

Artículo original

Uso de herramientas de alto desempeño para buscar biomarcadores que mejoren la detección de tuberculosis en pacientes con diabetes mellitus asintomáticos para la infección

Aceves-Sánchez M. de J. (1), González-Salazar F. (2), González-Sánchez D.(1), Bravo-Madriral J. (1) y Flores-Valdez M. A. (1).

(1) Biotecnología Médica y Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco, A.C. (2) Universidad de Monterrey.

Resumen

En la actualidad la tuberculosis (TB) continúa como un problema importante de salud pública en muchos países, incluyendo México, donde anualmente se presentan alrededor de 20 mil casos nuevos y 2 mil muertes a causa de esta enfermedad. En nuestro país, el riesgo de contraer TB debido al VIH es sólo del 2%, comparado con 25% en los casos de personas con diabetes en el sureste del país y noreste de la República. Merced a que aún existen oportunidades para mejorar el diagnóstico de la tuberculosis en lo general, y donde los métodos disponibles hoy en día varían aún más en eficacia de detección en pacientes con diabetes mellitus, en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ) realizaremos la búsqueda y validación de compuestos derivados de la bacteria, buscando las mejor reconocidas por personas con diabetes mellitus, para luego definir su utilidad en la detección temprana de TB en estos pacientes (uso como biomarcadores), idealmente antes de manifestar cualquier complicación y evaluar la aplicación de terapia preventiva en los mismos.

Palabras clave: Tuberculosis, diabetes mellitus, biomarcadores, detección temprana

Abstract

Nowadays, tuberculosis (TB) still remains an important public health problem in many countries, including Mexico, where annually about 20,000 new cases and 2,000 deaths from this disease are presented. In our country, the risk of getting TB because of HIV infection is only 2%, compared to 25% in cases of people with diabetes, found both in the southeast and northeast of the Republic. Because of the fact that there are opportunities to improve effective screening and diagnosis of tuberculosis in general, and where the methods available today vary even more in patients with diabetes mellitus, in the Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ). we will seek for and validate compounds derived from the bacteria, looking for the best ones that are recognized by people with diabetes mellitus, and then define the usefulness of these bacterial derived molecules, in the early detection of TB in these patients (use them as biomarkers), ideally before manifesting any complications and evaluate the implementation of preventive therapy in them.

Keywords: Tuberculosis, diabetes mellitus, biomarkers, early detection

Introducción

En la actualidad la tuberculosis (TB) es un problema importante de salud pública en muchos países, incluyendo México. Es la enfermedad de origen bacteriano con mayor índice de mortalidad (1.8 millones de personas mueren al año por tuberculosis) a nivel mundial. La TB en un 80%

de los casos se presenta como una infección pulmonar con grado variable de daños, lo que depende tanto del microorganismo en sí, como del estado del sistema inmune, el cual se modifica en diversos padecimientos, incluyendo la diabetes mellitus. En México, anualmente

se presentan alrededor de 20 mil casos nuevos y 2 mil muertes a causa de esta enfermedad.¹

Es bien conocido que la combinación de la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) con la TB es letal, pues se incrementa el riesgo de complicaciones en tratamiento y de efectos nocivos derivados del mismo. No obstante lo anterior, en México, el riesgo de contraer TB debido al VIH es sólo del 2%, comparado con 25% en los casos de personas con diabetes en el sureste del país,² así como también en el noreste.³ Por otro lado, según datos de la Federación Internacional de Diabetes, la prevalencia global de esta enfermedad alcanzó 382 millones en 2013 y se predice llegue a 592 millones para 2035.⁴ Se ha observado que la TB parece agravar la DM,^{5,6} requiriendo en el caso de padecer la enfermedad más dosis de insulina que las que utilizan habitualmente, debido a que al ser la TB un estado de inflamación crónica,⁷ puede exacerbar la hiperglucemia o favorecer su aparición. La asociación TB y DM prolonga el tiempo de la baciloscopía positiva y produce un retraso en la negativización de los cultivos de micobacterias, lo que implica un mayor tiempo de transmisión en la comunidad. Además, la tasa de fracaso del tratamiento antituberculoso es más alta en los pacientes diabéticos que en los no diabéticos y la duración del tratamiento para la TB es más larga en los pacientes con diabetes.⁸ Por ello, es necesario seguir una serie de recomendaciones para la búsqueda de nuevos casos y monitoreo de los ya existentes a través de un diagnóstico oportuno que permita el tratamiento adecuado y disminuya la propagación de la tuberculosis y les dé una mejor calidad de vida a los pacientes en co-morbilidad TB y DM. En México, las pautas para la prevención, control y monitoreo de la TB, incluyendo los casos asociados con DM, se encuentran contenidos en las NOM-006, NOM-015 y NOM-017 de la SSA, que recomiendan la revisión de diabéticos con síntomas respiratorios por si hubiera tuberculosis, en donde se considera el uso del cultivo como si se tratara tanto de tuberculosis pulmonar como de extra pulmonar, así como prueba de susceptibilidad a fármacos, y en los enfermos con tuberculosis, buscar diabetes, para prevenir complicaciones.⁹⁻¹¹

En atención a las cifras ya planteadas, y tomando como antecedente directo que en población de San Francisco, California, EUA, una prueba diagnóstica de uso frecuente en investigación y regular en algunos hospitales (prueba de Quantiferon®), fue menos capaz de detectar la TB en pacientes con diabetes mellitus, en casos de ausencia de detección del bacilo en secreciones.¹² En CIATEJ realizaremos la búsqueda y validación de compuestos derivados de la bacteria, que en su conjunto sean mejor

reconocidas por personas con diabetes mellitus, para luego definir su utilidad en la detección temprana de TB en estos pacientes (biomarcadores), idealmente antes de manifestar cualquier complicación y evaluar la aplicación de terapia preventiva en los mismos. Para ello usaremos sueros humanos procedentes de diferentes grupos: (a) voluntarios sanos, (b) pacientes con tuberculosis, (c) pacientes diabéticos con prueba negativa de ensayo Quantiferon-Gold, y (d) pacientes diabéticos con resultado positivo de la prueba Quantiferon-Gold. En todos los casos, el protocolo será avalado por un comité de ética hospitalaria, realizado como un estudio transversal, observacional de casos y controles, conforme a la Declaración de Helsinki, el artículo 100 de la Ley General de Salud y en los artículos 13 al 18, 20 al 22 y 113 a 120 Reglamento de la Ley General de la Salud en Materia de Investigación para la Salud en relación con la ética en la investigación. Los datos recabados por parte de los pacientes serán protegidos y clasificados como confidenciales, por otra parte los resultados que se generen consistirán de datos agregados, por lo que no se mostrarán resultados de personas individuales.

Estrategia de búsqueda de biomarcadores. Se realizará la técnica de NAPPA¹³ (Nucleic Acid Programmable Protein Array, por sus siglas en inglés), que consiste brevemente en un sistema de expresión y captura de proteínas in situ donde las proteínas etiquetadas en su extremo C-terminal son expresadas utilizando un sistema de expresión in vitro y eficientemente capturadas/purificadas por anticuerpos anti-etiqueta co-impresos, que luego usa sueros de pacientes de diferentes grupos para detectar proteínas reconocidas específicamente por alguno de tales grupos. La adquisición de la imagen se realiza con escáner láser ajustado a 532 nm de excitación, 575 nm emisión PMT-gain 90 a 140 y se realizan rondas sucesivas para verificar el reconocimiento como verdadero positivo. La expresión de varias proteínas en una sola matriz, hace posible probar la función de diferentes proteínas simultáneamente, además, permite obtener cantidades similares de proteínas, lo que potencialmente permitiría identificar antígenos presentes en bajos niveles, o antígenos con una vida media corta, característica que ha sido aplicada en la detección de otros patógenos.¹³ Además, permite el análisis de muestras sumamente complejas, como ha sido el caso de la determinación del perfil inmunológico a) del cáncer asociado a papilomavirus humano,¹⁴ o identificación de proteínas sujetas a cambios postraduccionales vía AMP (adenilación) promovida por patógenos.¹⁵

Análisis estadístico. Se evaluará la sensibilidad y especificidad de los biomarcadores, distribuidos en spots

de 3 cada uno, para grupos de 50 muestras de suero de cada uno de los grupos antes indicados, se validarán por ELISA los mejores biomarcadores para determinar la sensibilidad y especificidad de detección de cada candidato, indicando intervalos de confianza al 95%. Finalmente, se compararán la especificidad y sensibilidad de los mejores biomarcadores encontrados con las del Quantiferon®, indicando los valores de p (tests chi cuadrado y McNemar). Para evaluar la capacidad predictiva de los biomarcadores, se realizará un análisis de regresión logística binomial, considerando el género en los resultados, esto atendiendo que es conocido que en seres humanos hay una proporción cercana a 2:1 en hombres:mujeres para sufrir tuberculosis, mientras que mujeres diabéticas suelen presentar menor calidad y esperanza de vida que los hombres con este padecimiento. Los cálculos se realizarán para cada uno de los grupos estudiados, utilizando el paquete glm en R. El ajuste se hará dividiendo los grupos en dos partes, una de entrenamiento y una de prueba del modelo. Se elaborarán también curvas ROC y se calculará el área bajo la curva (ABC) para tener una representación visual de la sensibilidad frente a la especificidad de los biomarcadores.

Nuestra meta es desarrollar un método diagnóstico que permita la detección de tuberculosis asintomática en pacientes mexicanos con diabetes mellitus, con sensibilidad (límite de detección certera) y especificidad (identificación precisa, sin confundir con otros padecimientos) mayor

o igual al 80%, lo cual estaría por encima de las pruebas disponibles hoy en día (Tabla 1, conformada a partir de¹⁶⁻¹⁸). En un estudio publicado en 2013, en Malasia, los costos de atención para enfermos de tuberculosis, diabetes, y casos combinados, fue de \$840, \$1892, y \$1234 dólares americanos, respectivamente (esto es, 50% más elevados en TB-DM), con tiempos de hospitalización de 7, 4 y 10.2 días, en cada caso.¹⁹ En la ciudad de Guadalajara, en febrero de 2017, los costos ofrecidos por laboratorios de diagnóstico de la prueba PPD (Mantoux) oscilan entre \$120 y \$465 pesos, el Quantiferon TB Gold, entre \$3840 y \$5109 pesos, mientras que una prueba de hemoglobina glucosilada ronda de \$265 a \$315 pesos. Parece claro que para que nuestro método de detección temprana de anticuerpos anti-TB en pacientes con DM resulte costo-efectivo para el Sector Salud, sería conveniente se ubique en la escala de los \$500-700 pesos (costo probable dentro de 4-5 años), algo que en formato ELISA podría ser posible ya terminada la investigación y optimizado el sistema; por ejemplo, la detección de anticuerpos anti-VIH en ese formato se oferta hoy en día entre \$210 y \$285 pesos. Con este proyecto, se busca mejorar la calidad de vida de las personas diabéticas al reducir riesgos de complicaciones por tratamientos prolongados ante una infección bien establecida (la terapia regular contra TB dura de 6 a 9 meses) y también ahorrar costos de tratamiento, al iniciar de manera temprana la terapia en personas que aún no tienen evidencia significativa de afectación pulmonar.

Comparación del desempeño y características de la prueba PPD y los procedimientos basados en el IFN-γ

Desempeño y características	Ensayo tuberculínico (Prueba de PPD)	Ensayos de liberación de IFN-γ (IGRAs)
Sensibilidad estimada (en pacientes con TB)	75%-90% (menor en inmunodeficiencias)	80-90%
Especificidad estimada (sujetos sanos)	70-95%	95-100%
Sensibilidad estimada en co-morbilidad TB/DM	85-90%	65-70%
Especificidad estimada (sujetos con DM)	ND	ND
Reacción cruzada con BCG y MNT	Sí, particularmente después de la vacunación en la infancia o por exposición repetida	Menos marcada - No
Propensos a las variaciones no específicas en los resultados de las pruebas	Sí, debido al personal que toma la lectura	Sí, por numerosos factores
Asociación entre positividad del test y riesgo de TB durante el seguimiento	Moderada a fuerte asociación	Fuerte asociación
Correlación con la exposición a MTB	Sí	Sí (superior al PPD)

Beneficio del tratamiento a los positivos	Reducción del 60% de TB	Sin evidencias firmes. Parece superior al PPD
Resultados en VIH/SIDA	Valor muy limitado	Buena correlación con CD4 a partir de 100
Reproducibilidad	Moderada	Alta
Fenómeno de Booster	Sí	No, sólo en casos donde se realiza la prueba de PPD 3 días antes
Umbral para conversiones basadas en evidencia dirigida	Sí	Sí
Probabilidad de conversión	Sí, principalmente por la exposición a micobacterias	Sí; alta sólo cuando se usan definiciones de negativo-positivo
Probabilidad de reversión	Sí	Alta en los individuos con reacción débil a IGRA y discordancia con la prueba de PPD
Reacciones adversas	Raras	Raras
Conversión asociada con el riesgo de progresión hacia TB activa	Sí	Sin una evidencia directa
Capacidad para detectar TB activa en individuos con alto riesgo	Débil	Débil
Útil como medida preventiva para reducir el riesgo de progresión a TB en individuos con conversión	Sí	No hay evidencia
Costos de la prueba	Bajo	Moderado – Alto
Visitas al consultorio	2 (Una para aplicación del PPD y otra para leer la reacción)	1 (Sólo para la toma de muestra)
Infraestructura requerida	Sí (a nivel periférico)	Sí (a nivel laboratorio)
Tiempo requerido para informar resultados	2-3 días	1-2 días
Requerimientos de personal calificado	Sí (experto)	Sí (técnicos de laboratorio)

Ensayo de liberación de IFN- γ : QuantiFERON-TB Gold, QFT-GIT, T-SPOT.TB. BCG: Bacilo de Calmette-Guérin. MTB: *Mycobacterium tuberculosis*. MNT: Micobacterias no tuberculosas. TB: Tuberculosis; DM: Diabetes mellitus. VIH: Virus de inmunodeficiencia humana. SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida. PPD: Derivado proteico purificado, por sus siglas en inglés. IGRA: Ensayo de liberación de interferón-gama, por sus siglas en inglés. ND: Información no disponible.

Agradecimientos. El Fondo Internacional de Cooperación en Ciencia y Tecnología provee financiamiento para el desarrollo del proyecto 265796, donde el Dr. Mario Alberto Flores Valdez funge como Responsable Técnico.

***Responsable de correspondencia:** Dr. Mario Alberto Flores-Valdez, Biotecnología Médica y Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco, A.C. Tel. (+52) 33 3345 5200 ext 1301, floresv@ciatej.mx y floresvz91@gmail.com

Referencias bibliográficas

1. Organization WH. Tuberculosis Factsheet N°104. 2014
2. Ponce-De-Leon A, Garcia-Garcia Md Mde L, Garcia-Sancho MC, Gomez-Perez FJ, Valdespino-Gomez JL, Olaiz-Fernandez G, Rojas R, Ferreyra-Reyes L, Cano-Arellano B, Bobadilla M, Small PM, Sifuentes-Osornio J. *Tuberculosis and diabetes in southern Mexico. Diabetes Care* 2004 ; 27:1584-1590.
3. Penuelas-Urquides K, Martinez-Rodriguez HG, Enciso-Moreno JA, Molina-Salinas GM, Silva-Ramirez B, Padilla-Rivas GR, Vera-Cabrera L, Torres-de-la-Cruz VM, Martinez-Martinez YB, Ortega-Garcia JL, Garza-Trevino EN, Enciso-Moreno L, Saucedo-Cardenas O, Becerril-Montes P, Said-Fernandez S. *Correlations between major risk factors and closely related Mycobacterium tuberculosis isolates grouped by three current genotyping procedures: a population-based study in northeast Mexico. Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014;109:814-819.
4. Hodgson K, Morris J, Bridson T, Govan B, Rush C, Ketheesan N. Immunological mechanisms contributing to the double burden of diabetes and intracellular bacterial infections. *Immunology* 2014 doi: 10.1111/imm.12394
5. Banerjee D, Bhattacharyya R, Kaul D, Sharma P. Diabetes and tuberculosis: analysis of a paradox. *Adv Clin Chem* 2011;53:139-153.
6. Restrepo BI, Schlesinger LS. Impact of diabetes on the natural history of tuberculosis. *Diabetes Res Clin Pract* 2014;106:191-199. doi: 10.1016/j.diabetes.2014.06.011
7. Martinez N, Kornfeld H. Diabetes and immunity to tuberculosis. *Eur J Immunol* 2014;44:617-626. doi: 10.1002/eji.201344301
8. Jimenez-Corona ME, Cruz-Hervert LP, Garcia-Garcia L, Ferreyra-Reyes L, Delgado-Sanchez G, Bobadilla-Del-Valle M, Canizales-Quintero S, Ferreira-Guerrero E, Baez-Saldana R, Tellez-Vazquez N, Montero-Campos R, Mongua-Rodriguez N, Martinez-Gamboa RA, Sifuentes-Osornio J, Ponce-de-Leon A. Association of diabetes and tuberculosis: impact on treatment and post-treatment outcomes. *Thorax* 2013;68:214-220. doi: 10.1136/thoraxjnl-2012-201756
9. Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-2013, Para la prevención y control de la tuberculosis.
10. Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.
11. Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-1994, Para la vigilancia epidemiológica.
12. Choi JC, Jarlsberg LG, Grinsdale JA, Osmond DH, Higashi J, Hopewell PC, Kato-Maeda M. Reduced sensitivity of the QuantiFERON((R)) test in diabetic patients with smear-negative tuberculosis. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 2015;19:582-588. doi: 10.5588/ijtld.14.0553
13. Qiu J, LaBaer J. Nucleic acid programmable protein array a just-in-time multiplexed protein expression and purification platform. *Methods Enzymol* 2011;500:151-163. doi: 10.1016/B978-0-12-385118-5.00009-8
14. Ewaisha R, Meshay I, Resnik J, Katchman BA, Anderson KS. Programmable protein arrays for immunoprofiling HPV-associated cancers. *Proteomics* 2016;16:1215-1224. doi: 10.1002/pmic.201500376
15. Yu X, LaBaer J. High-throughput identification of proteins with AMPylation using self-assembled human protein (NAPPA) microarrays. *Nat Protoc* 2015;10:756-767. doi: 10.1038/nprot.2015.044
16. Trajman A, Steffen RE, Menzies D. Interferon-Gamma Release Assays versus Tuberculin Skin Testing for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: An Overview of the Evidence. *Pulm Med* 2013;2013:601737. doi: 10.1155/2013/601737
17. Agarwal SK, Singh UB, Zaidi SH, Gupta S, Pandey RM. Comparison of interferon gamma release assay & tuberculin skin tests for diagnosis of latent tuberculosis in patients on maintenance haemodialysis. *Indian J Med Res* 2015;141:463-468. doi: 10.4103/0971-5916.159297
18. Steingart KR, Flores LL, Dendukuri N, Schiller I, Laal S, Ramsay A, Hopewell PC, Pai M. Commercial serological tests for the diagnosis of active pulmonary and extrapulmonary tuberculosis: an updated systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 2011;8:e1001062. doi: 10.1371/journal.pmed.1001062
19. Aweis DMlaSASS. Economic Burden of Diabetic Tuberculosis Patients. *British Journal of Medicine and Medical Research* 2013;3:9. doi: http://www.journalrepository.org/media/journals/BJMMR_12/2013/May/1368765597-Aweis342013BJMMR3394.pdf