó recientemente un perfil de producto objetivo, con base a un consenso que define las características ideales que debería tener un nuevo método de diagnóstico. Esto puso de relieve la gran necesidad de un nuevo método de diagnóstico con excelente sensibilidad que: (1) utilice muestras diferentes de esputo, como sangre, saliva u orina, (2) mantenga una sensibilidad global de más del 80% en pacientes co-infectados con VIH, (3) alcance una sensibilidad de 66% o más en niños con TB positiva para cultivo y (4) sea relativamente simple de emplear (Cuadro 2). Para los métodos basados en muestras de sangre, las células se separan del suero, que se usa como fuente de anticuerpos capaces de detectar componentes presentes en los patógenos. Típicamente, estos anticuerpos son reconocidos posteriormente por otro anticuerpo que está acoplado a moléculas que facilitan la detección por color, luz o emisión de fluorescencia, en ensayos tales como Western blot, ELISA (ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas) o pruebas de flujo lateral. Estos ensayos se basan en la presencia de diferentes anticuerpos que reconocen distintos antígenos, según el estado de la enfermedad (Flores-Valdez et al., 2017).

Cuadro 2. Características de desempeño de una prueba rápida para TB (WHO,2014).

Característica	Requerimiento óptimo	Requerimiento mínimo
Sensibilidad TB en adultos	≥98% con cultivo de baciloscopia positiva ≥68% con cultivo de baciloscopia negativo ≥80% en adultos con VIH/SIDA.	>65% general >98% en pacientes con cultivo de frotis positivo
Sensibilidad TBE en adultos	≥85% en aspirados de ganglios linfáticos o tejido ≥80% en líquido cefalorraquídeo para TB confirmada microbiológicamente	Sin definir
Sensibilidad TB en niños	≥66% para TB confirmada microbiológicamente	Sin definir
Especificidad TB y TBE en adultos y niños	≥98% para TB confirmada microbiológicamente; deberá diferenciar entre TBA, TBL o infección pasada	≥98% para TB confirmada microbiológicamente
Tiempo para obtención de resultados	<20 minutos, incluyendo tiempo de preparación de muestra	<1 hora, incluyendo el tiempo de preparación de muestra
Mantenimiento	De uso único, sin necesidad de calibración	Mantenimiento preventivo hasta después de 1 año o posterior a 1000 muestras consecutivas, empleo de herramientas sencillas y experiencia mínima del analista; incluir alerta de calibración remota.
Costo de prueba (reactivos y consumibles)	<4 Dólares	<6 Dólares

TB: tuberculosis, TBE: tuberculosis extrapulmonar, TBL: tuberculosis latente, DLS: dólares, VIH: virus de inmunodeficiencia adquirida.

La búsqueda de biomarcadores siempre se ha centrado en uno de dos estilos básicos: basado en hipótesis o basado en descubrimientos. Un biomarcador se puede definir como una característica que se mide objetivamente y se evalúa como un indicador de salud o enfermedad, incluidas las variaciones del tratamiento o la progresión/remisión. Un biomarcador determinado puede derivarse del hospedero o de un patógeno, e incluso puede informar sobre el riesgo futuro de enfermedad del paciente cuando la dinámica de una enfermedad es bien conocida (McNerney, Cunningham et al. 2015)

En un metaanálisis (Steingart, Dendukuri et al. 2009), se evaluaron 254 estudios que incluían 36 proteínas (9 nativas/27 recombinantes), 15 antígenos lipídicos y la combinación de otros 30 objetivos, pero en lo general, se observó que la baja sensibilidad y especificidad limitó el uso de estas pruebas serológicas. En otro estudio, se usaron sueros de 500 pacientes para detectar anticuerpos que reaccionan a todo el proteoma de *Mtb* (Kunnath-Velayudhan, Salamon et al. 2010). Los avances recientes en métodos de alto rendimiento facilitan un procedimiento imparcial para buscar nuevos biomarcadores, que requieren bioinformática de alto nivel (plataformas y algoritmos estandarizados). Adicional a la identificación de posibles biomarcadores del estado de la enfermedad, se requieren emplear ensayos posteriores para definir la sensibilidad y especificidad para establecer un diagnóstico, mediante un tamaño de muestra adecuado, la evaluación de los posibles biomarcadores mediante inmunoensayos como ELISA, dividir la cohorte empleada para usar una parte de muestras como entrenamiento de la prueba y una segunda parte, para una validación final de los biomarcadores y entonces, esclarecer su desempeño en una prueba diagnóstica de TB.

4.6. Selección de muestras biológicas utilizadas para la búsqueda de nuevos biomarcadores

Cualquier nueva prueba de diagnóstico será tan efectiva como lo permita la calidad de la muestra, por ejemplo, dado que podría ser la fuente de posibles contaminantes o inhibidores que reducen la sensibilidad de los ensayos. Dentro de la muestra, el o los biomarcadores potenciales, deben prevalecer en una cantidad y escenario espacio-temporal que haga factible su determinación sin verse afectado por otras comorbilidades o factores de confusión de diversa naturaleza. Esto, por supuesto, a menudo resulta en un esfuerzo lejos de ser trivial, principalmente en entornos donde más se necesita un dispositivo de diagnóstico en el mismo punto de atención. En la mayoría de los entornos de recursos limitados, el esputo sigue siendo el espécimen clave empleado para el diagnóstico de TBA, pero la mayoría de los métodos de procesamiento del esputo son crudos (Steingart, Henry et al. 2006). Esto representa una limitación particularmente importante para los pacientes que no pueden producir una cantidad suficiente de esputo, como en personas con infección por VIH o pacientes

pediátricos. Además, la complicación adicional para el cultivo microbiano es el hecho de que los métodos de descontaminación bacteriana pueden reducir la viabilidad de *Mtb* en cerca de $1 \log_{10}$ (McNerney, Maeurer et al. 2012). Las muestras que no sean de esputo (por ejemplo, orina, biopsias, sangre) pueden ayudar a diagnosticar la TB en estos pacientes. El uso de métodos alternativos para obtener muestras respiratorias, aún produce incomodidad y limitaciones prácticas que reducen su aplicación a gran escala. Recientemente, se usaron muestras de heces para controlar la eficacia de la terapia antituberculosa en pacientes, mediante la detección de qPCR de ADN de micobacterias (DiNardo, Kay et al. 2018).

4.7. Identificación y validación de biomarcadores para el diagnóstico de TB empleando muestras diferentes de esputo

Varias iniciativas han exigido una mayor búsqueda de nuevos biomarcadores que diagnostiquen TB con precisión en sus diversas presentaciones clínicas, como las lanzadas por la OMS y la Fundación Bill y Melinda Gates. Es evidente que se necesitan nuevos biomarcadores, de manera que la TBA, la TBL y la ausencia de enfermedad, puedan determinarse con precisión. Estos ensayos podrían permitir determinar el riesgo de reactivación de *Mtb*, o correlacionarse verdaderamente con la eliminación de la infección durante el seguimiento del tratamiento antituberculosis. Un área alternativa al diagnóstico proviene del uso de biomarcadores como marcadores sustitutos de eficacia protectora después de la vacunación (Wallis, Kim et al. 2013).

Los biomarcadores pueden derivarse del hospedero o del agente patógeno, como se mencionó anteriormente, el esputo, la orina o la sangre podrían ser fuentes para detectar *Mtb* o moléculas derivadas de ella (Cuadro 3). Entre las moléculas evaluadas para servir como biomarcadores potenciales para la TB, que utilizan muestras diferentes del esputo, el lipoarabinomano (LAM) del componente de la pared celular de *Mtb* ha sido probado en varios estudios; sin embargo, la prueba comercial disponible que usa orina como muestra tiene poca sensibilidad. Esto puede ser eludido en parte por otros ensayos LAM (Minion, Leung et al. 2011, Chan, Gotze et al. 2015, Hamasur, Bruchfeld et al. 2015), Aunque todavía no es completamente satisfactorio para diagnosticar TB en pacientes infectados por VIH, la detección de ADN y LAM de

Mtb en orina puede ser un ensayo importante para considerar, particularmente en casos con recuentos bajos de células T CD4⁺ (Aceti, Zanetti et al. 1999, Nakiyingi, Moodley et al. 2014, Lawn, Kerkhoff et al. 2015). Diferentes estudios informaron que la detección del antígeno Ag85 (implicado en la síntesis de LAM) es muy variable cuando se usan sangre y orina como muestras clínicas (Miotto, Mwangoka et al. 2013, Huang, Jiao et al. 2015, Ren, Gao et al. 2015).

Cuadro 3. Biomarcadores potenciales para diagnóstico de TB.

Antígeno(s)	Método	Población/Grupo	Resultado diagnóstico	Referencia
Antígenos de fusión				
Rv0057-Rv1352	ELISA	China/69 TBA 60 CNS	60.3% SEN 93.3% ESP	Yang et al., 2015
Rv3019c, Rv1980c	ELISA IgA	Brasil/92 TBE	70% SEN 85.2% ESP 74% SEN 94.4% ESP	Araujo et al., 2010
Rv2031c, Rv1980c, Rv0934	ELISA	China/171 TBA 86 CNS	42.1% SEN 89.5% ESP	Cheng et al., 2011
38F-64F	ELISA	China/TBA TBE	78.64% SEN 90.26% ESP	Feng et al., 2013
Péptidos de antígenos fusionados				
Ag85C, Mpt51, HspX	ELISA	Brasil/TBA CNS	92.45% SEN 71.79% ESP	De Sousa et al. 2012
CFP-10-ESAT- 6-PPE68´	ELISA IgG	China/140 TBA 70 CNS	64.5% SEN 91.4% ESP	Xu et al. 2012
FbpC1, PstS1, HspX	ELISA	Pakistan/180 TBA 100 CNS	72.2% SEN 100% ESP	Afzal et al., 2015
Mtb11, Mtb8, Mtb48, 38kDa	ELISA	Brasil/144 TBA	98% SEN 71.5% ESP	Houghton et al., 2011
ESAT-6, CFP- 10	NanoDisk MS	Estados Unidos/TBA-VIH	91.3% SEN 87.1-100% ESP	Liu et al., 2017
Antígenos recombinantes				
Rv1860_1a, Rv1886_2, Rv3881c_1a	ELISA	Perú, Vietnam/TBA	35% SEN 90% ESP	Broger et al., 2017
Rv0054, Rv0831c, Rv0222 y Rv2031c	HD NAPPA	Estados Unidos, Sudáfrica/TBA, TBA-VIH	Rv0054 (52.4% SEN, EU/VIH+), Rv0831c (60% SEN EU, VIH-), Rv0222 (76.9% SEN SA/VIH-); 80% ESP Rv2031c (45.5% ESP, EU/VIH-) 80% SEN	Song et al., 2017
Rv2031c (14 kDa), Rv0934 (38 kDa), Rv3875 (ESAT- 6) y Rv3763 (16 kDa)	HEMA EXPRESS IgG	Perú/290 TBA, 1096 CNS	30.6% SEN 84.6% ESP	Manga et al., 2016

ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas, TBA: tuberculosis activa, TBE: tuberculosis extrapulmonar, CNS: control negativo sano, SEN: sensibilidad, ESP: especificidad.

4.7.1. Antígenos de fusión

Una de las ventajas de emplear un antígeno multiepítopo en lugar de una mezcla de biomarcadores, es ofrecer un enfoque más estandarizado y disminución de costo de la prueba. (Yan, Yi et al. 2018) probaron la proteína de fusión 38kDa-16kDa (Rv0057-Rv1352) en sueros de 69 pacientes con TB y 60 con enfermedades no respiratorias como control en un formato ELISA, la sensibilidad alcanzó un 60.3%, mayor a 58.8% resultado de 38kDa-16kDa. Para el caso de TB extrapulmonar, (Araujo, Macias-Segura et al. 2018), evaluaron una ELISA basada en el reconocimiento de IgA a la proteína de fusión de los antígenos Mt10.3 (Rv3019c) y Mpt64 (Rv1980c) en 92 muestras de fluido pleural, logrando sensibilidad similar a la del examen patológico es decir de 70% y 74%, respectivamente. Mientras que, en muestras con cultivo negativo e histopatología no específica, la prueba presentó mayor especificidad 85.2% y 94.4%. En un ensayo se sustituyó en un kit comercial de ELISA TB-DOT la fusión de los antígenos inmunodominantes 38kDa-16kDa-ESAT-6, la cual resultó en una distinción mucho mayor entre los pacientes con TB de los controles sanos; el área bajo la curva característica de funcionamiento del receptor fue de 0.75, y una sensibilidad y especificidad del 65.4% y 84.8% respectivamente, para detectar respuesta de anticuerpos de los antígenos recombinantes ensayados, por lo que resultó más eficaz el antígeno recombinante 38kDa-16kDa-ESAT-6 que el kit comercial ELISA TB-DOT para distinguir pacientes con TB de los controles sanos (Wu, Zhang et al. 2011).

Otra proteína de fusión compuesta por los antígenos HspX (Rv2031c), Mpt64 (Rv1980c) y PstS1 (Rv0934), se probó de manera conjunta e individual (proteína por proteína) en una ELISA. Tras evaluar a 171 pacientes con TB y 86 controles sanos, la proteína de fusión alcanzó valores de sensibilidad y especificidad de 42.1% y 89.5%, mientras que de manera individual mostraron menor desempeño (HspX: sensibilidad 19.9%, especificidad 96.5%; Mpt64: sensibilidad 75.4%, especificidad 34.9%; PstS1: sensibilidad 33.3%, especificidad 83.7%) (Cheng, Zhao et al. 2011), por lo que el empleo de más de un antígeno mejora de manera significativa el desempeño general de la prueba de diagnóstico. En un estudio (Feng, Xiu et al. 2013) se construyeron dos fusiones, cada una compuesta por tres antígenos 38F (38kDa-ESAT6-CFP10) y 64F (Mtb8.4-Mpt64-TB16.3-Mtb8), para dar lugar a la multiproteína 38F-64F la cual fue

evaluada con TB pulmonar y TB extrapulmonar. La sensibilidad de la ELISA fue mucho mayor que la prueba de esputo (78.64% vs 47.57%), respecto a TB extrapulmonar la prueba mantuvo alta sensibilidad (74.16%), así como una especificidad del 90.36% en suero de pacientes sanos.

4.7.2. Segmentos de antígenos de fusión

Otro enfoque para el serodiagnóstico de TB es la fusión de pequeños segmentos de aminoácidos (péptidos), que contienen epítomos de células B lineales conocidos en lugar de emplear proteínas completas. Un ejemplo se presenta en el estudio conducido por (de Sousa, da Costa et al. 2012), tras evaluar la proteína de fusión con segmentos de los antígenos Ag85C, Mpt51 y HspX involucrados en la respuesta inmune de pacientes con TB. Empleando sueros de pacientes con TB y sujetos sanos en una ELISA lograron una sensibilidad y especificidad de 92.45% y 71.79% respectivamente. (Xu, Chen et al. 2012), hicieron la detección de anticuerpos IgG en suero de 140 pacientes con TB y 70 sanos mediante una ELISA con la proteína de fusión CFP-10-ESAT-6-PPE68' la cual logró resultados de sensibilidad y especificidad del 64.5% y 91.4% respectivamente, así como también los autores reportan una mayor liberación de IFN- γ por la proteína de fusión, respecto del antígeno específico por el cual es inducida su liberación (CFP-10-ESAT-6) en pacientes con TB. En 2015, Afzal et al. elaboró diferentes construcciones con fragmentos de los antígenos-Ag85C, PstS1 y HspX para su evaluación en una ELISA con muestras de plasma de pacientes con TB, los autores obtuvieron una sensibilidad similar tanto en la multiproteína (72.2%), como por separado. A pesar de la dificultad que implica la fusión de proteínas, hay reportes en donde han probado hasta cuatro antígenos combinados: Mtb11, Mtb8, Mtb48 y 38kDa. La prueba ELISA mostró una especificidad de 71.5% y sensibilidad de 98% en población brasileña (144 pacientes con TB confirmada), así como también mostró un excelente desempeño en sujetos con VIH-TB (Houghton et al., 2011).

Liu et al., (2017), desarrollaron un método rápido para cuantificar la concentración de péptidos de ESAT-6 y CFP-10, utilizando nanopartículas de silicio discoidales porosas (nanodiscos) marcadas con anticuerpos y enfocadas en la energía y espectrometría de masas (MS) de alto rendimiento (NanoDisk-MS) para mejorar la sensibilidad y

especificidad de una prueba diagnóstica de TB. Los autores reportan una sensibilidad robusta, siendo para los casos con TB pulmonar con cultivo positivo de 91.3% y 82.4% con cultivo negativo, 91.3% para TB extrapulmonar y del 75% para pacientes con VIH positivo. La NanoDisk-MS exhibió una alta especificidad del 87.1-100% en grupos sanos y de alto riesgo. La cuantificación absoluta de la concentración de antígeno de *Mtb* en suero resulta informativa para evaluar las respuestas al tratamiento antimicobacteriano (Liu, Zhao et al. 2017). Por lo tanto, un enfoque de ensayo de NanoDisk-MS podría mejorar significativamente el diagnóstico y el manejo de los casos de TB activa, y quizás también de otras enfermedades infecciosas.

4.7.3. Antígenos recombinantes

Por su parte, el empleo de proteínas recombinantes ofrece resultados mucho más prometedores para el diagnóstico de TB. (Broger, Basu Roy et al. 2017), tras evaluar un total de 57 antígenos manera individual, Mpt32 (Rv1860_1a), HspX (Rv2031c) y Ag85B (Rv1886_5) reportaron mejores valores de sensibilidad y especificidad en un formato ELISA empleando muestras de suero de pacientes de Perú y Vietnam; Mpt32 con 32% de especificidad y 85% de sensibilidad, HspX con 90% de especificidad y 25% de sensibilidad, y Ag85B con 15% de especificidad y 31% de sensibilidad. Posteriormente hicieron ensayos para conocer el efecto de emplear una combinación de tres antígenos en la prueba. Encontrando que la combinación Mpt32, Ag85B, y mycP1 (Rv3883c_1a) mejora el desempeño de la sensibilidad de la prueba a un 35% (31 - 40, IC del 95%), mientras que la mejor especificidad de la prueba para TB fue del 34% (29 - 40, IC del 95%) para la combinación de Mpt32, Ag85B y *esxB* (Rv3874_1a), que está significativamente por encima del rendimiento de los mejores antígenos individuales. Los autores discuten que el efecto de mostrar buenas características de desempeño (sensibilidad y especificidad) en la prueba diagnóstica de forma individual, es atribuible a la naturaleza de los antígenos, Mpt32 una glicoproteína presente en la fracción inmunodominante de la micobacteria, mientras que Ag85B participa en la micolilación de la pared celular y también es de naturaleza inmunodominante. Por su parte, HspX es una proteína de pared celular de 16 kDa inducida por anoxia, participa en el mantenimiento de la viabilidad a largo plazo durante infecciones asintomáticas latentes y en la replicación durante la infección inicial.

Adicionalmente, mencionan que el empleo de otros antígenos como Mtb48, aunque se desconoce su función, se tiene evidencia de que su inclusión en pruebas serológicas con otros biomarcadores y puede mejorar la sensibilidad de la misma, lo mismo para el antígeno 38kDa (Lodes et al., 2001).

En una estrategia más amplia que permite la detección de biomarcadores de TB, mediante la generación de una matriz de proteínas programables de ácido nucleico de alta densidad (HD-NAPPA) del genoma completo de *Mtb* Liu et al. (2017), analizaron sueros de pacientes y controles de TB no infectados y coinfectados con VIH, correspondientes a personas de Estados Unidos y Sudáfrica. Con base en los resultados de ELISA, fueron identificados biomarcadores que pudieran discriminar entre la ausencia y presencia de TB de acuerdo a la procedencia de los pacientes (Estados Unidos y Sudáfrica) y la comorbilidad de VIH. De las proteínas identificadas con mayor sensibilidad a una especificidad de 80%, para los cuatro subgrupos de estudio se enuncian las siguientes: Ssb (52.4%, EU/VIH+), MTV043.23c (60% EU, VIH-) y echA1 (76.9% SA/VIH-). Por otro lado, la proteína con mayor especificidad y una sensibilidad del 80% fue HspX (45.5%, EU/VIH-).

Recientemente se reportó una prueba rápida TB-XT HEMA-EXPRESS, ensayo de inmunocromatografía de flujo lateral para la detección de anticuerpos IgG contra proteínas específicas del complejo MTB: HspX, PstS1, ESAT-6 y LpqH. Su evaluación en un estudio de detección de TB en Perú (con pacientes 290 TB y 1096 no infectados) resultó en una sensibilidad del 30.6% y especificidad del 84.6%. Sin embargo, el análisis del rendimiento en diferentes poblaciones con distintos niveles de exposición indica que, con una prevalencia baja de TB los resultados de desempeño de la prueba presentan valores más en línea a los requeridos por la OMS, con una sensibilidad 58.3-77.8% y especificidad 96.1-97.3%. En consideración con lo anterior, los autores exponen una correlación inversa significativa entre la precisión de la prueba y la prevalencia de TB en las poblaciones de estudio empleadas (Manga, Perales et al. 2016).

La producción de proteínas antigénicas de *Mtb* es altamente probable que no permanezca igual durante los diferentes estados infecciosos, ya que se requiere una

adaptación por la respuesta inmune y nichos colonizados. En consecuencia, el perfil de anticuerpos de la persona infectada con TB, también cambiaría con las etapas de la enfermedad. Por lo que el empleo de una combinación de antígenos, que reconocen diferentes tipos de TB (activa y latente) podría aumentar el espectro del reconocimiento del paciente con TB en una prueba serodiagnóstica. Algunos estudios (Goletti, Lee et al. 2018), han enfatizado en la necesidad de probar y validar biomarcadores para el diagnóstico de TB en cohortes de TB humanas bien caracterizadas de diferentes poblaciones alrededor del mundo, tomando en cuenta aspectos que incluyen ubicación geográfica, factores genéticos, ambientales, exposición a micobacterias no tuberculosas, estado nutricional y estado metabólico, edad y otros factores que afectan la respuesta del hospedador inmune y del hospedero, para poder discernir qué biomarcadores podrían correlacionarse con una TB específica para cada grupo, y estos autores sugirieron que esto podría ayudar a desarrollar ya sea una prueba serológica universal o, alternativamente, una específica para cada población donde la incidencia de TB sigue siendo alta.

4.8. Desarrollo y validación de una prueba serodiagnóstica para TB

Una prueba diagnóstica persigue discriminar entre dos condiciones de interés, salud o enfermedad, e incluso en algunos casos graduar el grado de afección. Las pruebas diagnósticas suelen evaluarse matemáticamente, para estimar parámetros de precisión como sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos. Dichas estrategias matemáticas permiten cuantificar lo observado, sin embargo para un diagnóstico final, se requiere emplear juicio clínico para determinar la calidad de dicha observación y en consecuencia, es necesario tomar en cuenta algunas características como (1) la selección de casos y controles bajo los mismos criterios, (2) inclusión de todo el espectro de severidad de la enfermedad (procurando que cada estrato cuente con un número adecuado de sujetos), (3) la interpretación tanto del estándar de oro como de la prueba en estudio preferentemente deberá ser a ciegas y por expertos, (4) la interpretación de resultados de la prueba debe mostrar su aplicación en la vida cotidiana y (5) comprobar la reproducibilidad de los resultados. No obstante, es indispensable tener un conocimiento pleno del desempeño de la

prueba diagnóstica y considerar la parte clínica para su correcta aplicación (Talavera-Paulin, Garcia-Morales et al. 2016).

La sensibilidad y especificidad son parámetros de toda prueba diagnóstica e indican su eficacia. La sensibilidad se define como la probabilidad de obtener un resultado positivo de la prueba en sujetos con la enfermedad y es expresada en porcentaje, es relacionada con el potencial de la prueba misma para reconocer sujetos con la enfermedad. Por otro lado, la especificidad representa la probabilidad de un resultado negativo en un sujeto sin la enfermedad. El cálculo de sensibilidad y especificidad para una prueba dicotómica (presencia o ausencia de la enfermedad) se basa en la elaboración de una tabla de contingencia, en la que se contrasta el resultado de la prueba diagnóstica contra el diagnóstico definitivo del parámetro ideal (estándar de oro, que representa la prueba de mayor confiabilidad). Por lo que, el cálculo de dichos parámetros dictaminará la probabilidad de tener o no la enfermedad (Raslich et al., 2007).

Los valores predictivos (positivo y negativo), evalúan la eficacia de la prueba diagnóstica, miden la probabilidad de obtener resultados válidos (verdaderos) entre el total de resultados y son función de la prevalencia de la enfermedad. El valor predictivo positivo (VPP), corresponde a la probabilidad condicional de que el paciente tenga la enfermedad, dado que el test fue positivo o bien, la proporción de pacientes con la prueba diagnóstica positiva que efectivamente tienen la enfermedad. Mientras que, el valor predictivo negativo (VPN) corresponde a la probabilidad de que el paciente no tenga la enfermedad, dado que la prueba resultó negativa, es decir, la probabilidad de que el individuo no tenga la enfermedad luego de un resultado negativo del test. Por último, las razones de verosimilitud (LR) se definen como la razón de probabilidad de un resultado específico en pacientes con la enfermedad con respecto de aquellos que no la tienen. En el caso de una prueba dicotómica, la LR+ toma valores entre el 1 y el infinito, se calcula como la sensibilidad dividida por el resultado de la resta de 1 menos la especificidad o bien, el cociente de verdaderos positivos dividido por los falsos positivos. Por otro lado, la LR- del 1 al 0, es calculada como la especificidad dividida entre la resta de 1 menos la sensibilidad o, el cociente de los falsos negativos entre

los verdaderos negativos. Si la LR es igual a 1, la probabilidad de diagnóstico es igual antes y después de aplicar la prueba, por lo que no tiene capacidad discriminante. Cuanto más se aleje del 1 el valor de la razón de verosimilitud, la prueba poseerá mayor fuerza para sacar de la zona de incertidumbre diagnóstica (Bravo and Cruz, 2015).

En una prueba diagnóstica de escala, se categoriza al paciente como positivo o negativo, de acuerdo con un resultado numérico. En este tipo de prueba los resultados son de naturaleza cuantitativa y el resultado es un número, rango o un nivel. En estos casos, la decisión que permite separar a los enfermos de los no enfermos, es equivalente a señalar un punto, en el rango de los resultados posibles. De modo que, para conocer la eficacia de la prueba es necesario definir un punto de corte (PC), que permita declarar a los pacientes con resultado positivo o negativo, y estimar entonces los indicadores descritos en los párrafos anteriores. Dado que, las estimaciones de sensibilidad y especificidad dependerán directamente del PC, elegir el punto de corte óptimo es de suma importancia.

La curva de característica operativa del receptor (ROC), es una representación gráfica para evaluar la capacidad de una prueba para diferenciar entre aquellos con enfermedad y aquellos sin enfermedad. Se basa en la noción de una escala de operador, donde los resultados para los enfermos y los no enfermos forman un par de distribuciones superpuestas, y la completa separación de dichas distribuciones subyacentes implica una prueba con discriminación perfecta, mientras que, en caso contrario, la superposición completa es indicador de discriminación nula. La curva ROC, resulta de la sensibilidad de la prueba (o tasa de verdaderos positivos) en el eje X, frente a su 1-especificidad o tasa de falsos positivos (TFP) en el eje Y. En la curva ROC, la sensibilidad y especificidad varían a través de diferentes umbrales y la sensibilidad es inversamente relacionada a la especificidad, por lo que seleccionar un punto con alta sensibilidad puede comprometer la especificidad (Park et al., 2014).

El área bajo la curva (AUC) resultante de la curva ROC, determina la capacidad inherente de la prueba para discriminar entre las poblaciones enferma y no enferma evaluadas. Se puede interpretar como la probabilidad de que un sujeto enfermo

elegido al azar sea clasificado como más propenso a estar enfermo, que un sujeto no enfermo elegido al azar. Dicha interpretación se basa en estadísticas no paramétricas de Mann-Whitney U. La otra interpretación, es el valor medio de sensibilidad para todos los valores posibles de especificidad. Un AUC máximo igual a 1, significa que la prueba diagnóstica es perfecta para la diferenciación de enfermos y no enfermos. Lo anterior sucede cuando la distribución de los resultados de la prueba para enfermos y no enfermos no se superponen; AUC igual a 0.5 indica que probabilidad de discriminación de la prueba, está ubicada en la línea diagonal de probabilidad de la curva ROC. El AUC mínimo, debe considerarse como un nivel de probabilidad de la prueba, por lo que, en un escenario más realista, esta debiera mantenerse entre 0.5 y 1, para que la prueba diagnóstica pueda discriminar enfermos de no enfermos con éxito (Hajian-Tilaki 2013).

La validación del ensayo es un proceso para determinar la idoneidad de un método de laboratorio dado para proporcionar datos analíticos útiles. Asegura la fiabilidad y la reproducibilidad del ensayo. El proceso requiere una reevaluación del rendimiento de la prueba para cada población de muestras a las que se aplica. La necesidad de tiempo es que el enfoque debe estar en la implementación del ensayo utilizando antígenos con buen rendimiento (Jacobson, 1998).

4.9. Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis* en comorbilidad con Diabetes Mellitus

El riesgo de contraer TB se triplica en pacientes diabéticos, de acuerdo a lo reportado en una revisión de 13 estudios observacionales, el rango de riesgo de ATB en presencia de DM puede variar de 0.99 hasta 7.83 veces, debido en gran parte a la hiperglucemia crónica característica de este padecimiento (Jeon and Murray 2008). En población inmunocomprometida por diabetes mellitus, generalmente el sitio de infección de *Mtb* es en pulmón en el 70 a 80% de los casos, lo cual no ocurre en coinfección por VIH/SIDA en donde puede presentarse TB extrapulmonar. Se ha reportado que los mecanismos modificados por DM en el hospedero, tienen que ver con la susceptibilidad de éste a la infección por *Mtb* (Martinez and Kornfeld 2014), así como el incremento de la severidad de la infección (Baker, Harries et al. 2011). En un

estudio prospectivo, en 1262 pacientes del sur de México se confirmaron tasas incrementadas de probabilidad (ORs, por sus siglas en inglés), mayor severidad de lesiones en radiografías (OR=1.80), conversión retrasada del esputo (OR=1.51), fracaso de tratamiento para TB (OR=2.93), reactivación de TB (OR=1.76) y recaída de TB (OR=1.83) en diabéticos, respecto a los individuos sin DM (Jimenez-Corona, Cruz-Hervert et al. 2013).

Debido al alto riesgo de progresión de LTB a TBA, altas tasas de frotis de esputo positivo y un índice incrementado de recurrencia/recaída post tratamiento de TBA, los pacientes con TB/DM representan una contribución desproporcionalmente mayor a la transmisión de TBA (Alisjahbana, Sahiratmadja et al. 2007, Martinez and Kornfeld 2014).

4.9.1. Rol de la inmunidad innata en la susceptibilidad a TB en individuos con DM

De manera general, la DM está asociada a una respuesta innata defectuosa y temporalmente demorada ante la inhalación del bacilo de *Mtb* por parte del hospedero, lo cual da como resultado un retraso crítico en la activación de la inmunidad adaptativa, por ende, en individuos diabéticos es común encontrar una mayor carga bacilar e inflamación severa al momento del diagnóstico de TBA.

Los macrófagos alveolares residentes son los primeros en infectarse de la micobacteria inhalada, al no lograr restringir la replicación de *Mtb*, producen señales para el reclutamiento de macrófagos, neutrófilos y células dendríticas vírgenes al alveolo. En individuos diabéticos, la activación oportuna de macrófagos alveolares se encuentra alterada derivado de un fenotipo de superficie en el que la producción de óxido nítrico se encuentra disminuida (Sugawara and Mizuno 2008). La capacidad para detener la maduración de fagosomas en macrófagos, es uno de los mecanismos clave en la virulencia de *Mtb* que le permite continuar su replicación intracelular en individuos coinfectados con diabetes. La perturbación de la función de monocitos/macrófagos o células dendríticas se ha estudiado en modelos murinos, donde se ha observado disminución en el reclutamiento de éstas por macrófagos en ratones hiperglucémicos coinfectados (2 semanas post infección). En cuanto a lesiones inflamatorias en

pulmón, no hubo diferencia significativa entre el grupo control y el hiperglucémico coinfectado (4 semanas post infección) (Vallerskog, Martens et al. 2010).

En una segunda fase la infección se propaga a las células reclutadas, que posteriormente transportaran los bacilos a los ganglios linfáticos que drenan los pulmones, donde se inicia la respuesta adaptativa (7-10 días post infección). Las células T específicas de antígeno se trasladan a los pulmones y median una respuesta efectora capaz de restringir la replicación de *Mtb* (día 15 post infección), para su eliminación o encapsulación de la misma, para mantener una etapa de latencia de la infección. Dado que la función centinela de macrófagos se encuentra dañada por efecto de la DM, lo anterior resulta en la expresión de señales reducida para reclutamiento de macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y linfocitos innatos en el espacio aéreo del pulmón, una vez que el bacilo se ha internado en el hospedero. La hipótesis de la función centinela defectuosa de macrófagos, es soportada por resultados que muestran capacidad reducida de unión o de ingesta de bacilos de *Mtb* por parte de los monocitos de sangre periférica en pacientes con DM, respecto del grupo control, este fenotipo se ha asociado al mal control del índice glucémico en diabéticos (Gomez, Twahirwa et al. 2013).

Los hospederos diabéticos, tardan en generar una respuesta innata a los macrófagos alveolares inicialmente infectados por *Mtb*. La demora en el reclutamiento de células dendríticas mieloides (CDm) en el espacio aéreo alveolar para adquirir bacilos producida por condiciones de hiperglicemia en individuos con DM (Vallerskog, Martens et al., 2010), conduce demoras en la entrega de antígeno a los ganglios linfáticos torácicos y la subsiguiente expresión de inmunidad adaptativa en el pulmón durante el periodo de replicación logarítmica de *Mtb*. Lo anterior da como resultado una carga bacteriana pulmonar más alta, asociada con una mayor gravedad de la patología.

Los neutrófilos por su parte, juegan un rol protector en la infección por *Mtb*, acelerando el inicio de la cinética inmune y reclutando Th1 en el pulmón de ratones infectados. Otros efectos observados en neutrófilos de sujetos hiperglucémicos como: adhesión incrementada y expresión de integrinas, quimiotaxis reducida, defecto fagocítico, así como actividad microbicida reducida por efecto de DM. En cuanto a las proteínas de

matriz pulmonar, estas presentan un recambio lento y glicación acumulada a lo largo de la infección, lo cual sugiere un mecanismo de barrera de inflamación innata retardada en los pulmones de un paciente diabético. (Zhang, Xiao et al. 2011) por su parte, reportan una alta proporción de NTKs en sangre periférica y lavados broncoalveolares en diabéticos.

Otros factores adicionales que contribuyen a la inflamación excesiva en DM pueden ser atribuidos a una deficiencia relativa de las células T reguladoras, la muerte acelerada de macrófagos infectados con *Mtb* debido a un aumento de metilglicoxal intracelular y los efectos proinflamatorios intrínsecos de la DM resultantes del aumento de la generación mitocondrial de super óxido.

4.9.2. Rol de la inmunidad adaptativa en la susceptibilidad a TB en DM

Recientemente se ha reconocido que las células B y los anticuerpos tienen una variedad de mecanismos para la modulación de la respuesta inmune a bacterias intracelulares. Las células B son un componente celular importante del granuloma pulmonar característico en TB, donde pueden procesar y presentar antígenos a las células T, secretar anticuerpos y modular la inflamación a través de la producción de IL-10 (Scriba, Coussens et al. 2017). Los plasmoblastos y las células B de memoria se encuentran elevados en pacientes infectados con *Mtb*, en comparación con los controles no infectados (Sebina, Biraro et al. 2014) y se ha demostrado que las células B humanas *in vitro* ingieren micobacterias, producen IgM y regulan positivamente la expresión de moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y la quimiocina CXCL10 (Rao, Valentini et al. 2015, Zhu, Zhang et al. 2016).

Se ha puesto mucho énfasis en antígenos inmunodominantes de *Mtb* dirigidos por las respuestas de las células T como ESAT-6, CFP-10, TB10.4, Ag85A y Ag85B, mismos que han sido incorporados en vacunas de subunidades. Sin embargo, un análisis reciente de todo el genoma de las respuestas de las células T CD4 a los antígenos de *Mtb* en adultos con infección latente (TBL), reveló que la respuesta de las células T CD4 se dirige a una amplia gama de 80 antígenos. Casi la mitad de los epítomos identificados en este estudio se derivaron de proteínas no identificadas previamente como antígenos de células T.

La infección por *Mtb* induce anticuerpos específicos de micobacterias contra una amplia variedad de antígenos, sin que un solo antígeno o grupo de antígeno emerja como un objetivo preferencial para una respuesta de anticuerpos. Estudios han reportado proporciones aproximadamente iguales de IgG e IgM en respuesta a la superficie celular viva, lisado de células completas, lipoarabinomano (LAM), pared celular y proteínas micobacterianas secretadas en controles infectados y no infectados con *Mtb* (Perley, Frahm et al. 2014). Diversos estudios coinciden en que los niveles de anticuerpos en la infección por *Mtb* son variables, con un alto grado de superposición entre individuos infectados y controles sanos. Sin embargo, se han presentado casos donde se ha evidenciado mayor separación entre las poblaciones control e infectados por *Mtb* (definidos como IGRA+ ó TST+) con 80% de sensibilidad y 93% de especificidad usando IgA específica de AlaDH (Rv2780), y 84.2% de sensibilidad y 93% de especificidad usando IgA-NarL (Rv0844c) específica; mientras que en un estudio separado, reportaron 74% de sensibilidad y 83% de especificidad empleando una combinación de IgA e IgG específicas para LAM y PE35 (Rv3872) (Baumann, Kaempfer et al. 2015). En el estudio efectuado por (Perley, Frahm et al. 2014), reportan una mejor discriminación al medir anticuerpos dirigidos contra la superficie de células vivas de micobacterias en comparación con la pared celular, LAM o proteínas secretadas de *Mtb*.

En individuos inmunocomprometidos con DM, la participación de los anticuerpos ante la infección por *Mtb* aún no se comprende bien. Un estudio de pacientes con DM reportó un porcentaje menor de plasmablastos secretores de anticuerpos específicos de antígeno, pero cuando éstos fueron estimulados con LPS, las células B del grupo con DM produjeron mayores títulos de IgM e IgG (Zhai, Qian et al. 2016). No hubo diferencias entre los títulos de IgA con respecto de los controles sanos, además, el fenotipo de células B encontrado en individuos con DM, fue similar al de pacientes obesos. Lo anterior puede indicar que, en el entorno proinflamatorio, los pacientes con DM tienen células B fácilmente activadas que producen isotipos de anticuerpos IgG e IgM, sin embargo, dichos anticuerpos pueden no estar dirigidos a potenciar la enfermedad, contrarrestando cualquier efecto de neutralización protectora (Zhai, Qian et al. 2016).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Cada año la OMS reporta cerca de 10 millones de casos nuevos de TBA en el mundo y 1.2 millones de personas mueren a causa de esta enfermedad. Con todo y los esfuerzos realizados por los gobiernos de diferentes países para controlar la incidencia de TBA, su éxito se ve limitado en parte por la extensión de tiempo para establecer un diagnóstico diferencial el cual puede tardar hasta 12 semanas, esto a pesar de contar con gran variedad de pruebas para ello. La TBA ocupa el lugar decimoséptimo entre las causas de muerte en México, además, la enfermedad frecuentemente se asocia a padecimientos prevalentes en el país como diabetes mellitus (DM), desnutrición, alcoholismo y VIH/SIDA. De estas comorbilidades la DM es la que ocupa el mayor número de casos asociados a TB con un 49% en nuestro país. Un problema adicional cuando se detecta TBA en personas con diabetes, es la frecuente aparición de bacilos con fármaco resistencia. Por lo anterior, actualmente se sugiere confirmar o descartar que haya diabetes en toda persona que tenga contacto con enfermos de TB o bien este infectada, así como realizar una revisión continua de las personas diabéticas, a fin de reducir su riesgo de infección y desarrollo de TB. Actualmente, se desconoce el desempeño en individuos diabéticos de la mayoría de las pruebas empleadas para el diagnóstico de TB en personas sin DM. Por ende, la implementación de un método de diagnóstico que cuente con un nivel de sensibilidad y especificidad de al menos 80%, para detectar la infección por *Mtb* en pacientes asintomáticos al contagio por el bacilo, y que cursan con DM, permitirá un diagnóstico temprano para TB, proporcionando así la oportunidad de dar el tratamiento adecuado para ambas enfermedades, de tal manera que se pueda disminuir las complicaciones asociado a ambos padecimientos.

6. JUSTIFICACIÓN

La creciente tasa de incidencia tanto de TB como DM supone una preocupación por entidades de la salud tanto mundiales como nacionales, esto debido a que el efecto de ambos padecimientos entre sí dificulta el diagnóstico y tratamiento oportuno de TB. Si bien actualmente existen diferentes métodos de diagnóstico moleculares, no moleculares, de cultivo líquido, microscópicos, entre otros, estas nuevas técnicas de diagnóstico están bien establecidas en los países desarrollados; sin embargo, los costos elevados y la necesidad de experiencia técnica limitan su aplicación. De esta manera surge la necesidad de una herramienta de diagnóstico con características de desempeño deseables, económica y que no requiera de equipo ni personal especializado, para brindar un diagnóstico y tratamiento oportuno en la comorbilidad TB/DM, la cual esté basada en la detección de IgG generados como respuesta a los biomarcadores específicos HspX, Ag85a, Ag38kDa, Mpt64 y ESAT6-CFP10 de la micobacteria.

7. HIPÓTESIS

Los antígenos HspX, Ag85A, Ag38kDa, Mpt64 y ESAT6-CFP10 permitirán el diagnóstico de infección por *Mycobacterium tuberculosis* en un prototipo tipo ELISA con sensibilidad y especificidad $\geq 80\%$ en personas con diabetes mellitus.

8. OBJETIVOS

8.1. General

Comparar el desempeño de los antígenos HspX, Ag85A, Ag38kDa, Mpt64 y ESAT6-CFP10 en un prototipo tipo ELISA para la detección de una infección por *Mtb*, en sueros de personas con y sin diabetes mellitus.

8.2. Específicos

- Seleccionar antígenos potenciales para el diagnóstico de TB mediante un estudio retrospectivo.
- Determinar las condiciones de expresión y purificación para los antígenos recombinantes seleccionados en el objetivo anterior.
- Estandarizar un ensayo tipo ELISA para la detección de antígenos de *Mtb*, mediante pruebas de desempeño (sensibilidad, especificidad, VPP, VPN) con sueros obtenidos de voluntarios con y sin TB, en presencia o ausencia de DM.

9. METODOLOGÍA

9.1. Obtención de muestras biológicas y criterios de inclusión

Para este estudio, todos los participantes son mexicanos, mujeres y hombres de clase media, que residen en áreas urbanas y suburbanas de Nuevo León y Tamaulipas, de entre 20 y 60 años y que asistan a consulta en Centros de Salud de algunas comunidades urbanas y suburbanas, por 12 meses durante el periodo 2017-2018. Se les informó mediante un consentimiento firmado y se contó con un protocolo aprobado por el comité de ética de la UDEM con registro 02012017-CIE. Todos los procedimientos para la obtención de muestras contemplaron la Declaración de Helsinki, en el artículo 100 de la Ley General de Salud y en los artículos 13 a 18, 20 a 22 y 113 a 120 de la regulación de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud en relación con la ética en la investigación. Dentro de la población se solicitó la participación voluntaria y se seleccionaron dos cohortes de participantes, con y sin diagnóstico de DM. Los pacientes fueron separados en dos grupos según el resultado (positivo o negativo) obtenido en la prueba de Quantiferon TB gold in tube (QFT-GIT) (siguiendo las especificaciones del proveedor, por el grupo de la Universidad de Monterrey). Se obtuvo una muestra de sangre del paciente y se separó el suero o plasma a través de centrifugación y se congeló (-20°C) hasta su procesamiento. Como criterios de exclusión se tuvieron los siguientes: pacientes con cáncer o tratamientos esteroideos, pacientes con diabetes, sin diagnóstico confirmatorio de diabetes, con niveles de glucosa en ayuno de entre 105 y 125 mg/dL. Pacientes sospechosos de tener tuberculosis sin diagnóstico confirmado. Finalmente, como criterios de eliminación de la muestra seguimos: voluntarios a los que no se les puede obtener sangre, o se arrepientan de participar en el estudio, o que no proporcionen la información solicitada.

9.2. Plásmidos recombinantes

Se contó con la donación de plásmidos recombinantes por parte de BEI Resources (Cuadro 4). Para su preservación se transformaron 50 µL de células electrocompetentes *E. coli* Top 10 y BL21 (DE3) (NEB, EU), cada una se homogeneizó con 2 µL del plásmido recombinante, se transfirió a una celda de 0.4 cm (BioRad, USA), se incubó 2 min en hielo, se limpió la celda con papel secante y se electroporó

en el sistema Gene Pulser Xcell™ (BioRad, USA) con las siguientes condiciones: 1.75 kvolts, low range 200 Ω, high range 1000 Ω. Se transfirió a un tubo estéril de 1.5 mL y se agregó 1 mL de medio SOC (NEB, EU) para incubar y recuperar el cultivo a 37°C por 60 min con agitación a 250 rpm. Se inocularon 50 y 100 µL de la suspensión de células transformadas en placas de LB/Amp₁₀₀ y se incubó a 37°C por 12 hrs. Las colonias seleccionadas se inocularon en medio LB/Amp₁₀₀ seguido de una incubación O.N. a 37°C y 250 rpm. Posteriormente se tomaron 500 µL del cultivo y se mezclaron con 500 µL de glicerol 10% frío, para mantener en ultracongelación (-80°C) hasta su uso. La obtención del antígeno recombinante fusionado ESAT6-CFP10 codificado por pET28a, se obtuvo de acuerdo a protocolos publicados en (Gutierrez-Ortega, Moreno et al. 2021).

Cuadro 4. Construcción de plásmidos recombinantes.

Plásmido recombinante	Plásmido de clonación	Gen insertado	Proteína de <i>Mtb</i> que codifica	Catálogo
pMRLB.12	pET15b	<i>Rv1980c</i>	Mpt64	NR-13273
pMRLB.15	pET15b	<i>Rv2031c</i>	HspX	NR-13274
pMRLB.2A	pET15b	<i>Rv0934</i>	Ag38kDa	NR-13277
pMRLB.12	pET15b	<i>Rv3804c</i>	Ag85A	NR-13292
pUC57	pET28	<i>Rv3875-Rv3875</i>	ESAT6-CFP10	--

Para la verificación de los plásmidos recombinantes se hizo la extracción de cada uno con el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, EU), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Partiendo de un cultivo de toda la noche de *E. coli* Top 10 transformada con el plásmido recombinante se precipitó 1 mL de cultivo a 13,000 rpm por 5 min. Se descartó el sobrenadante y añadieron 250 µL de la solución amortiguadora P1. Se adicionaron 250 µL de la solución amortiguadora P2 y se homogenizó por inversión de cuatro a seis veces. Se agregaron 350 µL de la solución amortiguadora N3 y nuevamente se homogeneizó. Se centrifugó por 10 min a 13,000 rpm en microcentrífuga. Se colocaron 800 µL del sobrenadante en una columna spin QIAprep

2.0 y se centrifugó durante 1 min para unir el material genómico a la membrana; se descartó el sobrenadante del tubo de colección y se lavó la membrana con 500 μ L de solución amortiguadora PB, seguido de la centrifugación del mismo por 1 min y se descartó el sobrenadante. Se hizo un segundo lavado con 750 μ L de la solución amortiguadora PE y se centrifugó por 1 min; se descartó el sobrenadante y se incrementó el paso de centrifugación a 2 min para eliminar los residuos del lavado. Se colocó la columna en un tubo de 1.5 mL estéril, con 30 μ L de agua grado biología molecular (GBM) (a 50°C) e incubó por 2 min, después se centrifugó para precipitar la muestra. Se cuantificó en NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) y se verificó su integridad por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (70 V, 45 min) con 50 a 100 ng de muestra.

Para la digestión con enzimas de restricción se agregaron 1 μ g del plásmido recombinante a un tubo de 0.6 mL y se mezcló con 2.5 μ L de solución amortiguadora CutSmart 10X (NEB, EU), 1 μ L de cada una de las enzimas de restricción (NEB, EU) y lo necesario de agua GBM estéril para un volumen final de 25 μ L. Se incubó a 37°C durante 1 h, seguido de una inactivación de 65°C por 5 min. Se verificó la correcta digestión en un gel preparativo de agarosa al 0.8% (se corrió a 60 V por 45 min con TAE 1X) y se visualizó en fotodocumentador (BIORAD, EU).

9.3. Expresión de proteínas recombinantes

En un matraz con 500 mL de medio LB/Amp₁₀₀ se inoculó con 15 mL de preinóculo de la cepa expresante (para cada biomarcador) y se incubó a 37°C con agitación a 260 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀=0.5; posteriormente se añadió el inductor IPTG (Sigma, EU) estéril para una concentración final de 1 mM, se incrementó la agitación a 300 rpm y se mantuvo la temperatura de 37°C, durante 4 a 6 h. Una vez finalizado el periodo de inducción se transfirió el cultivo a tubos estériles de 50 mL y se colocó en hielo. Se centrifugó en frío (4°C) a 10,000 rpm por 20 min para coleccionar la biomasa y se descartó el sobrenadante. Se conservó la pastilla en congelación (-20°C).

Para la lisis bacteriana se añadieron 5 mL de solución amortiguadora de unión (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol, pH 7.9) por cada gramo de biomasa. Se resuspendió y sonicó (Sonics, EU) a nivel 5, por 15 s, con 40 s de reposo, por 15 ciclos.

Una vez finalizado, se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 min; se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo de 50 mL nuevo y se hizo una segunda ronda de centrifugado para eliminar la mayor cantidad de residuos de biomasa. Se agregó coctel inhibidor de proteasas (Sigma, EU) a una concentración final del 0.1X y se mantuvo en congelación (-20°C) hasta su uso.

Por último, para cuantificar la proteína total se empleó una solución de 2 mg/mL de albúmina sérica bovina (Sigma, EU), de la cual se hicieron diluciones seriadas para una curva estándar (de 3 a 1,500 µg/mL). En una microplaca se colocaron 25 µL del blanco, los estándares y las muestras (todos por triplicado) y se agregaron 200 µL de la solución de trabajo del kit de micro BCA (BioVision, EU) (49 reactivo A:1 reactivo B). Se homogeneizó e incubó durante una hora a 37°C, por último, se llevó al lector de microplacas 680 XR (BioRad, EU) para tomar lectura a 595 nm.

9.4. Purificación por cromatografía de afinidad a metales no movilizados (IMAC)

Para la purificación se colocó 1 mL de resina HisPur™ Ni-NTA Resin (Thermo Fisher Scientific, EU) en una columna (BioRad, USA), se equilibró con 10 volúmenes de columna (vc) de la solución amortiguadora de unión y se incubó la resina con el sobrenadante obtenido de la lisis bacteriana (fracción soluble) en frío (4°C) con agitación suave durante toda la noche. Nuevamente se empaquetó la columna con la resina cargada (el sobrenadante fue considerado como no retenido) y se le pasaron 6 vc con la solución de lavado (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 60 mM Imidazol, pH 7.9), se colectó el flujo en un tubo de 15 mL; seguido se colocaron 10 vc de Tris-HCl 10 mM para remover residuos de sales de la columna. Para la remoción de endotoxinas se aplicaron 10 vc de Tris-HCl 10 mM con 0.5% de ASB-14, para eliminar residuos del detergente nuevamente se pasaron 10 vc de Tris-HCl 10 mM. Para recuperar la proteína recombinante purificada se colocó 1 mL de solución de elución (10 mM Tris-HCl, 1M Imidazol, pH 8), se incubó durante 5 min y se recuperó en un microtubo, este paso se repitió hasta obtener cinco fracciones de elución.

9.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se cargaron 20 µL de cada fracción recuperada de la purificación con 10 µL de solución amortiguadora desnaturante al 2X (Tris 62.5 mM pH 6.8, 25% glicerol, 0.01% azul

de bromofenol, 2% SDS, β -mercaptoetanol 5%) y se calentó a 95°C por 10 min. Se cargó la totalidad en un gel discontinuo de poliacridamida al 15% y se separaron las bandas mediante electroforesis a 120 V por 1 h con solución amortiguadora de corrida al 1X (Tris 250 mM, 1.92 M glicina, 1% SDS, pH 8.3), se tiñó con azul G brillante (Sigma, EU) en agitación suave durante 30 min y se destiñó con recambios de 30 min de agua bidestilada.

9.6. Diálisis

Las fracciones que presentaron en mayor proporción la proteína recombinante de interés, se colocaron en membrana de diálisis (SnakeSkin™ Dialysis Tubing, 10K MWCO, 22 mm) (Thermo Scientific, EU), sumergida en 1 L de PBS 1X (en agua MiliQ) y se mantuvo en incubación durante toda la noche en frío (4°C) con agitación suave. Se hicieron dos recambios adicionales de 2 h de incubación cada uno. Una vez finalizada la diálisis se recuperó el extracto concentrado y se colocó en microtubos; se cuantificó nuevamente para conocer el rendimiento final de expresión y el resto, se almacenó en congelación (-20°C) hasta su uso.

9.7. Western blot

Para evaluar la calidad final de purificación de las proteínas recombinantes, se verificó su tamaño y la presencia de posibles bandas accesorias mediante SDS-PAGE, para evidenciar la presencia de la etiqueta de histidinas, se efectuó un western blot para ello, se transfirió un gel de acrilamida al 15% (posterior a su electroforesis) a una membrana de nitrocelulosa Amersham™ Protran™ de 0.2 μ m (GE, EU) en cámara semiseca (BioRad, EU) con solución amortiguadora de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, 20% Metanol, pH 8.3) a 200 mA por 1.5 h. Se bloqueó la membrana con leche descremada al 5% en PBS 1X durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave, se descartó y se colocó la solución de anticuerpo anti-His (Cat. MAB050, R&D Systems, EU) a 0.2 μ g/mL con leche descremada al 3% en PBS 1X, se incubó durante toda la noche a 4°C. Nuevamente se descartó y se hicieron tres lavados con PBS 1X-Tween 20 al 0.05% (PBST) de 5 min. Se colocó una solución 1:1000 del anticuerpo secundario anti IgG de ratón acoplado a HRP (HAF018, R&D Systems, EU) en leche descremada al 3% en PBS 1X, se incubó durante 1 h a temperatura ambiente

con agitación suave. Se repitieron los lavados con PBST y se colocó la solución de revelado: elaborada a partir de la mezcla de la solución B (9.5 mL de PBS 1 X, 10 μ L H₂O₂) en la solución A (5 mg de sustrato HRP BioRad, 1.5 mL de metanol frío), se incubó en ausencia de luz durante 10 min y se detuvo la reacción con agua bidestilada para observar el marcaje de las bandas y documentar.

9.8. Estandarización de ELISA para la evaluación de la respuesta de anticuerpos a los antígenos de *Mtb*

9.8.1. Optimización de la concentración del antígeno

Para la optimización de la concentración del antígeno (proteína recombinante), a emplear en el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), se probaron diferentes cantidades de los mismos de manera individual, para ello se colocó por triplicado el antígeno diluido en PBS 1X para en un volumen de 50 μ L tener una cantidad total de 50, 100, 250, 500 ng y 1 μ g para sensibilizar la placa de 96 pocillos, se incubó durante 1 h a 37°C, posteriormente se descartó y se agregaron 150 μ L de BSA al 3% para bloquear seguido de una incubación de 1 h a 37°C, se descartó y se colocó la solución de anticuerpo anti-His (Cat. MAB050, R&D Systems, EU) a 0.2 μ g/ml diluido en BSA al 1% en PBS 1X y se incubó. Nuevamente se descartó y se hicieron tres lavados con 200 μ L de PBST con agitación de 600 rpm por 2 min. Se colocó la solución 1:1000 del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a HRP (HAF018, R&D Systems, EU) en BSA al 1% diluido en PBS 1X, se incubó durante 1 h a 37°C. Se lavó nuevamente con PBST y se colocaron 50 μ L de TMB (Thermo Fisher, EU), se incubó de 2 a 5 min para el desarrollo de color y se tomó lectura a 652 nm en lector de microplacas, se paró la reacción con 50 μ L de ácido sulfúrico 0.5 M y se midió nuevamente la densidad óptica a 450 nm. Para la determinación de la concentración a emplear de cada antígeno, se hizo un ANOVA de vía simple para determinar diferencia significativa ($p < 0.0001$) entre las medias a DO 450 nm y una prueba de Dunnett para comparar las medias individuales de absorbancia de cada concentración de antígeno respecto del control negativo y determinar su significancia estadística ($p < 0.0001$).

9.8.2. Titulación de sueros

Una vez conocida la cantidad de antígeno para sensibilizar la microplaca de ELISA, se hizo una prueba para determinar la dilución óptima de suero a emplear, así como el límite de detección (mínima cantidad de suero a emplear para una lectura certera) de la prueba. Se recubrió la placa con la concentración de antígeno optimizada (resultado de la prueba previa) se incubó durante 1 h a 37°C, se bloqueó con BSA al 3% e incubó nuevamente. Se colocaron 50 µL de suero diluido con PBS 1X (1:25, 1:50, 1:250, 1:500 y 1:1000) y se incubó. Se hicieron tres lavados con PBST y se agregaron 50 µL de la solución de anti-IgG (Cat. Ab97225, Abcam, EU) (1:1000) conjugado con HRP en PBS 1X y se incubó 1 h a 37°C, se lavó de nuevo con PBST y se agregaron 50 µL de TMB (Thermo Fisher, EU), se incubó de 2 a 5 min para el desarrollo de color y se tomó lectura a 652 nm en lector de microplacas, se paró la reacción con 50 µL de ácido sulfúrico 0.5 M y se midió nuevamente la densidad óptica a 450 nm. Se repitió aquella lectura que de alguno de los triplicados haya tenido una desviación estándar mayor al 10%. Para la determinación de la concentración a emplear de cada antígeno, se hizo un ANOVA de dos vías para comparar el efecto del estado (hemolizado y suero) y la dilución del suero ($p < 0.0001$), mediante una prueba de Tukey se evaluó la diferencia estadística de las medias individuales de absorbancia de cada concentración de antígeno ($p < 0.0001$).

9.8.3. Evaluación de la respuesta de anticuerpos

Una vez determinadas la cantidad de antígeno y la dilución de suero a emplear, se evaluó cada antígeno con todas las muestras séricas. A las condiciones de incubación, lavados y anticuerpo secundario ya ensayadas. Posteriormente se elaborará una curva de característica de funcionamiento del receptor (ROC) y se definió un punto de corte dependiendo el área bajo la curva, para determinar la sensibilidad y especificidad de cada antígeno, así como para determinar cuáles poseen mayor valor predictivo y prescindir de aquellos que impactan de manera negativa en la ELISA. En cuanto a los valores predictivos positivo y negativo (VPP y VPN) estos fueron calculados, tomando como base los resultados de la prueba QFT-GIT con la que fueron agrupados los sueros inicialmente. El resultado se analizó con un ANOVA para comparar las medias

individuales de absorbancia de cada dilución de suero y mediante una prueba de Tukey se determinó su significancia estadística.

10. RESULTADOS

10.1. Características clínicas de la población de estudio

De los 130 voluntarios incluidos en el estudio, el 60% de los sueros corresponden a mujeres, el 36% a hombres y un 4% no informó, con una edad media de 58 años (29-88 años). El 94% de la población diabética eran pacientes que habían sido diagnosticados con DM alrededor de 92 meses (0-660 meses) y tenían 51 años como edad media al momento del diagnóstico (10-87 años). Un 86% de los participantes con DM estaban bajo tratamiento hipoglucemiante (metformina y glibenclamida), de los cuales, hay una media de 15 pacientes que padecen complicaciones de DM como cataratas (6), glaucoma (2), enfermedad renal (2), retinopatía (1), pie diabético (2) y neuropatía (2). El 30% de la población presentaba hipertensión arterial. En cuanto a tuberculosis, sólo el 7% de los individuos padecía TB activa, clínicamente diagnosticada, baciloscopia positiva y QFT positivo (Cuadro 5).

Cuadro 5. Características clínicas el grupo de estudio.

Sexo		%
Masculino	45	(35)
Femenino	67	(51)
No informa	18	(14)
Edad	41 (19-88)	
<i>n</i>	130	
Diabetes		
Con diabetes	84	(65)
Sin diabetes	40	(31)
No informa	6	(4)
Tiempo con diagnóstico (meses)	92 (0-660)	
Edad del diagnóstico (años)	51 (10-87)	
Tratamiento		
Con tratamiento hipoglucemiante	101	(78)
Sin tratamiento hipoglucemiante	29	(22)
Complicaciones clínicas de diabetes		
Con complicaciones	15	(12)
Sin complicaciones	115	(88)
Otras enfermedades		
Con otras enfermedades	35	(27)
Sin otras enfermedades	95	(73)
Tuberculosis		
Con tuberculosis	9	(7)
Sin tuberculosis	118	(91)
Con tratamiento	3	(2)

10.2. Expresión y purificación de antígenos recombinantes

Para verificar la presencia del gen de interés en los plásmidos recombinantes, se hizo una digestión con las enzimas de restricción empleadas para la clonación del inserto en el plásmido pET15b; en el Cuadro 6 se muestran los tamaños esperados del vector y el inserto digeridos, así como las enzimas empleadas para su obtención. En los carriles 12, 15, 2A y 41 de la Figura 1 se cargaron 100 ng de plásmido sin digerir y en todos los casos se apreciaron tres bandas correspondientes a su forma superenrollada, relajada y lineal de longitud completa. Mientras que en los carriles M,

H, P y A se observaron dos bandas, la primera corresponde al plásmido digerido con un tamaño aproximado a 5.71 kb y la segunda al inserto: Mpt64~0.62 kb, HspX~0.43 kb, Ag38kDa~1.05 kb y Ag85A~0.89 kb respectivamente. Una vez demostrada la presencia de los genes de interés en las construcciones, se dio paso a la producción y purificación de la proteína recombinante que da lugar cada una éstas.

Cuadro 6. Productos de la digestión de los plásmidos recombinantes.

Plásmido recombinante	Enzimas de restricción	Tamaño plásmido digerido (kb)	Tamaño inserto (kb)	RV/Proteína de <i>Mtb</i> que codifica
pMRLB.12	<i>Nde</i> I, <i>Hind</i> III	5.71	0.62	Rv1980/Mpt64
pMRLB.15	<i>Nde</i> I, <i>Xho</i> I	5.71	0.43	Rv2031c/HspX
pMRLB.2A	<i>Nde</i> I, <i>Xho</i> I	5.70	1.05	Rv0934/Ag38kDa
pMRLB.41	<i>Nde</i> I, <i>Bam</i> HI	5.70	0.89	Rv3803c/Ag85A
pUC57	<i>esxA</i> , <i>esxB</i>	5.37	0.64	Rv3875-Rv3874/ ESAT6-CFP10

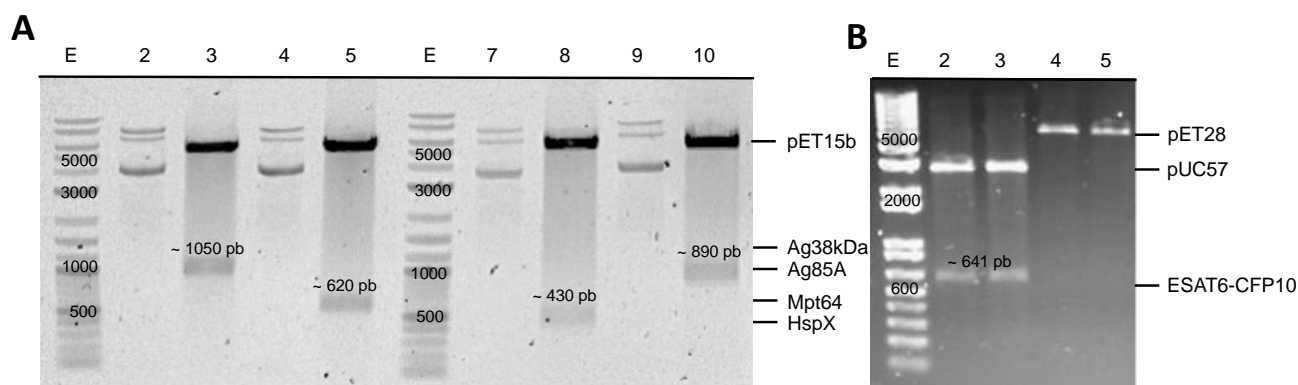


Figura 1. Digestión de plásmidos recombinantes. Tamaños de inserto obtenidos después de digerir con enzimas de restricción (Cuadro 1) por 1h a 37°C. A) Carriles E: marcador de peso molecular (NEB, Cat. B7025, USA), Carriles 2, 4, 7 y 9: 100 ng de plásmido recombinante pET15b sin digerir; Carriles 3, 5, 8 y 10: 1 µg de plásmido recombinante pET15b digerido. B) Carril E: marcador de peso molecular, Carriles 2 y 3: 1 µg de plásmido recombinante pUC57 digerido, Carriles 4 y 5: 100 ng de plásmido recombinante pET28 sin digerir.

Una vez efectuada una inducción de 500 mL de cultivo de cada construcción, se procedió a su purificación, siguiendo el proceso descrito anteriormente en el apartado de metodología. Observando una banda prominente correspondiente al tamaño esperado de cada biomarcador, tras su inducción (IPTG 1 mM) durante 4 h, se hizo la purificación de cada proteína recombinante en condiciones nativas, obteniendo en la mayoría de los casos una mayor concentración de proteína de interés en la elución dos (Figura 2), la cual posteriormente se sometió a diálisis para su concentración y hacer el recambio de solución de elución por PBS 1X.

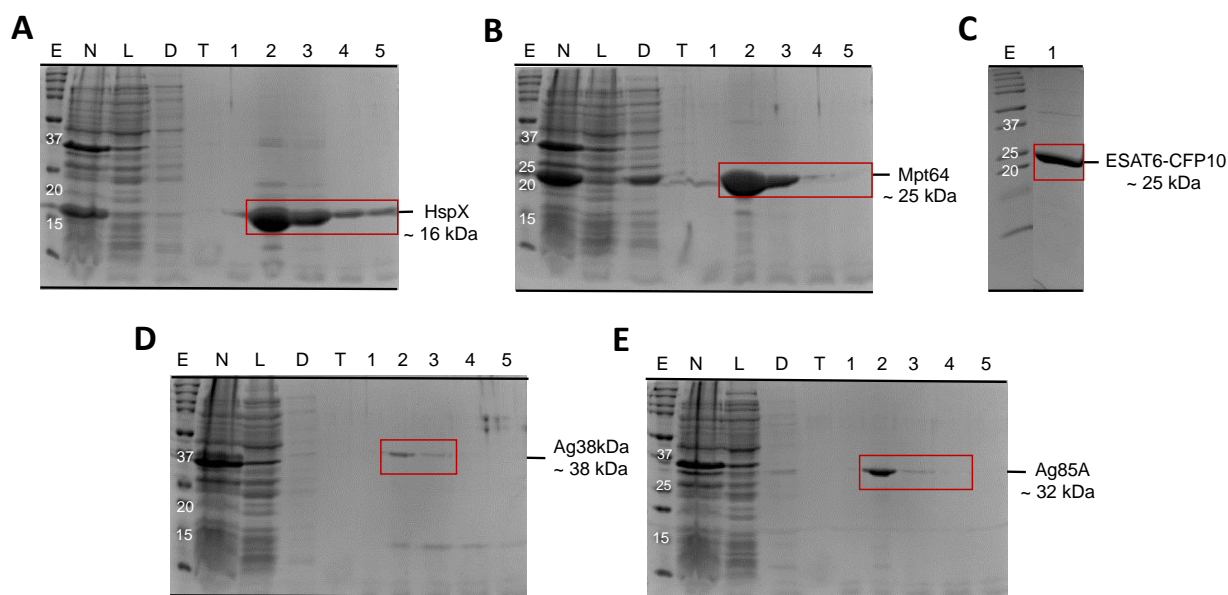


Figura 2. Análisis de la expresión y purificación de la fracción soluble de las proteínas recombinantes por SDS-PAGE. A) HspX, B) Mpt64, C) ESAT6-CFP10, D) Ag38kDa y E) Ag85A, E: marcador de peso molecular (BioRad), N: fracción no retenida, L: lavado con 50 mM imidazol, 1 a 5: fracciones recuperadas eluidas con 300 mM de imidazol. Condiciones de expresión empleadas: 1 mM IPTG, 37°C, 300 rpm, 4 h.

Una vez purificadas, cada una de las proteínas se evaluó en SDS-PAGE y western blot para verificar su integridad final y la posible presencia de bandas accesorias que pudieran influir en los ensayos posteriores. En ambos casos (Figura 3), se observó que la purificación fue exitosa y en el western blot se observa la presencia de la etiqueta

de histidinas en todos los casos excepto por el control negativo (BL21) que corresponde a cepa sin transformar. Posteriormente, se procedió a evaluar la concentración óptima a colocar de antígeno para sensibilizar la ELISA, para ello se probaron diferentes concentraciones de antígeno y a su vez, se evaluaron diferentes agentes de bloqueo para seleccionar aquel que diera menor señal de fondo y no interviniera con la interpretación de resultados.

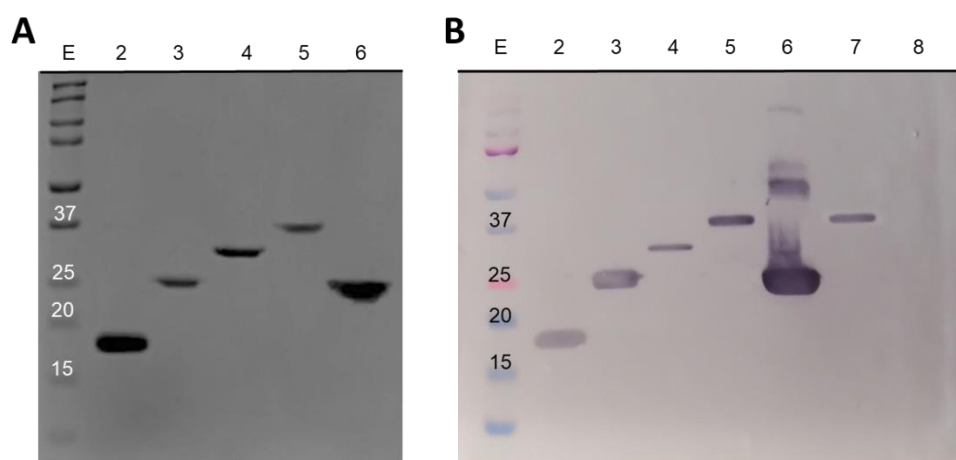


Figura 3. Proteínas recombinantes purificadas. A) SDS-PAGE E: marcador de peso molecular, 2: HspX (Rv2031c) 16 kDa, 3: Mpt64 (Rv1980) 25 kDa, 4: Ag85A (Rv3803c) 32 kDa, 5: Ag38kDa (Rv0934) 38 kDa y 6: ESAT6-CFP10 (Rv3875-Rv3874) 25 kDa, se cargaron 2 μ g de proteína purificada en cada pocillo. B) Western blot, 7: TVK proteína control positivo de 25 kDa, 8: 20 μ L de lisado bacteriano BL21 sin transformar.

10.3. Optimización de la concentración de antígeno

Se hizo un ensayo de ELISA para evaluar la cantidad de antígeno necesaria para sensibilizar la microplaca. Para ello se emplearon diferentes concentraciones de antígeno (50, 100, 250, 500 ng y 1 μ g) y se bloqueó con BSA y la detección se hizo con un anticuerpo anti-6His conjugado a HRP. Se emplearon 100 ng de una proteína recombinante purificada como control positivo. En la Figura 4, se muestra la detección del antígeno a distintas concentraciones, HspX mostró mayor absorbancia a 100 ng. Sin embargo, la concentración de 50 ng también fue efectiva y con significancia estadística ($p=0.0002$), se optó por usar la menor concentración en los ensayos

posteriores. Mpt64 resultó significativo ($p<0.0001$) con respecto al control negativo (sándwich sin suero) a una concentración de 50 y 100 ng; siendo 50 ng la que reportó mayor lectura de absorbancia. Para el caso de Ag38kDa la cantidad óptima para sensibilizar la microplaca resultó en 50 y 100 ng, ambas con significancia de $p<0.0001$ para este caso también se optó por emplear una concentración menor para sensibilizar la ELISA. Ag85A sólo resultó con significancia estadística ($p=0.0036$) respecto del control la cantidad de 250 ng; la fusión ESAT6-CFP10 resultó con significativa de $p<0.0001$ en cantidades de 250 y 500 ng, siendo 500 ng en la que se obtuvo mayor absorbancia.

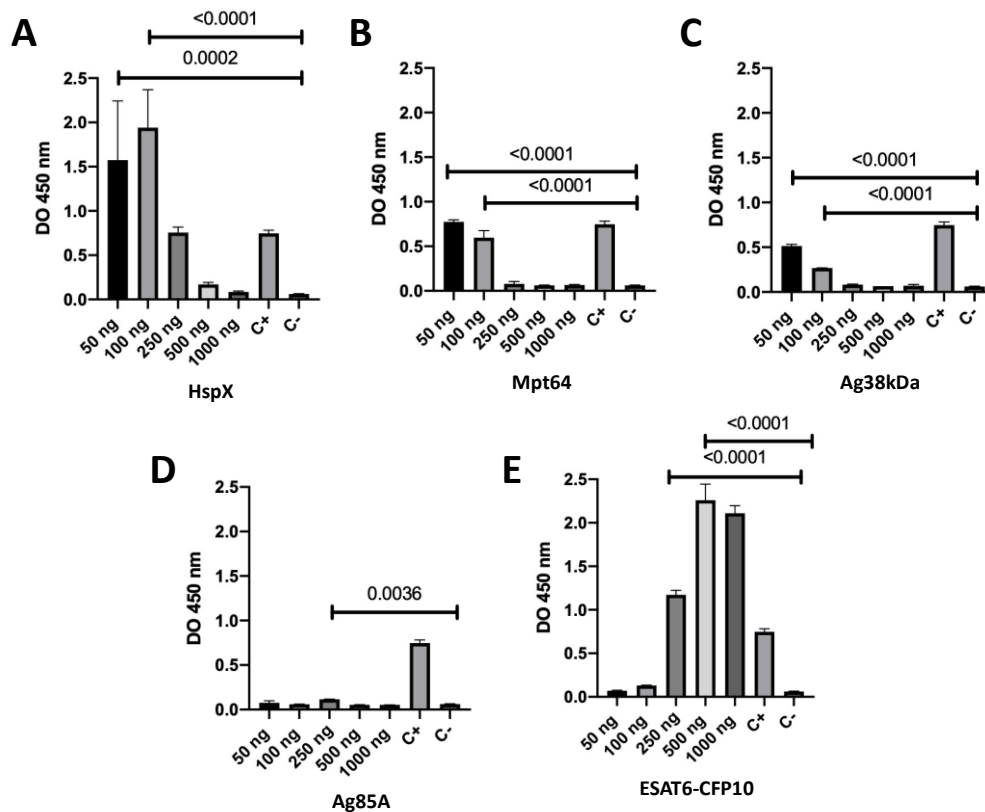


Figura 4. Optimización de la cantidad de antígeno empleada para sensibilizar microplaca. Cada barra corresponde a la media de tres réplicas de la absorbancia registrada a 450 nm de distintas cantidades de los antígenos A) HspX, B) Mpt64, C) Ag38kDa, D) Ag85A y ESAT6-CFP10, el control negativo corresponde al sandwich sin suero (C-) y el control positivo (C+) a 50 ng de proteína recombinante producida en *E. coli*. Significancia estadística determinada por prueba de Dunnett ($p<0.0001$).

10.4. Optimización del título de suero

Se hizo una curva de titulación de anticuerpos (Figura 5), de tres sueros negativos (PPD negativo), con el fin de definir una señal basal e identificar la mínima cantidad cuantificable de anticuerpos presentes en suero (límite de detección); para ello se fijaron 50 ng de HspX en pozo, se bloqueó con BSA y se colocó la dilución de suero correspondiente (1:25, 1:50, 1:250, 1:500 y 1:1000), por último, se colocó un anti-IgG conjugado con HRP. Tanto la dilución 1:25 como 1:50 de suero, resultaron significativas ($p < 0.0001$) respecto del resto y del control negativo (BSA 3%) sin embargo, como es indistinto entre sí (no significativo) emplear para el ensayo suero a la dilución 1:25 ó 1:50, se prefirió hacer los ensayos posteriores con el suero a 1:50 ya que una menor dilución en la muestra (por ejemplo la dilución 1:25) podría saturar el sistema de detección, puesto que se trata de suero total que contiene una gran diversidad de proteínas como albúmina humana, se buscó una concentración de suero que permita una detección efectiva sin saturar la microplaca y por ende obtener un resultado claro y conciso, que demuestre la relación antígeno e IgG anti-antígeno. Por lo que, el intervalo de detección de la ELISA se delimita entre 1:25 hasta 1:250 (siendo éste el límite de detección). No se declara un límite de cuantificación ya que la prueba es cualitativa. Este ensayo se practicó también con muestras de los mismos individuos, en condición de hemólisis (por congelación y descongelación de muestra de sangre total), para conocer de qué manera impacta dicho efecto en la detección; es decir, si afectaría la absorbancia detectada en un suero dado en la prueba ELISA. Posterior a una prueba de Tukey de comparaciones múltiples, entre las medias de cada dilución y el estado de la muestra, se obtuvo que la prueba es bastante robusta y el efecto de hemólisis en las muestras no resulta significativo ($p = 0.0036$) para el antígeno HspX a diferencia de la dilución de la muestra ($p < 0.0001$) (Figura 5).

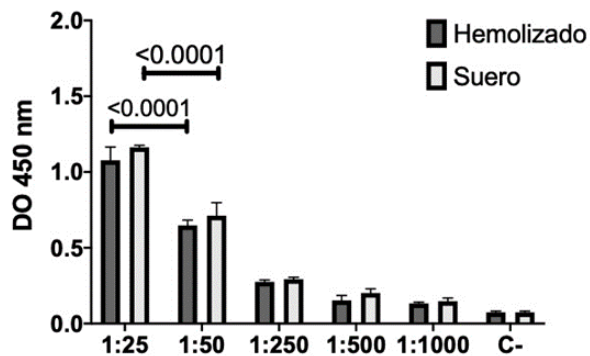


Figura 5. Titulación de anticuerpos IgG y evaluación del efecto de hemólisis. Cada barra representa la media tres muestras PPD- de suero o hemolizadas (de un mismo individuo) evaluadas por triplicado de manera individual. Significancia estadística del efecto de dilución y estado de la muestra determinada por prueba de Tukey ($p < 0.0001$).

Para validar si la dilución elegida de suero funcionaría de igual manera en un suero con mayor titulación de anticuerpos anti-HspX, se evaluó una muestra con TB (QFT+) así como una en comorbilidad con VIH (TB/VIH). El resultado obtenido muestra que el comportamiento de ambas muestras se mantiene, es decir, hay mayor titulación de anticuerpos anti-HspX a menor dilución del suero. Las muestras positivas (previamente caracterizadas) para TB presentaron mayor absorbancia que el control negativo (suero sano) (Figura 6).

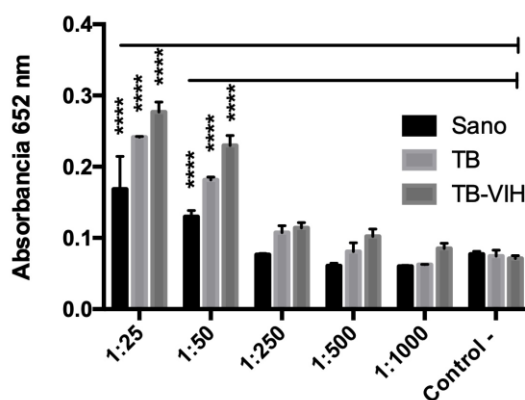


Figura 6. Validación de la dilución de suero. Titulación de anticuerpos anti IgG en suero sano (PPD-), suero TB (QFT+) y suero TB-VIH. Cada barra representa la media de tres réplicas, se comparó respecto del control negativo sin suero. Significancia estadística determinada por prueba de Dunnett ($p < 0.0001$).

10.5. Evaluación de los sueros en ELISA y curvas ROC

Una vez estandarizadas tanto la concentración de antígeno como la dilución de suero, se evaluaron las muestras de todos los grupos (sanos QFT-, sanos QFT+, TB, DM-TB QFT- y DM-TB QFT+) con cada uno de los antígenos HspX, Ag85A, Ag38kDa, Mpt64 y ESAT6-CFP10. Primeramente, se evaluó la distribución de los datos de las lecturas de absorbancia a 450 nm (promedio de tres réplicas) de cada muestra de suero, para cada antígeno. Se construyó un histograma donde se observó que, para todos los casos se cumplía con una distribución normal. Posteriormente, se optó por correr una prueba de Kolmogorov-Smirnov para cada grupo (exceptuando el grupo TBA por tamaño insuficiente para la prueba, $n=4$), la cual proporciona una medición de la divergencia (valor D) de la muestra problema, con respecto a la distribución normal y cuantifica la probabilidad de ello (valor p). Para un resultado favorable de normalidad se busca obtener un valor D bajo y un valor p alto. En el Cuadro 7, se muestran los resultados obtenidos. En algunos casos a pesar de que el valor de curtosis es negativo o mayor a 0 (indicador de no normalidad), cumplen con distribución normal, con distribución simétrica central o asimétrica positiva con la mayoría de los valores reunidos en la parte izquierda de la media.

Posteriormente, se graficaron curvas ROC con el valor de absorbancia de 450 nm de las muestras de todos los grupos (sanos QFT-, sanos QFT+, TB, DM-TB QFT- y DM-TB QFT+) con cada uno de los antígenos HspX, Ag85A, Ag38kDa, Mpt64 y ESAT6-CFP10, para evaluar el posible potencial biomarcador de cada uno de los antígenos recombinantes, estratificando los sueros por su estatus de DM. Para este propósito, se consideraron como pacientes infectados con *Mtb*, aquellos con TB clínicamente confirmada, así como aquellos con resultado positivo en la prueba de QFT y como posibles TB latentes al grupo sanos QFT+. Como grupo control se tomaron aquellos con un resultado negativo de QFT, incluyendo voluntarios con y sin DM (Figura 7 y 8).

Cuadro 7. Resultado de la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Grupo/Antígeno	HspX	Mpt64	Ag38kDa	Ag85A	ESAT6-CFP10
<i>Sanos QFT-</i>	36	36	36	36	36
Media (Abs 450 nm)	0.583	0.565	0.569	0.595	0.545
Desviación Estándar	0.371	0.328	0.397	0.361	0.374
Asimetría	1.241	1.559	1.600	1.080	1.199
Curtosis	1.386	2.959	2.375	0.839	1.182
Valor D	0.156	0.134	0.199	0.154	0.134
Valor <i>p</i>	0.306	0.421	0.099	0.324	0.489
<i>Sanos QFT+</i>	7	7	7	7	7
Media (Abs 450 nm)	0.853	0.790	0.684	0.801	0.674
Desviación Estándar	0.573	0.588	0.449	0.605	0.434
Asimetría	-0.042	0.163	0.811	0.185	0.453
Curtosis	-2.020	-2.364	0.327	-2.253	-0.503
Valor D	0.202	0.246	0.174	0.254	0.219
Valor <i>p</i>	0.886	0.704	0.957	0.666	0.822
<i>DM QFT+</i>	22	22	22	22	22
Media (Abs 450 nm)	0.710	0.566	0.632	0.668	0.629
Desviación Estándar	0.408	0.329	0.419	0.412	0.402
Asimetría	0.806	1.478	1.442	0.926	0.985
Curtosis	0.408	3.42	2.027	0.115	0.145
Valor D	0.148	0.190	0.183	0.192	0.188
Valor <i>p</i>	0.660	0.355	0.402	0.341	0.366
<i>DM QFT-</i>	61	61	61	61	61
Media (Abs 450 nm)	0.461	0.418	0.426	0.411	0.425
Desviación Estándar	0.305	0.263	0.259	0.248	0.290
Asimetría	1.544	1.096	1.729	1.078	1.532
Curtosis	2.571	0.823	4.123	0.867	2.447
Valor D	0.141	0.129	0.139	0.116	0.151
Valor <i>p</i>	0.159	0.234	0.170	0.350	0.110

Abs: absorbancia.

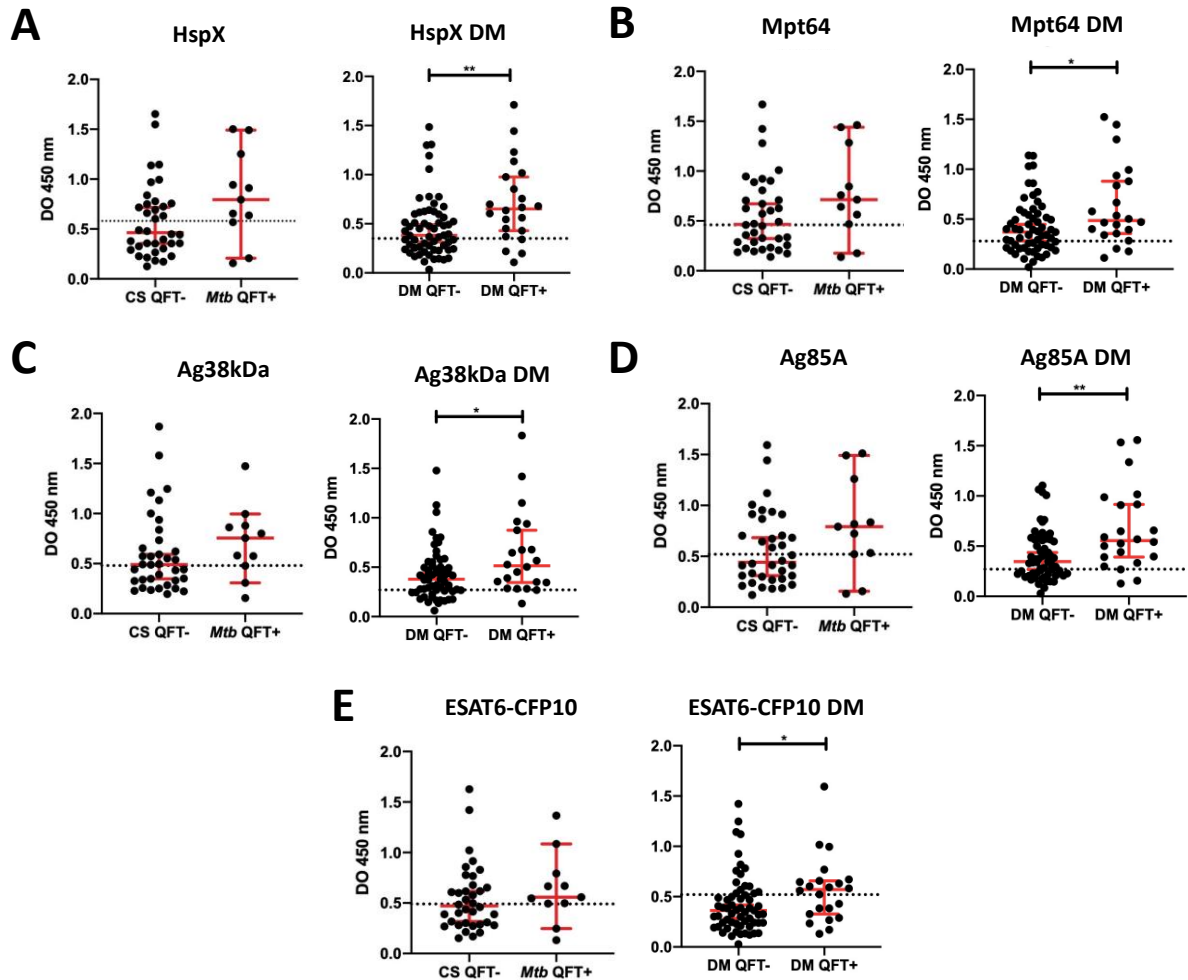


Figura 7. Comparación de la respuesta de anticuerpos IgG a cinco antígenos recombinantes de *Mtb*. TBA (TB QFT+) y voluntarios sanos (HC QFT-) (izq) y en presencia de diabetes (DM QFT+ y DM QFT-) (der). (A) HspX (Rv2031c), (B) Mpt64 (Rv1980c), (C) Ag38kDa (Rv0934), (D) Ag85A (Rv3803c), (E) ESAT6-CFP10 (Rv3875-3874). La línea roja horizontal indica el valor de la media de cada grupo, las líneas punteadas corresponden al valor de cutoff, derivado de la curva ROC. CS QFT- ($n=36$), *Mtb*, CS QFT+ ($n=11$), DM QFT- ($n=61$) y DM QFT+ ($n=22$). Significancia estadística determinada por prueba de Dunnett ($p<0.0001$).

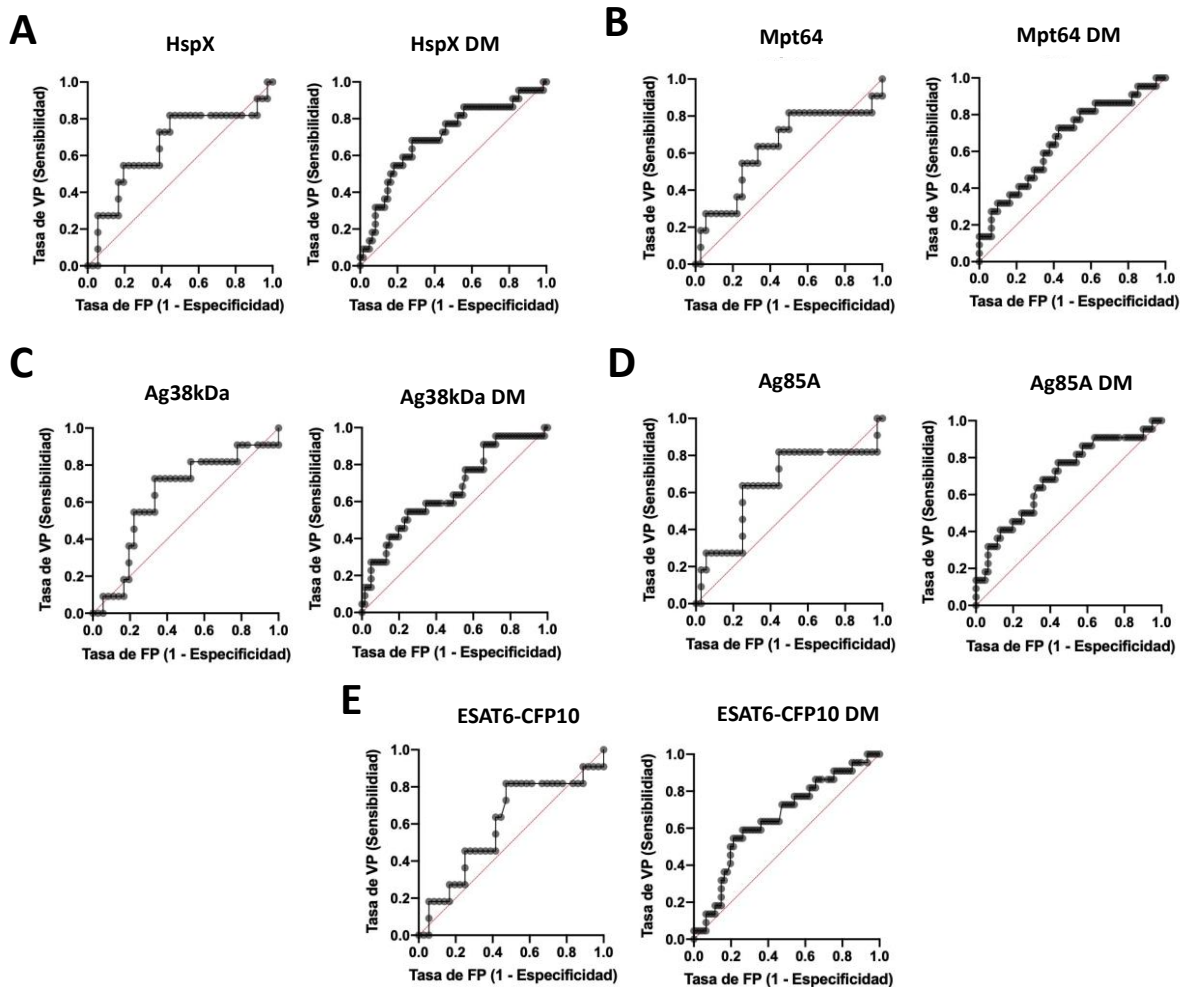


Figura 8. Análisis ROC de la respuesta de anticuerpos IgG a cinco antígenos recombinantes de *Mtb*. TBA (TB QFT+) y voluntarios sanos (HC QFT-) (izq) y en presencia de diabetes (DM QFT+ y DM QFT-) (der). Comparación de las curvas ROC para la detección específica de IgG anti (A) HspX (Rv2031c), (B) Mpt64 (Rv1980c), (C) Ag38kDa (Rv0934), (D) Ag85A (Rv3803c), (E) ESAT6-CFP10 (Rv3875-3874).

De acuerdo al comportamiento de los antígenos graficado en la Figura 8, todos los antígenos mostraron habilidad discriminativa para diagnóstico de una infección por *Mtb* tanto en presencia como en ausencia de DM (AUC 0.59-0.70) (Cuadro 8). Se definió como punto de corte (Cutoff), aquel punto con mayor cercanía a la esquina superior izquierda del plano cartesiano de la curva ROC, de igual manera por inspección, se buscó que fuese el punto de absorbancia con mayor porcentaje de sensibilidad, especificidad e índice de probabilidad (ó Índice de Youden), prueba estadística que informa del rendimiento de una prueba dicotómica.

Cuadro 8. Análisis de Curva ROC de la respuesta de anticuerpos IgG a los antígenos recombinantes de *Mtb* HspX (Rv2031c), Ag38kDa (Rv0934), Mpt64 (Rv1980c), ESAT6-CFP10 (Rv3875-Rv3874) y Ag85A (Rv3804c) en presencia o ausencia de DM.

Antígeno	Grupos	DE	AUC	95% IC	Valor p
HspX	QFT (-) vs QFT (+)	0.103	0.654	0.450-0.857	0.1254
HspX	DM QFT (-) vs DM QFT (+)	0.682	0.701	0.567-0.835	0.0053
Ag38kDa	QFT (-) vs QFT (+)	0.097	0.633	0.441-0.825	0.1830
Ag38kDa	DM QFT (-) vs DM QFT (+)	0.069	0.662	0.527-0.798	0.0242
Mpt64	QFT (-) vs QFT (+)	0.106	0.631	0.423-0.839	0.1914
Mpt64	DM QFT (-) vs DM QFT (+)	0.068	0.662	0.527-0.797	0.0245
ESAT6-CFP10	QFT (-) vs QFT (+)	0.101	0.597	0.398-0.796	0.3334
ESAT6-CFP10	DM QFT (-) vs DM QFT (+)	0.068	0.656	0.522-0.789	0.0307
Ag85A	QFT (-) vs QFT (+)	0.106	0.641	0.433-0.849	0.1594
Ag85A	DM QFT (-) vs DM QFT (+)	0.066	0.695	0.564-0.826	0.0069

DE: desviación estándar, AUC: área bajo la curva ROC, IC: intervalo de confianza, QFT: resultado de la prueba de Quantiferon, DM: diabetes mellitus.

Se observó que el punto de corte (cutoff) para el grupo DM QFT (+) (0.46 a 0.58) resultó mayor con respecto a la ausencia de DM (0.27 a 0.35), para todos los antígenos recombinantes (Cuadro 9). La sensibilidad se mantuvo en 81% para todos los biomarcadores a excepción de Ag38kDa (Rv0934), la cual resultó en 90%. De manera general, todos los antígenos resultaron con buen desempeño para la detección de casos verdaderos positivos a TB, como se observa en las curvas ROC. Respecto a la especificidad de cada biomarcador, se mantuvo en un intervalo de 47 a 56% en personas sin DM, mientras que, en presencia de DM, disminuyó en 29-44%.

Cuadro 9. Punto de corte derivado del análisis de curvas ROC de la respuesta de anticuerpos IgG a cinco antígenos recombinantes de *Mtb* en voluntarios con TB, controles sanos e individuos con DM.

Antígenos	Grupos	Punto de Corte (450 nm)	ESP %	SEN %	Valor YI	Índice de Probabilidad
HspX	QFT (-) vs QFT (+)	0.585	56	81	0.37	1.636
HspX	DM QFT (-) vs DM QFT (+)	0.353	44	81	0.25	1.468
Ag38kDa	QFT (-) vs QFT (+)	0.483	47	81	0.28	1.378
Ag38kDa	DM QFT (-) vs DM QFT (+)	0.272	29	90	0.80	1.290
Mpt64	QFT (-) vs QFT (+)	0.464	50	81	0.31	1.455
Mpt64	DM QFT (-) vs DM QFT (+)	0.288	37	81	0.18	1.313
ESAT6-CFP10	QFT (-) vs QFT (+)	0.490	52	81	0.33	1.733
ESAT6-CFP10	DM QFT (-) vs DM QFT (+)	0.287	37	81	0.18	1.313
Ag85A	QFT (-) vs QFT (+)	0.517	55	81	0.36	1.841
Ag85A	DM QFT (-) vs DM QFT (+)	0.272	37	86	0.23	1.512

QFT: Resultado de la prueba de Quantiferon, DM: diabetes mellitus, YI: Índice de Youden, SEN: sensibilidad, ESP: especificidad.

A partir de punto de corte definido para cada antígeno, se clasificaron las muestras dependiendo de su absorbancia a 450 nm obtenida, como positiva (absorbancia por arriba del punto de corte) o negativa (absorbancia por debajo del punto de corte). Con el resultado obtenido se hizo el conteo de los positivos y negativos, para hacer una tabla de contingencia y, respecto del resultado de la prueba de QFT (total de positivos y total de negativos, en ausencia y presencia de DM), recalcular las características de desempeño de cada antígeno (sensibilidad, especificidad, VPP y VPN) (Cuadro 10). El antígeno recombinante Ag38kDa presentó mayor valor de sensibilidad para voluntarios con infección con *Mtb* tanto en presencia como en ausencia de DM 55 (IC 95% 43-66) y 66% (IC 95% 57-73) , respectivamente; con respecto a su especificidad, el antígeno puede detectar el 47% (IC 95% 38-55) de verdaderos negativos en individuos sin DM y 40% (IC 95% 33-46) en pacientes con DM. En general, el parámetro de VPN (valor predictivo negativo) resultó cercano al 60% en todos los casos, lo cual indica la probabilidad de que un paciente sano obtenga un resultado positivo en una prueba tipo ELISA con los antígenos recombinantes. Respecto al valor predictivo positivo (VPP), todos los antígenos mostraron al menos un 40% de probabilidad de obtener un resultado positivo en pacientes verdaderamente enfermos, es decir, sólo 4 de cada 10 pacientes infectados por *Mtb* resultarán positivos.

Cuadro 10. Sensibilidad y especificidad de cinco antígenos de *Mtb* en una prueba tipo ELISA en presencia o ausencia de DM.

Antígeno	Grupos	% SEN (IC 95%)	% ESP (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)	IP
HspX	QFT (-) vs QFT (+)	50.7 (39-62)	49.5 (40-58)	0.36 (0.27-0.46)	0.63 (0.53-0.72)	1.006
HspX	DM QFT (-) vs DM QFT (+)	57.4 (48-65)	45.3 (38-52)	0.39 (0.32-0.46)	0.63 (0.55-0.70)	1.052
Ag38kDa	QFT (-) vs QFT (+)	55.0 (43-66)	47.0 (38-55)	0.37 (0.28-0.47)	0.64 (0.53-0.73)	1.040
Ag38kDa	DM QFT (-) vs DM QFT (+)	66.1 (57-73)	40.0 (33-46)	0.40 (0.34-0.47)	0.65 (0.56-0.73)	1.102
Mpt64	QFT (-) vs QFT (+)	56.5 (44-67)	46.2 (37-55)	0.37 (0.29-0.47)	0.64 (0.54-0.74)	1.051
Mpt64	DM QFT (-) vs DM QFT (+)	61.4 (52-69)	42.9 (36-49)	0.40 (0.33-0.47)	0.64 (0.55-0.71)	1.076
ESAT6- CFP10	QFT (-) vs QFT (+)	53.6 (41-64)	47.9 (39-56)	0.37 (0.28-0.47)	0.64 (0.53-0.63)	1.029
ESAT6- CFP10	DM QFT (-) vs DM QFT (+)	59.8 (51-67)	43.9 (37-50)	0.39 (0.33-0.46)	0.63 (0.55-0.71)	1.067
Ag85A	QFT (-) vs QFT (+)	52.1 (40-63)	48.7 (39-57)	0.37 (0.28-0.47)	0.63 (0.53-0.72)	1.081
Ag85A	DM QFT (-) vs DM QFT (+)	62.0 (53-70)	42.4 (35-49)	0.40 (0.33-0.47)	0.64 (0.56-0.72)	1.047

SEN: sensibilidad, ESP: especificidad, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo, IP: índice de probabilidad. Lo sueros fueron clasificados como positivo o negativo de acuerdo a su absorbancia a 450 nm, dependiendo del punto de corte para cada antígeno. Subsecuentemente se hizo un análisis por tabla de contingencia para la comparación entre ambas pruebas (QFT y ELISA), así como el cálculo final de las características de desempeño de cada antígeno.

11. DISCUSIÓN

En su más reciente reporte, la OMS menciona que la infección tuberculosa es curable mediante un tratamiento adecuado, siempre y cuando su detección sea oportuna, y continuamente se mejore su diagnóstico como medida de control de la enfermedad, sobre todo en zonas endémicas. Frente a dicho reto, la necesidad de identificación de moléculas indicadoras (biomarcadores) de una infección por *Mtb* así como la evaluación de sus características de desempeño en diferentes poblaciones y comorbilidades, es imprescindible para la mejora y desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas. Para la selección de los antígenos con potencial diagnóstico de TB se hizo un estudio retrospectivo, mediante el análisis de las características de desempeño (sensibilidad y especificidad) de éstos en diferentes plataformas inmunodiagnósticas como ELISA, NAPPA, Nano Disk-MS y HEMMA-EXPRES, en diferentes poblaciones del mundo (Cuadro 3). Una de las ventajas observadas de emplear dicha estrategia, fue acotar la búsqueda hacia antígenos que hayan reportado resultados favorables e incluso hayan sido probados en alguna comorbilidad (VIH/SIDA en la mayoría de los casos), lo cual funcionó como excelente punto de partida, dado que los antígenos seleccionados presentaron una sensibilidad y especificidad $\geq 60\%$ en más de una población ensayada. Mediante esta estrategia fue posible el empleo de un mínimo número de pacientes, así como la disminución del presupuesto empleado y el tiempo de análisis, a diferencia de otras tecnologías más generales, empleadas para la identificación de biomarcadores como NAPPA, la cual se centra en el análisis completo del proteoma de *Mtb*, sin embargo, es una técnica costosa y requiere equipo y personal especializado para su empleo.

Respecto al empleo de plásmido recombinantes para la expresión de los antígenos, se observó que éste representa una estrategia de bajo costo, con alta densidad de cultivo, es de fácil manipulación y purificación. Entre los parámetros más importantes de la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* se encuentran la eficiencia transcripcional y traduccional, así como la estabilidad del vector de expresión, lo cual la constituye como una fuente consistente para la obtención de moléculas biomarcadoras indicadoras de una infección por *Mtb*, ya que, una vez estandarizada su obtención desde la transformación de la cepa expresante con el plásmido

recombinante, hasta su purificación, se mantiene la cantidad y calidad de la proteína biomarcadora lote por lote, además de ser una fuente más costeable, a diferencia de las proteínas procedentes de casas comerciales.

Como se mencionó anteriormente, el presente trabajo fue dirigido a la evaluación de antígenos recombinantes como potenciales biomarcadores de TB en presencia y ausencia de DM, basados en la detección de anticuerpos anti-antígenos de *M. tuberculosis*. Cabe recalcar, que dicho efecto ha sido evaluado con anterioridad y diversos antígenos de *Mtb* han mostrado alta sensibilidad y especificidad ($\geq 80\%$), en otras poblaciones del mundo, donde el efecto de DM no había sido abordado (Cheng, Zhao et al. 2011, de Sousa, da Costa et al. 2012, Xu, Chen et al. 2012, Feng, Xiu et al. 2013). Se encontró que los niveles de IgG anti-HspX no presentaron diferencia significativa entre el grupo infectado (TB QFT+) y el control sano (QFT-), lo anterior se repite en cada antígeno en gran parte por la diferencia de la *n* de ambos grupos de estudio (Figura 7). HspX mostró una sensibilidad y especificidad del 50% en individuos sin DM mientras que, en presencia de diabetes, mostró una mejor sensibilidad (60%) y especificidad disminuida del 45% en pacientes con DM. Otros estudios han evaluado su potencial como indicador de TBL, en donde han reportado valores de sensibilidad y especificidad similares (Rabahi, Junqueira-Kipnis et al. 2007).

Por su parte, la proteína de fusión ESAT6-CFP10, se ha estudiado ampliamente en más de una población (Xu, Chen et al. 2012, Feng, Xiu et al. 2013, Manga, Perales et al. 2016, Liu, Zhao et al. 2017), como biomarcador de una infección activa por *Mtb*. Sin embargo, nuestros resultados no reportan significancia estadística entre los niveles de IgG del grupo infectado (TB QFT+) respecto del control (HC QFT-), en ausencia o presencia de DM. En otros estudios, se han encontrado altos niveles de IgG anti-ESAT6-CFP10 en individuos coinfectados con VIH/SIDA comparados con aquellos que solo presentaban TBA (Lagrange, Thangaraj et al. 2014). En cuanto a su uso como biomarcador de TBL, algunos hallazgos reportan que títulos de anticuerpos tanto en la fase de dormancia como en la fase activa de *Mtb*, son mayores en individuos recientemente identificados con TBL, lo cual los hace candidatos a terapia profiláctica (Maekura, Kitada et al. 2019).

En cuanto a la evaluación del antígeno Mpt64 para serodiagnóstico de TB, se han reportado niveles similares de anticuerpos tanto en el grupo control como en el infectado con TB (Feng, Xiu et al. 2013, Khurshid, Afzal et al. 2017), como en los resultados presentados en líneas anteriores. Sin embargo, hay evidencia que soporta su potencial diagnóstico, como en un estudio efectuado en China, donde mostró una sensibilidad del 86% (Yan, Di et al. 2018).

En conclusión, los antígenos recombinantes evaluados pueden discriminar entre infección con *Mtb* respecto de un control sano, en presencia de DM, con valores aceptables de sensibilidad (56-66%) y especificidad (40-45%), tomando el resultado de la prueba de QFT como referencia (Cuadro 10), lo cual no necesariamente refleja que todos los casos de prueba QFT (+) tengan infección activa o progresiva, ya que pudo haberse eliminado momentos después de provocar la memoria por linfocitos T. Sin embargo, en un estudio con mayor cantidad de voluntarios (pacientes con TB, $n=43$), se reportó evidencia que sugiere que la sensibilidad de las pruebas para TB tipo IGRAs (como Quantiferon), no se encuentran comprometidas por la presencia de DM en pacientes con TB, debido a lo anterior, sugieren que pueden ser adaptadas exitosamente para el diagnóstico de TB en comorbilidad con diabetes (Walsh et al., 2011). Por otro lado, se ha mostrado que el empleo de antígenos de manera individual, muestran menor probabilidad para identificar verdaderos negativos, por lo que se considera necesaria su evaluación en un formato de combinaciones, ya que en otros estudios han reportado que el uso de mezclas de antígenos mejora tanto sensibilidad como especificidad (Zhang, Song et al. 2015), lo cual los hace más precisos. Como se mencionó anteriormente, los valores predictivos evalúan el grado de eficacia de cada antígeno probado y son indicador de la probabilidad de obtener resultados válidos, al mostrar alta probabilidad de VPP, se sugiere el empleo de los antígenos probados como prueba de tamizaje de TB en combinación con estudios clínicos u algún otro tipo de prueba confirmatoria para identificar verdaderos positivos.

Se propone el empleo de los antígenos de manera separada en el prototipo final, ya que los biomarcadores han mostrado capacidad para identificar una posible infección por *Mtb* en el suero de un voluntario con y sin DM, lo que resulte de su lectura de

absorbancia puede asociarse a un estado de infección distintivo (latente o activa), dado que los antígenos empleados en éste trabajo, son indicadores de diferentes etapas de infección por *Mtb* y de esta manera, presentar un panorama más esclarecido en el caso de que el individuo mantenga la infección en estado de dormancia, para su control y tratamiento adecuado sobre todo en el caso de personas inmunocomprometidas con DM.

12. CONCLUSIONES

Se mostró que la estrategia para la identificación de biomarcadores mediante un estudio retrospectivo, presenta ventajas como la reducción del tiempo de la primera fase de la investigación. La obtención de las proteínas biomarcadoras por plásmidos recombinantes resultó en una fuente consistente de las mismas una vez lograda la estandarización para su expresión y purificación. Los antígenos mostraron entre 50-56% de sensibilidad y 50% de especificidad para la detección de infección por *Mtb*, en individuos no diabéticos. Mientras que, en presencia de diabetes, la sensibilidad y especificidad se reportaron intervalos de 57 a 66% y 40 a 45% respectivamente, tomando como 100% el resultado de QFT. El antígeno recombinante Ag38kDa (Rv0934) en presencia de DM reportó 40% y 66% de especificidad y sensibilidad respectivamente, éste último, cumplió con el requerimiento mínimo de sensibilidad aceptable de la OMS para la detección de infección por *Mtb*, (>65%) en base a casos confirmados por baciloscopia.

13. PERSPECTIVAS

Se recomienda una segunda etapa de validación con una *n* total de voluntarios mayor a la empleada en la presente investigación, con un alto porcentaje de voluntarios de tuberculosos clínicamente confirmados, preferentemente previo a iniciar tratamiento. Así como también, la evaluación de los antígenos recombinantes en combinaciones de tres, dos y cinco a manera de evaluar si se incrementa la señal de absorbancia como resultado de la ELISA, sobre todo en los grupos con DM. El traslado del formato ELISA a un formato de tira de flujo lateral.

14. BIBLIOGRAFÍA

Aceti, A., S. Zanetti, M. S. Mura, L. A. Sechi, F. Turrini, F. Saba, S. Babudieri, F. Mannu and G. Fadda (1999). "Identification of HIV patients with active pulmonary tuberculosis using urine based polymerase chain reaction assay." *Thorax* 54(2): 145-146.

Alisjahbana, B., E. Sahiratmadja, E. J. Nelwan, A. M. Purwa, Y. Ahmad, T. H. Ottenhoff, R. H. Nelwan, I. Parwati, J. W. van der Meer and R. van Crevel (2007). "The effect of type 2 diabetes mellitus on the presentation and treatment response of pulmonary tuberculosis." *Clin Infect Dis* 45(4): 428-435.

Araujo, Z., N. Macias-Segura, J. E. Lopez-Ramos, J. H. De Waard, M. Vanegas, M. A. Patarroyo, A. Salgado and J. A. Enciso-Moreno (2018). "Diagnostic accuracy of combinations of serological biomarkers for identifying clinical tuberculosis." *J Infect Dev Ctries* 12(6): 429-441.

Baghaei, P., M. Marjani, P. Javanmard, P. Tabarsi and M. R. Masjedi (2013). "Diabetes mellitus and tuberculosis facts and controversies." *J Diabetes Metab Disord* 12(1): 58.

Baker, M. A., A. D. Harries, C. Y. Jeon, J. E. Hart, A. Kapur, K. Lonroth, S. E. Ottmani, S. D. Goonesekera and M. B. Murray (2011). "The impact of diabetes on tuberculosis treatment outcomes: a systematic review." *BMC Med* 9: 81.

Barron, M. M., K. M. Shaw, K. M. Bullard, M. K. Ali and M. J. Magee (2018). "Diabetes is associated with increased prevalence of latent tuberculosis infection: Findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2011-2012." *Diabetes Res Clin Pract* 139: 366-379.

Bartalesi, F., M. Spinicci, J. Mencarini, S. Veloci, A. Mantella and A. Bartoloni (2017). "The role of Quantiferon-TB Gold in-Tube in the diagnosis and treatment monitoring of active tuberculosis." *Infect Dis (Lond)* 49(6): 474-477.

Bates, M. and A. Zumla (2016). "The development, evaluation and performance of molecular diagnostics for detection of *Mycobacterium tuberculosis*." *Expert Rev Mol Diagn* 16(3): 307-322.

Baumann, R., S. Kaempfer, N. N. Chegou, W. Oehlmann, R. Spallek, A. G. Loxton, P. D. van Helden, G. F. Black, M. Singh and G. Walzl (2015). "A Subgroup of Latently *Mycobacterium tuberculosis* Infected Individuals Is Characterized by Consistently Elevated IgA Responses to Several Mycobacterial Antigens." *Mediators Inflamm* 2015: 364758.

Berry, M. P., C. M. Graham, F. W. McNab, Z. Xu, S. A. Bloch, T. Oni, K. A. Wilkinson, R. Banchereau, J. Skinner, R. J. Wilkinson, C. Quinn, D. Blankenship, R. Dhawan, J. J. Cush, A. Mejias, O. Ramilo, O. M. Kon, V. Pascual, J. Banchereau, D. Chaussabel and A. O'Garra (2010). "An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis." *Nature* 466(7309): 973-977.

Bhalla, A. S., A. Goyal, R. Guleria and A. K. Gupta (2015). "Chest tuberculosis: Radiological review and imaging recommendations." *Indian J Radiol Imaging* 25(3): 213-225.

Bloom, C. I., C. M. Graham, M. P. Berry, F. Rozakeas, P. S. Redford, Y. Wang, Z. Xu, K. A. Wilkinson, R. J. Wilkinson, Y. Kendrick, G. Devouassoux, T. Ferry, M. Miyara, D. Bouvry, D. Valeyre, G. Gorochoy, D. Blankenship, M. Saadatian, P. Vanhems, H. Beynon, R. Vancheeswaran, M. Wickremasinghe, D. Chaussabel, J. Banchereau, V. Pascual, L. P. Ho, M. Lipman and A. O'Garra (2013). "Transcriptional blood signatures distinguish pulmonary tuberculosis, pulmonary sarcoidosis, pneumonias and lung cancers." *PLoS One* 8(8): e70630.

Boehme, C. C., P. Nabeta, G. Henostroza, R. Raqib, Z. Rahim, M. Gerhardt, E. Sanga, M. Hoelscher, T. Notomi, T. Hase and M. D. Perkins (2007). "Operational feasibility of using loop-mediated isothermal

amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries." *J Clin Microbiol* 45(6): 1936-1940.

Broger, T., R. Basu Roy, A. Filomena, C. H. Greef, S. Rimmel, J. Havumaki, D. Danks, N. Schneiderhan-Marra, C. M. Gray, M. Singh, I. Rosenkrands, P. Andersen, G. M. Husar, T. O. Joos, M. L. Gennaro, M. J. Lochhead, C. M. Denking and M. D. Perkins (2017). "Diagnostic Performance of Tuberculosis-Specific IgG Antibody Profiles in Patients with Presumptive Tuberculosis from Two Continents." *Clin Infect Dis* 64(7): 947-955.

Cannas, A., D. Goletti, E. Girardi, T. Chiacchio, L. Calvo, G. Cuzzi, M. Piacentini, H. Melkonyan, S. R. Umansky, F. N. Lauria, G. Ippolito and L. D. Tomei (2008). "Mycobacterium tuberculosis DNA detection in soluble fraction of urine from pulmonary tuberculosis patients." *Int J Tuberc Lung Dis* 12(2): 146-151.

Cao, S. H., Y. Q. Chen, Y. Sun, Y. Liu, S. H. Zheng, Z. G. Zhang and C. Y. Li (2018). "Screening of Serum Biomarkers for Distinguishing between Latent and Active Tuberculosis Using Proteome Microarray." *Biomed Environ Sci* 31(7): 515-526.

CDC (2009). Updated Guidelines for the Use of Nucleic Acid Amplification Tests in the Diagnosis of Tuberculosis (Reprinted from *MMWR*, vol 58, pg 7-10, 2009). *Jama-J Am Med Assoc.* 301, 1014-1016

Chan, C. E., S. Gotze, G. T. Seah, P. H. Seeberger, N. Tukvadze, M. R. Wenk, B. J. Hanson and P. A. MacAry (2015). "The diagnostic targeting of a carbohydrate virulence factor from M.Tuberculosis." *Sci Rep* 5: 10281.

Cheng, Z., J. W. Zhao, Z. Q. Sun, Y. Z. Song, Q. W. Sun, X. Y. Zhang, X. L. Zhang, H. H. Wang, X. K. Guo, Y. F. Liu and S. L. Zhang (2011). "Evaluation of a novel fusion protein antigen for rapid serodiagnosis of tuberculosis." *J Clin Lab Anal* 25(5): 344-349.

Chiliza, T. E., M. Pillay, K. Naidoo and B. Pillay (2019). "Immunoscreening of the M. tuberculosis F15/LAM4/KZN secretome library against TB patients' sera identifies unique active- and latent-TB specific biomarkers." *Tuberculosis (Edinb)* 115: 161-170.

Choi, J. C., L. G. Jarlsberg, J. A. Grinsdale, D. H. Osmond, J. Higashi, P. C. Hopewell and M. Kato-Maeda (2015). "Reduced sensitivity of the QuantiFERON((R)) test in diabetic patients with smear-negative tuberculosis." *Int J Tuberc Lung Dis* 19(5): 582-588.

da Cruz, H. L., R. de Albuquerque Montenegro, J. F. de Araujo Lima, D. da Rocha Poroca, J. F. da Costa Lima, L. Maria Lapa Montenegro, S. Crovella and H. Charifker Schindler (2011). "Evaluation of a nested-PCR for mycobacterium tuberculosis detection in blood and urine samples." *Braz J Microbiol* 42(1): 321-329.

de Sousa, E. M., A. C. da Costa, M. M. Trentini, J. A. de Araujo Filho, A. Kipnis and A. P. Junqueira-Kipnis (2012). "Immunogenicity of a fusion protein containing immunodominant epitopes of Ag85C, MPT51, and HspX from Mycobacterium tuberculosis in mice and active TB infection." *PLoS One* 7(10): e47781.

Deng, J., L. Bi, L. Zhou, S. J. Guo, J. Fleming, H. W. Jiang, Y. Zhou, J. Gu, Q. Zhong, Z. X. Wang, Z. Liu, R. P. Deng, J. Gao, T. Chen, W. Li, J. F. Wang, X. Wang, H. Li, F. Ge, G. Zhu, H. N. Zhang, J. Gu, F. L. Wu, Z. Zhang, D. Wang, H. Hang, Y. Li, L. Cheng, X. He, S. C. Tao and X. E. Zhang (2014). "Mycobacterium tuberculosis proteome microarray for global studies of protein function and immunogenicity." *Cell Rep* 9(6): 2317-2329.

Diel, R., D. Goletti, G. Ferrara, G. Bothamley, D. Cirillo, B. Kampmann, C. Lange, M. Losi, R. Markova, G. B. Migliori, A. Nienhaus, M. Ruhwald, D. Wagner, J. P. Zellweger, E. Huitric, A. Sandgren and D.

- Manissero (2011). "Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis." *Eur Respir J* 37(1): 88-99.
- Diel, R., R. Loddenkemper, K. Meywald-Walter, S. Niemann and A. Nienhaus (2008). "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* 177(10): 1164-1170.
- Diel, R., R. Loddenkemper, S. Niemann, K. Meywald-Walter and A. Nienhaus (2011). "Negative and positive predictive value of a whole-blood interferon-gamma release assay for developing active tuberculosis: an update." *Am J Respir Crit Care Med* 183(1): 88-95.
- Diel, R., R. Loddenkemper and A. Nienhaus (2012). "Predictive value of interferon-gamma release assays and tuberculin skin testing for progression from latent TB infection to disease state: a meta-analysis." *Chest* 142(1): 63-75.
- Diel, R., R. Loddenkemper, J. P. Zellweger, G. Sotgiu, L. D'Ambrosio, R. Centis, M. J. van der Werf, M. Dara, A. Detjen, P. Gondrie, L. Reichman, F. Blasi, G. B. Migliori and T. B. I. European Forum for (2013). "Old ideas to innovate tuberculosis control: preventive treatment to achieve elimination." *Eur Respir J* 42(3): 785-801.
- DiNardo, A. R., A. W. Kay, G. Maphalala, N. M. Harris, C. Fung, G. Mtetwa, P. Ustero, S. Dlamini, N. Ha, E. A. Graviss, R. Mejia and A. M. Mandalakas (2018). "Diagnostic and Treatment Monitoring Potential of A Stool-Based Quantitative Polymerase Chain Reaction Assay for Pulmonary Tuberculosis." *Am J Trop Med Hyg* 99(2): 310-316.
- Dooley, K. E. and R. E. Chaisson (2009). "Tuberculosis and diabetes mellitus: convergence of two epidemics." *Lancet Infect Dis* 9(12): 737-746.
- Dupnik, K. M., J. M. Bean, M. H. Lee, M. A. Jean Juste, L. Skrabanek, V. Rivera, C. K. Vorkas, J. W. Pape, D. W. Fitzgerald and M. Glickman (2018). "Blood transcriptomic markers of Mycobacterium tuberculosis load in sputum." *Int J Tuberc Lung Dis* 22(8): 950-958.
- E. Martínez Alfaro; F. Mateos Rodríguez; J.J. Blanch Sancho; A. Salinas Botrán; M. García Sánchez (2010). *Tuberculosis extrapulmonar. Formas clínicas.* , 10(56), 0–3829. doi:10.1016/s0304-5412(10)70120-7
- Faurholt-Jepsen, D., M. G. Aabye, A. V. Jensen, N. Range, G. Praygod, K. Jeremiah, J. Changalucha, M. Faurholt-Jepsen, L. Jensen, S. M. Jensen, H. Krarup, P. Ravn, H. Friis and A. B. Andersen (2014). "Diabetes is associated with lower tuberculosis antigen-specific interferon gamma release in Tanzanian tuberculosis patients and non-tuberculosis controls." *Scand J Infect Dis* 46(5): 384-391.
- Feng, X., B. Xiu, K. Chen, X. Yang, H. Zhang, J. Yue, Y. Tan, H. Li, R. A. Nicholson, A. W. Tam, P. Zhao, L. Zhang, J. Liu, X. Song, G. Wang and H. Zhang (2013). "Enhanced serodiagnostic utility of novel Mycobacterium tuberculosis polyproteins." *J Infect* 66(4): 366-375.
- Flores-Valdez, M. A. (2017). "Uncovering the hidden: complexity and strategies for diagnosing latent tuberculosis." *Microb Cell* 4(11): 365-367.
- Fu, Y., W. Li, Z. Wu, Y. Tao, X. Wang, J. Wei, P. Jiang, J. Wu, Z. Zhang, W. Zhang, J. Zhao and F. Zhang (2018). "Detection of mycobacterial small RNA in the bacterial culture supernatant and plasma of patients with active tuberculosis." *Biochem Biophys Res Commun* 503(2): 490-494.
- Furin, J., H. Cox and M. Pai (2019). "Tuberculosis." *Lancet* 393(10181): 1642-1656.

Fwoloshi, S., L. M. Hachaambwa, K. O. Chiyenu, L. Chirwa, T. W. Hoffman, O. Ngalamika and S. L. Bailey (2018). "Screening for Diabetes Mellitus among Tuberculosis Patients: Findings from a Study at a Tertiary Hospital in Lusaka, Zambia." *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2018: 3524926.

Goletti, D., M. R. Lee, J. Y. Wang, N. Walter and T. H. M. Ottenhoff (2018). "Update on tuberculosis biomarkers: From correlates of risk, to correlates of active disease and of cure from disease." *Respirology* 23(5): 455-466.

Gomez, D. I., M. Twahirwa, L. S. Schlesinger and B. I. Restrepo (2013). "Reduced Mycobacterium tuberculosis association with monocytes from diabetes patients that have poor glucose control." *Tuberculosis (Edinb)* 93(2): 192-197.

Gutierrez-Ortega, A., D. A. Moreno, S. A. Ferrari, H. Espinosa-Andrews, E. P. Ortiz, F. Milián-Suazo and A. H. Alvarez (2021). "High-yield production of major T-cell ESAT6-CFP10 fusion antigen of *M. tuberculosis* complex employing codon-optimized synthetic gene." *Int J Biol Macromol* 171: 82-88.

Haas, C. T., J. K. Roe, G. Pollara, M. Mehta and M. Noursadeghi (2016). "Diagnostic 'omics' for active tuberculosis." *BMC Med* 14: 37.

Hajian-Tilaki, K. (2013). "Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation." *Caspian J Intern Med* 4(2): 627-635.

Hamasur, B., J. Bruchfeld, P. van Helden, G. Kallenius and S. Svenson (2015). "A sensitive urinary lipoarabinomannan test for tuberculosis." *PLoS One* 10(4): e0123457.

Hashemian, S. M., P. Tabarsi, M. B. Karam, S. Kahkouee, M. Marjani, H. Jamaati, N. Shekarchi, S. A. Mohajerani and A. A. Velayati (2015). "Radiologic manifestations of pulmonary tuberculosis in patients of intensive care units." *Int J Mycobacteriol* 4(3): 233-238.

Hodgson, K., J. Morris, T. Bridson, B. Govan, C. Rush and N. Ketheesan (2015). "Immunological mechanisms contributing to the double burden of diabetes and intracellular bacterial infections." *Immunology* 144(2): 171-185.

Huang, J., J. Jiao, W. Xu, H. Zhao, C. Zhang, Y. Shi and Z. Xiao (2015). "MiR-155 is upregulated in patients with active tuberculosis and inhibits apoptosis of monocytes by targeting FOXO3." *Mol Med Rep* 12(5): 7102-7108.

IMSS (2019). Consultado el 19 de enero de 2020 en <http://datos.imss.gob.mx/dataset/informacion-en-salud/resource/ba0272a3-33a9-4333-938d-442a520efbaf>

InDRE (2016). Consultado el 20 de enero de 2020 en https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/66202/Lineamientos_para_vigilancia_por_laboratorio_de_tuberculosis.pdf

Jeon, C. Y. and M. B. Murray (2008). "Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: a systematic review of 13 observational studies." *PLoS Med* 5(7): e152.

Jimenez-Corona, M. E., L. P. Cruz-Hervet, L. Garcia-Garcia, L. Ferreyra-Reyes, G. Delgado-Sanchez, M. Bobadilla-Del-Valle, S. Canizales-Quintero, E. Ferreira-Guerrero, R. Baez-Saldana, N. Tellez-Vazquez, R. Montero-Campos, N. Mongua-Rodriguez, R. A. Martinez-Gamboa, J. Sifuentes-Osornio and A. Ponce-de-Leon (2013). "Association of diabetes and tuberculosis: impact on treatment and post-treatment outcomes." *Thorax* 68(3): 214-220.

Joosten, S. A., H. A. Fletcher and T. H. Ottenhoff (2013). "A helicopter perspective on TB biomarkers: pathway and process based analysis of gene expression data provides new insight into TB pathogenesis." *PLoS One* 8(9): e73230.

Khurshid, S., M. Afzal, R. Khalid, M. W. Akhtar and M. H. Qazi (2017). "Potential of multi-component antigens for tuberculosis diagnosis." *Biologicals* 48: 109-113.

Kumar Nathella, P. and S. Babu (2017). "Influence of diabetes mellitus on immunity to human tuberculosis." *Immunology* 152(1): 13-24.

Kunnath-Velayudhan, S., H. Salamon, H. Y. Wang, A. L. Davidow, D. M. Molina, V. T. Huynh, D. M. Cirillo, G. Michel, E. A. Talbot, M. D. Perkins, P. L. Felgner, X. Liang and M. L. Gennaro (2010). "Dynamic antibody responses to the Mycobacterium tuberculosis proteome." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(33): 14703-14708.

Lagrange, P. H., S. K. Thangaraj, R. Dayal, A. Deshpande, N. K. Ganguly, E. Girardi, B. Joshi, K. Katoch, V. M. Katoch, M. Kumar, V. Lakshmi, M. Leportier, C. Longuet, S. V. Malladi, D. Mukerjee, D. Nair, A. Raja, B. Raman, C. Rodrigues, P. Sharma, A. Singh, S. Singh, A. Sodha, B. S. Kabeer, G. Vernet and D. Goletti (2014). "A toolbox for tuberculosis (TB) diagnosis: an Indian multi-centric study (2006-2008); evaluation of serological assays based on PGL-Tb1 and ESAT-6/CFP10 antigens for TB diagnosis." *PLoS One* 9(5): e96367.

Lardizabal, A. A. and L. B. Reichman (2017). "Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection." *Microbiol Spectr* 5(1).

Lawn, S. D., A. D. Kerkhoff, R. Burton, C. Schutz, G. van Wyk, M. Vogt, P. Pahlana, M. P. Nicol and G. Meintjes (2015). "Rapid microbiological screening for tuberculosis in HIV-positive patients on the first day of acute hospital admission by systematic testing of urine samples using Xpert MTB/RIF: a prospective cohort in South Africa." *BMC Med* 13: 192.

Ling, D. I., L. L. Flores, L. W. Riley and M. Pai (2008). "Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: meta-analysis and meta-regression." *PLoS One* 3(2): e1536.

Liu, C., Z. Zhao, J. Fan, C. J. Lyon, H. J. Wu, D. Nedelkov, A. M. Zelazny, K. N. Olivier, L. H. Cazares, S. M. Holland, E. A. Graviss and Y. Hu (2017). "Quantification of circulating Mycobacterium tuberculosis antigen peptides allows rapid diagnosis of active disease and treatment monitoring." *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(15): 3969-3974.

Lyon, S. M. and M. D. Rossman (2017). "Pulmonary Tuberculosis." *Microbiol Spectr* 5(1).

Maekura, R., S. Kitada, M. Osada-Oka, Y. Tateishi, Y. Ozeki, T. Fujicawa, M. Miki, O. Jyunko, M. Mori and S. Matsumoto (2019). "Serum antibody profiles in individuals with latent Mycobacterium tuberculosis infection." *Microbiol Immunol* 63(3-4): 130-138.

Maertzdorf, J., J. Weiner, 3rd and S. H. Kaufmann (2012). "Enabling biomarkers for tuberculosis control." *Int J Tuberc Lung Dis* 16(9): 1140-1148.

Maertzdorf, J., J. Weiner, 3rd, H. J. Mollenkopf, T. B. Network, T. Bauer, A. Prasse, J. Muller-Quernheim and S. H. Kaufmann (2012). "Common patterns and disease-related signatures in tuberculosis and sarcoidosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(20): 7853-7858.

Manga, S., R. Perales, M. Reano, L. D'Ambrosio, G. B. Migliori and M. Amicosante (2016). "Performance of a lateral flow immunochromatography test for the rapid diagnosis of active tuberculosis in a large multicentre study in areas with different clinical settings and tuberculosis exposure levels." *J Thorac Dis* 8(11): 3307-3313.

- Martinez, N. and H. Kornfeld (2014). "Diabetes and immunity to tuberculosis." *Eur J Immunol* 44(3): 617-626.
- McNerney, R., J. Cunningham, P. Hepple and A. Zumla (2015). "New tuberculosis diagnostics and rollout." *Int J Infect Dis* 32: 81-86.
- McNerney, R., M. Maeurer, I. Abubakar, B. Marais, T. D. McHugh, N. Ford, K. Weyer, S. Lawn, M. P. Grobusch, Z. Memish, S. B. Squire, G. Pantaleo, J. Chakaya, M. Casenghi, G. B. Migliori, P. Mwaba, L. Zijenah, M. Hoelscher, H. Cox, S. Swaminathan, P. S. Kim, M. Schito, A. Harari, M. Bates, S. Schwank, J. O'Grady, M. Pletschette, L. Ditui, R. Atun and A. Zumla (2012). "Tuberculosis diagnostics and biomarkers: needs, challenges, recent advances, and opportunities." *J Infect Dis* 205 Suppl 2: S147-158.
- Minion, J., E. Leung, E. Talbot, K. Dheda, M. Pai and D. Menzies (2011). "Diagnosing tuberculosis with urine lipoarabinomannan: systematic review and meta-analysis." *Eur Respir J* 38(6): 1398-1405.
- Miotto, P., G. Mwangoka, I. C. Valente, L. Norbis, G. Sotgiu, R. Bosu, A. Ambrosi, L. R. Codecasa, D. Goletti, A. Matteelli, E. N. Ntinginya, F. Aloï, N. Heinrich, K. Reither and D. M. Cirillo (2013). "miRNA signatures in sera of patients with active pulmonary tuberculosis." *PLoS One* 8(11): e80149.
- Moore, D. A., C. A. Evans, R. H. Gilman, L. Caviedes, J. Coronel, A. Vivar, E. Sanchez, Y. Pinedo, J. C. Saravia, C. Salazar, R. Oberhelman, M. G. Hollm-Delgado, D. LaChira, A. R. Escombe and J. S. Friedland (2006). "Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB." *N Engl J Med* 355(15): 1539-1550.
- Nakiyingi, L., V. M. Moodley, Y. C. Manabe, M. P. Nicol, M. Holshouser, D. T. Armstrong, W. Zemanay, W. Sikhondze, O. Mbabazi, B. A. Nonyane, M. Shah, M. L. Joloba, D. Alland, J. J. Ellner and S. E. Dorman (2014). "Diagnostic accuracy of a rapid urine lipoarabinomannan test for tuberculosis in HIV-infected adults." *J Acquir Immune Defic Syndr* 66(3): 270-279.
- Niazi, A. K. and S. Kalra (2012). "Diabetes and tuberculosis: a review of the role of optimal glycemic control." *J Diabetes Metab Disord* 11(1): 28.
- Noordhoek, G. T., S. Mulder, P. Wallace and A. M. van Loon (2004). "Multicentre quality control study for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by nucleic amplification methods." *Clin Microbiol Infect* 10(4): 295-301.
- NORMA (2013). Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-2013, Para prevención y control de tuberculosis.
- NORMA (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de diabetes mellitus.
- NORMA (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-010-SSA2-1994, Para la vigilancia epidemiológica.
- Orme, I. M. and A. M. Cooper (1999). "Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis." *Immunol Today* 20(7): 307-312.
- Pai, M., A. Zwerling and D. Menzies (2008). "Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update." *Ann Intern Med* 149(3): 177-184.
- Perley, C. C., M. Frahm, E. M. Click, K. M. Dobos, G. Ferrari, J. E. Stout and R. Frothingham (2014). "The human antibody response to the surface of *Mycobacterium tuberculosis*." *PLoS One* 9(2): e98938.

Rabahi, M. F., A. P. Junqueira-Kipnis, M. C. Dos Reis, W. Oelemann and M. B. Conde (2007). "Humoral response to HspX and GlcB to previous and recent infection by *Mycobacterium tuberculosis*." *BMC Infect Dis* 7: 148.

Raby, E., M. Moyo, A. Devendra, J. Banda, P. De Haas, H. Ayles and P. Godfrey-Faussett (2008). "The effects of HIV on the sensitivity of a whole blood IFN-gamma release assay in Zambian adults with active tuberculosis." *PLoS One* 3(6): e2489.

Ramirez-Lapausa, M., A. Menendez-Saldana and A. Noguero-Asensio (2015). "[Extrapulmonary tuberculosis]." *Rev Esp Sanid Penit* 17(1): 3-11.

Rao, M., D. Valentini, T. Poiret, E. Dodoo, S. Parida, A. Zumla, S. Brighenti and M. Maeurer (2015). "B in TB: B Cells as Mediators of Clinically Relevant Immune Responses in Tuberculosis." *Clin Infect Dis* 61Suppl 3: S225-234.

Ren, N., G. Gao, Y. Sun, L. Zhang, H. Wang, W. Hua, K. Wan and X. Li (2015). "MicroRNA signatures from multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*." *Mol Med Rep* 12(5): 6561-6567.

Ryu, Y. J. (2015). "Diagnosis of pulmonary tuberculosis: recent advances and diagnostic algorithms." *Tuberc Respir Dis (Seoul)* 78(2): 64-71.

SINAVE (2019). Consultado el 19 de enero de 2020 en <https://www.jalisco.gob.mx/es/prensa/noticias/85756>

Scriba, T. J., A. K. Coussens and H. A. Fletcher (2017). "Human Immunology of Tuberculosis." *Microbiol Spectr* 5(1).

Sebina, I., I. A. Biraro, H. M. Dockrell, A. M. Elliott and S. Cose (2014). "Circulating B-lymphocytes as potential biomarkers of tuberculosis infection activity." *PLoS One* 9(9): e106796.

Shin, H. J., T. O. Kim, H. J. Oh, H. Y. Park, J. S. Chang, S. Ahn, Y. I. Kim, S. C. Lim and Y. S. Kwon (2017). "Impact of diabetes mellitus on indeterminate results of the QuantiFERON TB Gold In-Tube test: A propensity score matching analysis." *PLoS One* 12(7): e0181887.

Snider, D. E., Jr., G. D. Kelly, G. M. Cauthen, N. J. Thompson and J. O. Kilburn (1985). "Infection and disease among contacts of tuberculosis cases with drug-resistant and drug-susceptible bacilli." *Am Rev Respir Dis* 132(1): 125-132.

Song, L., G. Wallstrom, X. Yu, M. Hopper, J. Van Duine, J. Steel, J. Park, P. Wiktor, P. Kahn, A. Brunner, D. Wilson, E. R. Jenny-Avital, J. Qiu, J. Labaer, D. M. Magee and J. M. Achkar (2017). "Identification of Antibody Targets for Tuberculosis Serology using High-Density Nucleic Acid Programmable Protein Arrays." *Mol Cell Proteomics* 16(4 suppl 1): S277-S289.

Steingart, K. R., N. Dendukuri, M. Henry, I. Schiller, P. Nahid, P. C. Hopewell, A. Ramsay, M. Pai and S. Laal (2009). "Performance of purified antigens for serodiagnosis of pulmonary tuberculosis: a meta-analysis." *Clin Vaccine Immunol* 16(2): 260-276.

Steingart, K. R., M. Henry, S. Laal, P. C. Hopewell, A. Ramsay, D. Menzies, J. Cunningham, K. Weldingh and M. Pai (2007). "Commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review." *PLoS Med* 4(6): e202.

Steingart, K. R., M. Henry, V. Ng, P. C. Hopewell, A. Ramsay, J. Cunningham, R. Urbanczik, M. Perkins, M. A. Aziz and M. Pai (2006). "Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review." *Lancet Infect Dis* 6(9): 570-581.

Steingart, K. R., A. Ramsay and M. Pai (2007). "Optimizing sputum smear microscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis." *Expert Rev Anti Infect Ther* 5(3): 327-331.

Streitz, M., L. Tesfa, V. Yildirim, A. Yahyazadeh, T. Ulrichs, R. Lenkei, A. Quassem, G. Liebetrau, L. Nomura, H. Maecker, H. D. Volk and F. Kern (2007). "Loss of receptor on tuberculin-reactive T-cells marks active pulmonary tuberculosis." *PLoS One* 2(8): e735.

Sturenburg, E. and R. Junker (2009). "Point-of-care testing in microbiology: the advantages and disadvantages of immunochromatographic test strips." *Dtsch Arztebl Int* 106(4): 48-54.

Sugawara, I. and S. Mizuno (2008). "Higher susceptibility of type 1 diabetic rats to *Mycobacterium tuberculosis* infection." *Tohoku J Exp Med* 216(4): 363-370.

Talavera-Paulin, M., L. Garcia-Morales, B. P. Ruiz-Sanchez, A. D. Caamal-Ley, A. Hernandez-Solis, E. Ramirez-Casanova, R. Cicero-Sabido, C. Espitia, C. Helguera-Repetto, Y. M. J. A. Gonzalez, R. Flores-Mejia, S. Estrada-Parra, I. Estrada-Garcia, R. Chacon-Salinas, I. Wong-Baeza and J. Serafin-Lopez (2016). "Active tuberculosis patients have high levels of IgA anti-alpha-crystallin and isocitrate lyase proteins." *Int J Tuberc Lung Dis* 20(12): 1681-1688.

Theron, G., J. Peter, G. Calligaro, R. Meldau, C. Hanrahan, H. Khalfey, B. Matinyenya, T. Muchinga, L. Smith, S. Pandie, L. Lenders, V. Patel, B. M. Mayosi and K. Dheda (2014). "Determinants of PCR performance (Xpert MTB/RIF), including bacterial load and inhibition, for TB diagnosis using specimens from different body compartments." *Sci Rep* 4: 5658.

Thompson, E. G., Y. Du, S. T. Malherbe, S. Shankar, J. Braun, J. Valvo, K. Ronacher, G. Tromp, D. L. Tabb, D. Alland, S. Shenai, L. E. Via, J. Warwick, A. Aderem, T. J. Scriba, J. Winter, G. Walzl, D. E. Zak and T. B. B. C. Catalysis (2017). "Host blood RNA signatures predict the outcome of tuberculosis treatment." *Tuberculosis (Edinb)* 107: 48-58.

Tripathi, D. K., K. Srivastava, K. L. Nagpal, P. K. Shukla and K. K. Srivastava (2019). "Exploration of some new secretory proteins to be employed for companion diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*." *Immunol Lett* 209: 67-74.

Tsiouris, S. J., D. Coetzee, P. L. Toro, J. Austin, Z. Stein and W. El-Sadr (2006). "Sensitivity analysis and potential uses of a novel gamma interferon release assay for diagnosis of tuberculosis." *J Clin Microbiol* 44(8): 2844-2850.

Tyagi, S., N. Sharma, J. S. Tyagi and S. Haldar (2017). "Challenges in pleural tuberculosis diagnosis: existing reference standards and nucleic acid tests." *Future Microbiol* 12: 1201-1218.

Vallerskog, T., G. W. Martens and H. Kornfeld (2010). "Diabetic mice display a delayed adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis*." *J Immunol* 184(11): 6275-6282.

Wallis, R. S., P. Kim, S. Cole, D. Hanna, B. B. Andrade, M. Maeurer, M. Schito and A. Zumla (2013). "Tuberculosis biomarkers discovery: developments, needs, and challenges." *Lancet Infect Dis* 13(4): 362-372.

Wang, S., J. Wu, J. Chen, Y. Gao, S. Zhang, Z. Zhou, H. Huang, L. Shao, J. Jin, Y. Zhang and W. Zhang (2018). "Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis*-specific antibody responses for the discrimination of active and latent tuberculosis infection." *Int J Infect Dis* 70: 1-9.

Wu, L., M. Zhang, M. Sun, B. Jia and X. Wang (2011). "Humoural immune responses to a recombinant 16-kDa-38-kDa-ESAT-6 mycobacterial antigen in tuberculosis." *J Int Med Res* 39(2): 514-521.

WHO (2021). Consultado el 07 de diciembre de 2021 en <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>

WHO (2017). Consultado el 08 de enero de 2018 en Tuberculosis fact sheet. En <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>

WHO (2008). Diagnostic Evaluation Series No. 2, World Health Organization.

Xu, J. N., J. P. Chen and D. L. Chen (2012). "Serodiagnosis efficacy and immunogenicity of the fusion protein of *Mycobacterium tuberculosis* composed of the 10-kilodalton culture filtrate protein, ESAT-6, and the extracellular domain fragment of PPE68." *Clin Vaccine Immunol* 19(4): 536-544.

Yan, L., L. Di, W. Weihua, L. Feng, L. Ruilian, Z. Jun, S. Hui, Y. Zhaoxia and Z. Weihui (2018). "A study on the clinical characteristics of treating nevus of Ota by Q-switched Nd:YAG laser." *Lasers Med Sci* 33(1): 89-93.

Yan, Z. H., L. Yi, P. J. Wei, H. Y. Jia, J. Wang, X. J. Wang, B. Yang, X. Gao, Y. L. Zhao and H. T. Zhang (2018). "Evaluation of panels of *Mycobacterium tuberculosis* antigens for serodiagnosis of tuberculosis." *Int J Tuberc Lung Dis* 22(8): 959-965.

Zak, D. E., A. Penn-Nicholson, T. J. Scriba, E. Thompson, S. Suliman, L. M. Amon, H. Mahomed, M. Erasmus, W. Whatney, G. D. Hussey, D. Abrahams, F. Kafaar, T. Hawkridge, S. Verver, E. J. Hughes, M. Ota, J. Sutherland, R. Howe, H. M. Dockrell, W. H. Boom, B. Thiel, T. H. M. Ottenhoff, H. Mayanja-Kizza, A. C. Crampin, K. Downing, M. Hatherill, J. Valvo, S. Shankar, S. K. Parida, S. H. E. Kaufmann, G. Walzl, A. Aderem, W. A. Hanekom, Acs and G. C. c. s. groups (2016). "A blood RNA signature for tuberculosis disease risk: a prospective cohort study." *Lancet* 387(10035): 2312-2322.

Zhai, X., G. Qian, Y. Wang, X. Chen, J. Lu, Y. Zhang, Q. Huang and Q. Wang (2016). "Elevated B Cell Activation is Associated with Type 2 Diabetes Development in Obese Subjects." *Cell Physiol Biochem* 38(3): 1257-1266.

Zhang, C., X. Song, Y. Zhao, H. Zhang, S. Zhao, F. Mao, B. Bai, S. Wu and C. Shi (2015). "Mycobacterium tuberculosis Secreted Proteins As Potential Biomarkers for the Diagnosis of Active Tuberculosis and Latent Tuberculosis Infection." *J Clin Lab Anal* 29(5): 375-382.

Zhang, Q., H. P. Xiao, H. Y. Cui and I. Sugawara (2011). "Significant increase in natural-killer T cells in patients with tuberculosis complicated by type 2 diabetes mellitus." *J Int Med Res* 39(1): 105-111.

Zhou, F., X. Xu, S. Wu, X. Cui and W. Pan (2017). "ORFeome-based identification of biomarkers for serodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* latent infection." *BMC Infect Dis* 17(1): 793.

Zhu, Q., M. Zhang, M. Shi, Y. Liu, Q. Zhao, W. Wang, G. Zhang, L. Yang, J. Zhi, L. Zhang, G. Hu, P. Chen, Y. Yang, W. Dai, T. Liu, Y. He, G. Feng and G. Zhao (2016). "Human B cells have an active phagocytic capability and undergo immune activation upon phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis*." *Immunobiology* 221(4): 558-567.

15. ANEXOS

ANEXO I: PUBLICACIONES Y DIVULGACIÓN

1. "Vaccination with BCG Δ BCG1419c protects against pulmonary and extrapulmonary TB and is safer than BCG". Scientific Reports. COAUTOR. DOI:10.1038/s41598-021-91993-8. Enero 2021.
2. "Relevancia del uso de nanomateriales utilizados en biosensores para la detección de Tuberculosis". Salud Jalisco. ISSN: 2448-8747. COAUTOR. Enero 2021.
3. "Comparación del desempeño de un dispositivo basado en detección vía anticuerpos vs Quantiferon TB gold in tube para diagnóstico de tuberculosis en pacientes con diabetes mellitus". Salud Jalisco. ISSN: 2448-8747. AUTOR. Abril 2020.
4. ¿Cómo podemos contribuir a reducir el impacto de padecer simultáneamente diabetes mellitus y tuberculosis?. La Crónica. AUTOR. Noviembre 2019.
5. "Changes in host response to Mycobacterium tuberculosis infection associated with type 2 Diabetes Mellitus: beyond hyperglycemia". Frontiers Cellular and Infection Microbiology. COAUTOR. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00342. Octubre 2019.
6. "Métodos actuales empleados para el diagnóstico de tuberculosis y su eficacia en diversos entornos clínicos". Salud Jalisco. AUTOR. ISSN: 2448-8747. Agosto 2019.
7. ¿Qué complicaciones presentan los métodos de diagnóstico de tuberculosis actuales?. El Sol de México. Blog México es Ciencia. AUTOR. Agosto 2018.
8. El diagnóstico oportuno de tuberculosis en personas diabéticas: ¿es posible?. El Sol de México. Blog México es Ciencia. AUTOR. Mayo 2018.

ANEXO II: PRESENTACIONES EN CONGRESO



HOSPITAL CIVIL DE GUADALAJARA
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD

Otorgan la presente

CONSTANCIA

WENDY LÓPEZ ROMERO

Flores Valdez Mario Alberto, Camacho Villegas Tanya Amanda, González Salazar Francisco, Álvarez Herrera Ángel Hilario,

Por su participación en el XIX Concurso de trabajos en cartel en la categoría Investigación Clínica con el trabajo titulado:

EVALUACIÓN DE LOS ANTÍGENOS HSPX Y ESAT6-CFP10 CON POTENCIAL PARA DETECCIÓN DE TUBERCULOSIS Y SU EVALUACIÓN EN PACIENTES CON PRESENCIA Y AUSENCIA DE DIABETES MELLITUS


"Fortalecer las Buenas Prácticas Asistenciales"


CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD
esta constancia quedó asentada en el libro 09, foja 133 de la Coordinación de Servicios Académicos con 24 Horas.
Celebrado en la Ciudad de Guadalajara, Jalisco.
27 al 29 de Febrero de 2020


Dr. Jaime Federico Andrade Villanueva
Director General
Hospital Civil de Guadalajara


Dr. José Francisco Muñoz Valle
Rector
Centro Universitario de Ciencias de la Salud


Dr. Benjamin Becerra Rodríguez
Director
Nuevo Hospital Civil de Guadalajara
"Dr. Juan I. Menchaca"


Dr. Rafael Santana Ortiz
Director
Antiguo Hospital Civil de Guadalajara
"Fray Antonio Alcalde"


Dra. Martha Patricia Sánchez Muñoz
Presidente Ejecutivo
XXII Congreso Internacional Avances en Medicina