



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Posgrado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud.
Campo del conocimiento: Investigación Clínica Experimental en Salud.
Campo disciplinario: Bioquímica Clínica

“Comparación de los ensayos de inhibición del crecimiento micobacteriano en sangre total de pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 y sujetos sanos”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.C. FRANCISCO JAVIER LEAL VEGA

Director de Tesis:

Dra. Judith Miriam Bobadilla del Valle
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

Ciudad Universitaria, CDMX. Enero 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado

Presidente: Dr. Luis Alfredo Ponce de León Garduño

Secretario: Dra. María de Lourdes García García

Vocal: Dr. Arturo Galindo Fraga

Vocal: Dra. Judith Miriam Bobadilla del Valle

Vocal: Dra. Lucía Monserrat Pérez Navarro

Este proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio Nacional de Máxima Seguridad Biológica para el Estudio de la Tuberculosis y Enfermedades Emergentes y Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán², bajo la tutela de la Dra. Judith Miriam Bobadilla del Valle. Colaborando con el Dr. Robert Wallis del Instituto AURUM de Sudáfrica y la Dra. María de Lourdes García García del Instituto Nacional de Salud Pública.

Este proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Clave del proyecto: 201646

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por haberme brindado todo el apoyo necesario para mi formación académica y el conocimiento transmitido de sus profesores.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, número de Becario 401276) por la beca otorgada durante los estudios de maestría.

A mi tutora la Dra. Judith Miriam Bobadilla del Valle, mi agradecimiento por su apoyo y dirección en la realización de este proyecto.

Al comité tutorial, la Dra. María de Lourdes García García y al Dr. Luis Alfredo Ponce de León por la asesoría brindada durante el desarrollo de la tesis.

A los integrantes del jurado: Dr. Luis Alfredo Ponce de León, Dra. María de Lourdes García García, Dra. Lucia Monserrat Pérez Navarro, Dra. Judith Miriam Bobadilla del Valle y al Dr. Arturo Galindo Fraga por tiempo que dedicaron en la revisión de esta tesis, las observaciones y correcciones que enriquecieron este trabajo.

Al Dr. Pedro Torres González por su asesoría y enseñanzas en la realización de este proyecto.

A la Dra. María de Lourdes García García y la Dra. Guadalupe Delgado Sánchez por su apoyo en el análisis estadístico.

Agradecimientos personales

Quiero agradecer a todos los que directa e indirectamente participaron durante mi formación académica en el transcurso de este tiempo.

Al Dr. José Sifuentes Osornio por permitirme formar parte de los Microbios S.A., pero sobre todo por ser un gran maestro y ejemplo de excelencia.

Al Dr. Alfredo Ponce de León por ser mi maestro y un gran ejemplo.

A la Dra. Miriam Bobadilla agradezco su respaldo, consejo, enseñanzas, amistad, el conocimiento compartido, los regañones pero sobre todo por hacer que me enamorara de la ciencia, y sobre todo de las micobacterias. Hacer que el leer no sea una tarea, es un placer y el impulso cotidiano por ser mejor y trabajar con excelencia.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Microbiología Clínica del INCMNSZ por sus enseñanzas, a Araceli por enseñarme a trabajar Biología Molecular, Yvonne por alentarme todos los días a desarrollar el trabajo, a Barbarita y al Sr. Luis Rodríguez por ser mi apoyo y guía en momentos difíciles. A la Dra. Ángeles Tovar por su ayuda para reclutar pacientes para el estudio. A Paola por su apoyo en la discusión de artículos de inmunología. Anabel por apoyarme en algunos momentos de frustración y hacerme reír y enojar en algunos momentos, a la Dra. Ariadna Cruz Córdova por sus enseñanzas.

A Ari por apoyarme en algunos momentos de angustia experimental. A Estrella por inyectarme de optimismo todo los días y animarme a continuar.

A Narda y Zaira mis compañeras y amigas del posgrado con el gusto de haberlas conocido y hacer una gran amistad.

A Dámaris mi gran amiga, apoyo, y animadora a no decaer en los momentos difíciles, por siempre estar ahí y hacerme ver que siempre hay una solución para los problemas.

Dedicatoria a mi familia

A mis padres, Gregorio y Blanca por su amor, apoyo, consejo y siempre estar pendiente de mi. Por apoyarme en mis decisiones en mi formación personal y académica.

A mi hermano Nacho por sus cariños, mostrarme que siempre hay que ver el lado bueno de la vida e inspirarme con sus deseos de vivir la vida al máximo.

A mi abuelo Lauro quien siempre fue y sigue siendo un gran apoyo para mí y a mis tíos Lauro y Antonia por el apoyo que siempre me han brindado

A Josep por admirarme, apoyarme y confiar en mí en todo momento pero sobre todo por apoyarme en los momentos difíciles.

A mis niñas Nina y Camila por su amor y alegría que me brindan todos los días. A Chicha por desvelarse en las noches y madrugadas de estudio conmigo.

Al Dr. Javier Cabiedes Contreras por ser parte fundamental en mi formación de Licenciatura y mostrarme el camino de la ciencia.

A Dra. Miriam Bobadilla por ser mi guía y gran maestra.

A todos mis maestros durante toda mi vida académica, gracias por sus enseñanzas, de vida y de ciencia.

“Si he logrado ver más lejos, ha sido porque he subido a hombros de gigantes”

Isaac Newton

Índice General

1. Introducción.....	9
2. Marco teórico.....	10
2.1. Diabetes mellitus tipo 2 y epidemiología.....	13
2.2. Asociación epidemiológica entre tuberculosis y diabetes mellitus tipo 2.....	14
2.3. Asociación entre el control glucémico, complicaciones relacionadas a diabetes y el desarrollo de tuberculosis activa.....	15
2.4. Alteraciones inmunológicas en presencia de hiperglucemia crónica y diabetes mellitus tipo 2.....	16
2.5. Tuberculosis latente, diabetes mellitus y riesgo de reactivación.....	19
2.6. Ensayos de Inhibición del Crecimiento Micobacteriano.....	21
2.7. Ensayos de inhibición del crecimiento micobacteriano en sangre total.....	22
2.8. Ensayos de inhibición del crecimiento micobacteriano en sangre total en métodos automatizados.....	23
3. Planteamiento del problema.....	26
4. Justificación.....	26
5. Pregunta de investigación.....	27
6. Hipótesis.....	27
7. Objetivo general.....	27
8. Objetivos específicos.....	28
9. Método.....	28
9.1. Diseño del estudio.....	28
9.2. Lugar de estudio.....	28
9.3. Población de estudio.....	28
9.4. Grupos de estudio.....	29
9.5. Criterios de Inclusión pacientes con DM2.....	29
9.6. Criterios de inclusión sujetos sanos.....	29
9.7. Criterios de exclusión de pacientes con DM2.....	30

9.8. Criterios de exclusión sujetos sanos.....	31
10. Metodología.....	31
10.1. Escrutinio, selección de los sujetos y toma de muestra venosa.....	31
10.2. Realización de la prueba de TST.....	32
10.3. Aplicación de cuestionario e historia clínica completa.....	32
10.4. Telerradiografía de Tórax.....	32
10.5. Ensayos de inhibición del crecimiento micobacteriano en sangre total.....	33
10.5.1 Cultivo y preparación del stock.....	33
10.5.2. Titulación del stock.....	34
10.5.3. Cultivo con sangre completa (Co-cultivo).....	34
10.5.4 Cosecha de micobacterias del co-cultivo.....	34
10.5.5. Lectura de los resultados del EICMST.....	35
10.5.6. Ensayos de liberación de interferón- γ	35
11. Análisis Estadístico.....	36
11.1. Justificación del tamaño de la muestra.....	36
11.2. Análisis estadístico.....	36
12. Aspectos éticos.....	38
13. Resultados.....	39
13.1. Participantes en el estudio.....	39
14. Discusión.....	46
15. Conclusiones.....	51
16. Bibliografía.....	52

1. Introducción

La tuberculosis (Tb) es uno de los principales problemas de salud. La Organización Mundial de la Salud (OMS) informó en 2018 que 10.4 millones de personas desarrollan Tb cada año y cerca de 2 millones mueren a causa de este padecimiento.(1) La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) incrementa el riesgo de desarrollar Tb pulmonar activa (TBPA)(2,3) y está asociada con pobres resultados en el tratamiento para Tb(4). Mundialmente el 15% de casos estimados de Tb son atribuidos a DM2 (5). La Federación Internacional de Diabetes (IFD) ha estimado que el número de personas con DM2 incrementará en los próximos 20 años en 55%. Actualmente cerca del 70% de los pacientes con DM2 habitan en países de ingreso per cápita medio o bajo y se estima que el mayor incremento en la tasa de DM2 ocurrirá también en estos países. Siete de los países con alta prevalencia de TB se encuentran también entre los primeros lugares de prevalencia de DM2. Esto representa una gran cantidad de personas en riesgo de desarrollar TBPA y como consecuencia un incremento en el reservorio de Tb (Figura 1)(6).

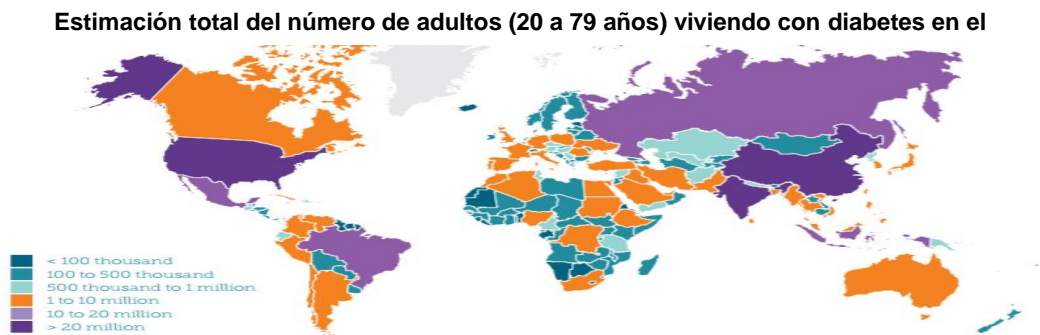


Fig.1. Estimación mundial de personas con DM 2. (Modificado de International Diabetes Federation)

2. MARCO TEÓRICO

La Tb es una enfermedad infecciosa causada por microorganismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), afecta principalmente a los pulmones (Tb pulmonar), pero puede afectar otros sitios del cuerpo como el aparato digestivo, huesos, articulaciones y piel, entre otros (Tb extrapulmonar)(7).

Existen dos presentaciones de la enfermedad, la TBPA, se presenta cuando los pacientes infectados presentan signos y síntomas propios de la enfermedad, como pérdida de peso, evidencia radiográfica (cavitaciones, nódulos, opacidades en lóbulos inferiores, o compromiso multilobar, adenopatías torácicas), fiebres nocturnas, diaforesis, tos, expectoración sanguinolenta y baciloscopía positiva. La confirmación de la TBPA se realiza mediante el cultivo de muestras de expectoración y el aislamiento de *M. tuberculosis*. La Tb se transmite a través del aire, en gotitas de flügge o flush, pequeñas gotas de saliva en gotitas de 0.03 – 1µM, que se liberan cuando los sujetos infectados tosen, estornudan o hablan, los bacilos que se encuentran en estas gotitas, son inhaladas por individuos cercanos a ellos. Estas partículas infectantes, se alojan en los alveolos en donde el bacilo es fagocitado por los macrófagos alveolares, invaden el epitelio subyacente y ocasionan una respuesta inflamatoria local que resulta en el reclutamiento de otras células mononucleares de los capilares cercanos. Lo anterior, proporciona nuevas células susceptibles de ser infectadas y favorece el incremento de la población bacteriana y permite al patógeno cruzar la barrera alveolar (8,9).

La mayoría de los individuos infectados por *M. tuberculosis*, desarrollan una respuesta inmune celular efectiva entre 2-8 semanas después del contagio, con lo cual se detiene la multiplicación del bacilo (10). Los linfocitos T activados, macrófagos y otras células del sistema inmune forman granulomas que rodean el tejido necrótico y limitan la replicación y diseminación del bacilo. Durante este proceso, la mayoría de las micobacterias son eliminadas y se detiene el progreso de la enfermedad. Sin embargo, la capacidad de erradicar completamente al patógeno presenta gran variabilidad entre los individuos, y en la mayoría de los casos, el bacilo desarrolla estrategias efectivas para evadir la respuesta inmune lo cual resulta en la sobrevivencia y persistencia de algunos bacilos en un estado no replicante en el hospedero, que se denomina tuberculosis latente (TBL) (11). Como se observa en la figura 2. Para fines epidemiológicos y clínicos, la TBL se define por la evidencia inmunológica de exposición a MTB: positividad a la prueba cutánea de tuberculina (TST) o a los ensayos de liberación de interferón- γ (IGRA), en ausencia de signos, síntomas y datos radiológicos de TBA (12).

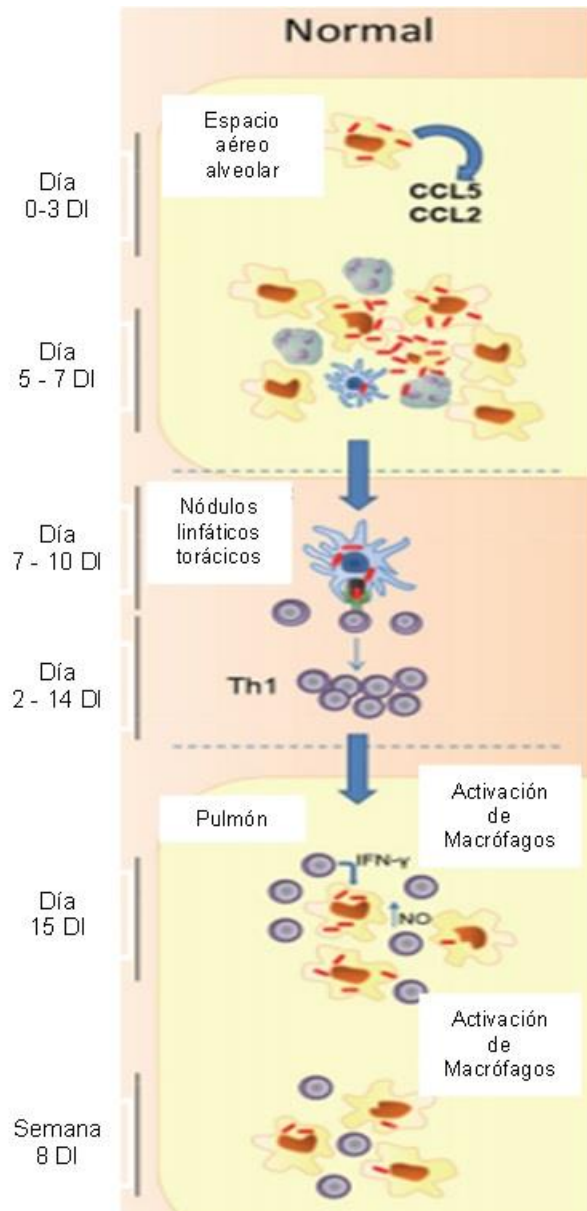


Fig. 2. En esta figura se representa la respuesta inmune en un sujeto sano con infección por *M. tuberculosis*. (Modificado de Martínez N y Kornfeld H, 2014)

El balance entre la inmunidad del hospedero y la multiplicación del bacilo determinan alguno de los siguientes desenlaces en la infección: 1) TBA primaria una minoría de la población desarrolla rápidamente síntomas clínicos poco tiempo después del contagio, 2) TBL, la mayoría de las personas infectadas no muestran signos de enfermedad y adquieren inmunidad efectiva, y finalmente 3) TBA post-primaria, en una proporción de los individuos con TBL reactivan la enfermedad años después (13,14).

2.1. Diabetes mellitus tipo 2 y epidemiología

La DM2 es una enfermedad crónica no transmisible grave, que se caracteriza por hiperglucemia causada por la deficiencia relativa o absoluta de la insulina (hormona que regula la cantidad de glucosa en la sangre) o cuando el organismo no puede utilizar de manera eficaz la insulina que produce (15).

La prevalencia mundial de DM2 es creciente, actualmente es de 422 millones de casos y se estima que sea la séptima causa de muerte en el 2030. El número de personas afectadas está en aumento en cada país, el 77% de las personas con DM2 vive en países con ingresos bajos y medios (Fig. 1); la edad promedio de los sujetos afectados con DM2 se encuentra entre los 40 y 59 años. En México, la prevalencia de esta enfermedad es de 4 millones de personas diagnosticadas (16), así mismo, la DM2 es la principal causa de muerte según los datos reportados por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), estos datos concuerdan con lo reportado por Estrada G y cols., en una revisión donde se mostró a la DM2

como la principal causa de muerte en adultos en México desde el año 2000 a la fecha (17).

2.2. Asociación epidemiológica entre tuberculosis y diabetes mellitus tipo 2

Se ha estudiado desde hace muchas décadas, la asociación epidemiológica entre DM2 y TBPA, sin embargo, la magnitud de la asociación ha sido inconsistente en los diferentes estudios con base poblacional.

En estos estudios realizados en países con prevalencia baja de TB como Dinamarca (aOR 1.18, IC 95% 0.96-1.45) y Australia (RR 1.78, IC 95% 1.17-2.73) han reportado asociaciones débiles entre ambas enfermedades (18-20). En contraste, otras regiones con prevalencia moderada y alta de TB como Taiwan (aHR 2.09, IC 95% 1.10-3.95), Corea del Sur (RR 3.57 IC 95% 3.07-5.16), Hong Kong (aHR 1.77, IC 95% 1.41-2.24) y la India (RR 2.24 IC 95% 1.38- 3.65) han informado asociación de mayor magnitud entre ambos padecimientos (21-24). En este mismo sentido, un estudio reciente en el que se analizaron datos de la OMS de 46 países, se identificó que en los países con menor ingreso per cápita y prevalencia elevada de TB, los pacientes con DM2 presentan mayor riesgo de desarrollar TBA (OR 2.29 IC 95% 1.84-2.39) (25).

En un metanálisis reciente, el cual incluyó datos de 13 estudios observacionales de países con diferentes prevalencias de Tb, se informó un riesgo relativo de 3.11 (IC 95% 2.27- 4.36) calculado con base a estudios de cohorte para TBA en pacientes con DM2 (2).

En México, un estudio realizado en el año 2004 en población abierta en el estado de Veracruz, mostró una tasa 6 veces mayor de TBPA en presencia de DM2 (24). En este mismo estudio se estimó que el 60% de los casos de TBA se presentará en pacientes con DM2 en los próximos años (24,25). Sin embargo Delgado G y cols., informaron recientemente, en un estudio realizado en varios estados de la República Mexicana, un incremento de 82.64% de incidencia de TBPA asociada a DM2; en contraste con la tasa de TBPA sin DM2 que disminuyó en 26.77% comparado con lo reportado en 2004 en el estado de Veracruz (27).

2.3. Asociación entre el control glucémico, complicaciones relacionadas a diabetes y el desarrollo de tuberculosis activa.

Algunos estudios sugieren que el riesgo de desarrollar TBPA en los pacientes con DM2 es mayor en aquellos sujetos que presentan hiperglucemia crónica o pobre control glucémico.

A este respecto, una cohorte de pacientes con DM2 > 65 años, mostró que los individuos con hemoglobina glucosilada (HbA1c) >7% presentaban mayor riesgo de TBPA (aRR 3.1 IC 95% 1.6-5.9) que los individuos con HbA1c <7%. En contraste, una cohorte Danesa no encontró incremento en la asociación de DM2 con TBPA en sujetos con HbA1c >8%(19,24).

Mientras que, en un estudio de casos y controles realizado en California, se informó una mayor asociación con TBPA en pacientes con DM2 con pobre control glucémico y en presencia de complicaciones especialmente en población hispana (aOR 5.73 IC 95% vs 4.78-6.87)(28). Así mismo, una cohorte Australiana, reportó

un incremento en la asociación con TBPA en los pacientes usuarios de insulina (aRR 2.27; IC 95% 1.41-3.46 vs 1.48 IC 95% 1.04-2.10), sin embargo, no fue posible esclarecer si el uso de insulina es un factor de riesgo independiente para TB o un indicador de mayor duración y severidad de DM2 (20).

Lo anterior sugiere que el riesgo de desarrollar TBPA se incrementa en los pacientes con DM2 con inadecuado control glucémico y en los que presentan las complicaciones crónicas de la enfermedad sin embargo, la asociación no ha sido consistente en todos los estudios.

2.4. Alteraciones inmunológicas en presencia de hiperglucemia crónica y diabetes mellitus tipo 2

Estudios en modelos de ratones con DM2 vs ratones euglucémicos infectados experimentalmente con *M. tuberculosis*, han reportado un incremento en la mortalidad y en la carga bacteriana pulmonar en los con ratones con DM2 (29). Otro estudio, en un modelo de DM2 inducido con estreptozotocina en ratones, mostró que los ratones con hiperglucemia crónica (> 3 meses), presentan cargas micobacterianas un logaritmo mayor, respuesta inmune adaptativa retardada, menor producción de interferón- γ (IFN- γ) durante la respuesta inicial y menor cantidad de células reactivas al antígeno ESAT-6 en comparación con ratones con hiperglucemia aguda (< 1 mes) (30). Otro estudio, en donde se utilizó el mismo modelo animal, identificó que la presentación de antígenos se encontró retardada, menor producción de citocinas Th1, niveles disminuidos de factores quimiotácticos (CCL2 y CCL5), menor agregación de leucocitos en el sitio de la primo infección

(pulmón) y menor expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa en los ratones con hiperglucemia crónica(31,32).

Los estudios de inmunopatogénesis de DM2 y TB en humanos son escasos y en algunos de ellos se ha confirmado la disminución en la producción de citocinas Th1 observada en modelos animales (33), sin embargo, en un estudio realizado en hispanos con DM2 e hiperglucemia crónica se observó una respuesta contraria al estímulo de la sangre con el antígeno PPD (Purified Protein Derivative), en donde se mostró una producción mayor de citocinas Th1 en comparación con los sujetos sanos. La explicación de la discrepancia observada, se atribuyó a una mayor carga micobacteriana y a la regulación deficiente en la producción de citocinas en los sujetos con DM2, sin descartar un componente genético de la población estudiada (Fig. 3) (34,35).

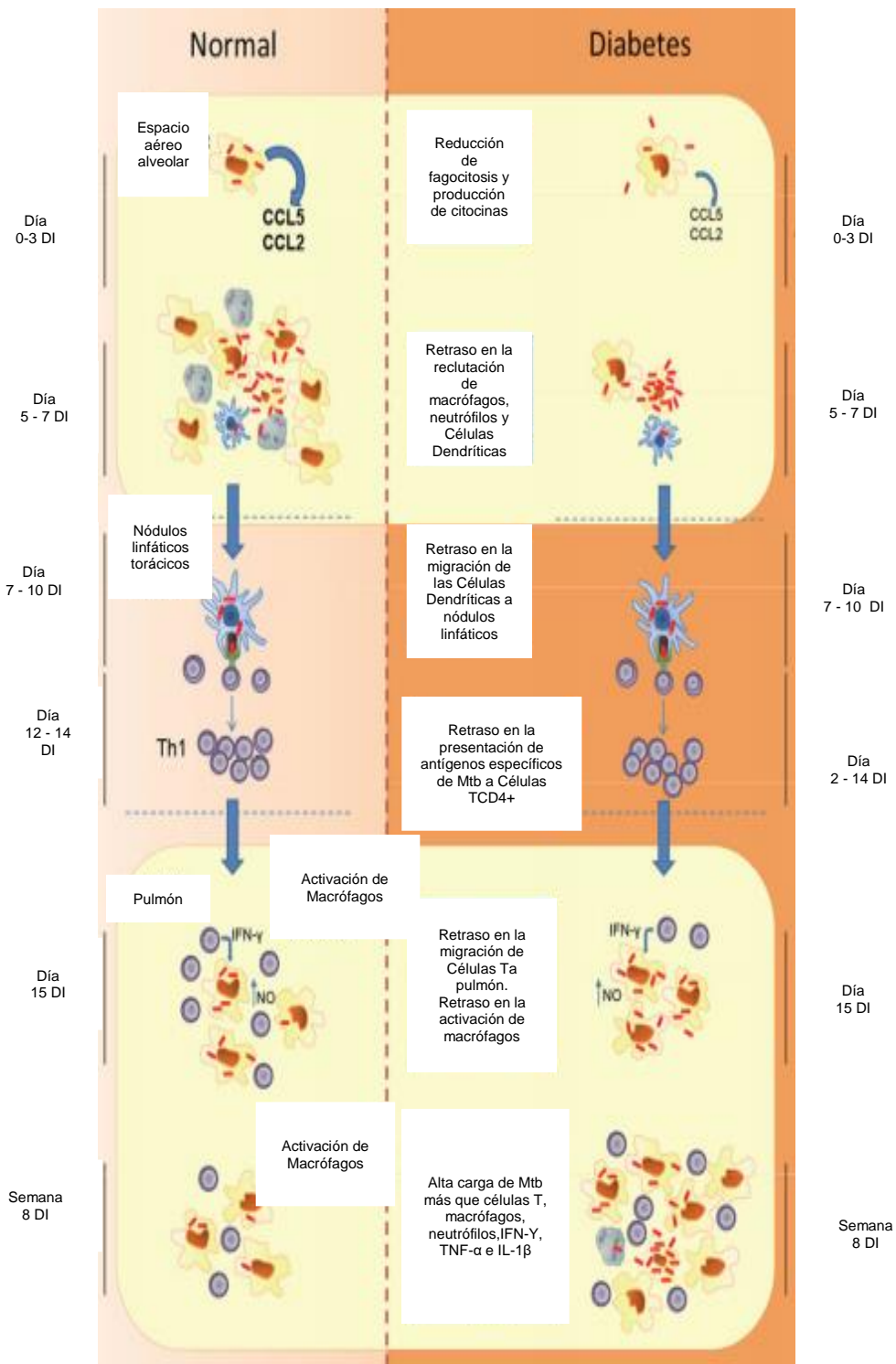


Fig. 3. Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis* en sujetos sanos y en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. (Modificado de Martínez N y Kornfeld H, 2014)

2.5. Tuberculosis latente, diabetes mellitus y riesgo de reactivación

Las personas infectadas o expuestas a *M. tuberculosis*, se pueden identificar mediante la prueba cutánea de la tuberculina (TST, Tuberculin Skin Test), después de seis a ocho semanas de exposición al bacilo de la Tb. La TST es una intradermorreacción basada en la hipersensibilidad retardada en respuesta a una mezcla compleja de más de 200 antígenos de *M. tuberculosis* conocida como PPD. Esta prueba ha sido utilizada durante más de 100 años, y constituyó hasta hace un par de décadas, la única forma de diagnóstico de TBL. La induración mayor de 5 mm, (10 a 15 mm dependiendo de la prevalencia de enfermedad en la región) medida en 48 a 72 horas después de la aplicación del PPD, es considerada positiva. La TST no puede distinguir entre la infección por microorganismos del complejo *M. tuberculosis* (CMTB), y la sensibilización con otras micobacterias ambientales, dado que puede existir cierta reactividad cruzada por exposición a este tipo de micobacterias (36). Por otro lado, la vacunación con BCG puede causar resultados falsos positivos de la TST pocos años después de su aplicación (0-5 años), sin embargo, este tipo de reactividad cruzada a los antígenos contenidos en el PPD, suele ocasionar reacciones de moderada intensidad (5-10 mm de induración) (37).

En la actualidad, se encuentran disponibles pruebas más sensibles y específicas para detectar TBL. Estas pruebas son denominadas ensayos de liberación de IFN- γ (IGRA Interferon- γ release assays), y permiten detectar la respuesta de las células T, ante la estimulación con los antígenos ESAT-6 y CFP-10, los cuales son específicos de *M. tuberculosis*. Estas pruebas son consideradas como positivas

cuando se detecta secreción de Interferón- γ (IFN- γ) por las células T. Esta determinación se puede realizar mediante la técnica de ELISPOT en donde el resultado se da en unidades formadoras de manchas (SFU Spot Forming Units) y se considera una prueba positiva cuando se detectan >8 SFU. La prueba de IGRA detecta directamente los niveles de IFN- γ , y el resultado se expresa en unidades internacionales/ mL (positiva >0.35 UI/mL). Se sabe que los antígenos utilizados en estas pruebas, están codificados por genes ausentes en la cepa vacunal *M. bovis* BCG, y por ello se incrementa la especificidad de la prueba en la población que ha sido vacunada. Entre los principales inconvenientes de la prueba de IGRA se encuentra una importante tasa de reversión (30%) pero no se ha encontrado un significado biológico claro (38,39).

Por otro lado, en la actualidad se reconoce que la TBL es en realidad un espectro dentro del cual la positividad de TST o IGRA pueden tener un significado biológico diferente, en algunos casos, la positividad a estas pruebas corresponde a una “cicatriz inmunológica” sin la presencia de bacilos, mientras que en otros representa la contención inmunológica activa de bacilos en estado latente, los cuales pueden reiniciar su replicación si ocurre alguna alteración en la respuesta inmune (33). Sin embargo, en la actualidad no existen herramientas que nos permitan distinguir estas dos condiciones en los sujetos que presentan una prueba TST o IGRA positiva.

Lo anterior hace sentido con estudios epidemiológicos los cuales muestran que solo de 5-10% de los individuos con TBL desarrollarán la enfermedad durante el curso de su vida, sin embargo, el riesgo aumenta de 5-15% por año en presencia

de otros factores, como la infección con Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), el uso prolongado de esteroides, el uso de inhibidores de factor de necrosis tumoral y el trasplante de órganos, entre otros (40,41).

En los países con baja prevalencia de TBL, como parte de las intervenciones para lograr el control de la enfermedad, se recomienda el tratamiento de esta infección con isoniacida (INH) 300mg/día durante 6-9 meses. Esta estrategia ha mostrado disminuir el riesgo de progresión a TBPA hasta en un 90%(41,42). Sin embargo, en países de prevalencia moderada y alta de Tb, dicho tratamiento se administra únicamente a las poblaciones en mayor riesgo de desarrollar TBPA.

En el caso particular de DM2, no existen estudios prospectivos que hayan determinado el riesgo de TBPA entre los sujetos con TBL y tampoco se ha determinado la utilidad de administrar tratamiento con INH. En el consenso más reciente de la OMS se consideró esta estrategia como poco práctica debido a la gran cantidad de individuos que serían expuestos a los efectos adversos de la INH y el alto costo del tratamiento para los sistemas de salud en los países con alta prevalencia de ambos padecimientos (43).

2.6. Ensayos de Inhibición del Crecimiento Micobacteriano

Recientemente, se han reportado en la literatura diversos ensayos *in vitro* que permiten caracterizar la respuesta inmune celular de cada individuo contra la infección por *M. tuberculosis*. Estos ensayos son realizados *in vitro* mediante el aislamiento y cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cell) o bien son realizados con sangre total, con

inóculos conocidos de diferentes cepas de *M. tuberculosis* y se les ha denominado Ensayos de Inhibición del Crecimiento Micobacteriano (EICM) (44).

Estos ensayos se clasifican de acuerdo con las subpoblaciones específicas de PBMC utilizadas con y sin estimulación previa, con antígenos de *M. tuberculosis*. En los ensayos donde se utilizan linfocitos y sin estimulación antes del co-cultivo, se les denomina ensayos de inhibición linfocitaria primaria. Los ensayos que emplean PBMC para el co-cultivo con las cepas de *M. tuberculosis*, se les denomina ensayos de inhibición linfocitaria secundaria y permiten evaluar la participación de las células de memoria central. Finalmente, otro grupo de ensayos emplea sangre total, la cual se co-cultiva directamente con la cepa de *M. tuberculosis*, a éstos se les conoce como Ensayos de Inhibición del Crecimiento Micobacteriano en Sangre Total (EICMST). Estos ensayos se han empleado con el propósito de determinar la intervención de las diferentes subpoblaciones celulares en la respuesta inmune celular y humoral contra *M. tuberculosis*. Los EICMST se consideran adecuados para su uso en estudios clínicos debido a su simplicidad técnica (43).

2.7. Ensayos de inhibición del crecimiento micobacteriano en sangre total

Las micobacterias residen y se multiplican dentro de los macrófagos, la habilidad de estas células para regular los mecanismos bactericidas parece fundamental para la contención exitosa de los microorganismos, ya que aquellos individuos con defectos determinados genéticamente en la función de los macrófagos los vuelven altamente susceptibles a infecciones graves ocasionadas por micobacterias. (35)

Debido a lo anterior, se deduce que la habilidad de limitar el crecimiento de las micobacterias dentro de los macrófagos es fundamental para una respuesta inmune exitosa.

El principio biológico de estos ensayos es la fagocitosis que sufren las micobacterias en el co-cultivo con sangre total, lo cual demuestra su potencial como modelo de Tb intracelular. A diferencia de los modelos de inhibición bactericida primaria y secundaria, el ensayo en sangre total evalúa la compleja relación entre los factores humorales y celulares del hospedero, los cuales, juegan un papel importante en la respuesta inmune ante la infección por micobacterias. La limitación principal de este modelo es que los monocitos en sangre no representan completamente las actividades de los macrófagos pulmonares maduros o de otras poblaciones celulares cuya actividad pudiera ser distinta entre el compartimiento pulmonar y el sanguíneo (45).

Estos EICMST han sido utilizados para caracterizar la respuesta inmune en poblaciones inmunocomprometidas, para esclarecer el significado biológico de las discrepancias entre la TST y los IGRA y de manera más importante para establecer la eficacia de diferentes vacunas en experimentación (46,47).

Kampmann B y cols., informaron menor tasa de crecimiento de una cepa de *Mycobacterium bovis* BCG lux en el co-cultivo con sangre total de sujetos con TST positiva en comparación con los sujetos con TST negativa, (1.8 vs 4.9 $p=0.005$) y en recién nacidos 3-6 meses después de la vacunación con BCG (9.6 vs 3.9 $p<0.0001$), en ambos casos por efecto de la inmunidad celular adquirida, estos

reportes utilizaron unidades relativas de luz para medir el crecimiento de las micobacterias(46).

Esta metodología se ha utilizado también en pacientes pediátricos con infección por VIH y Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), para determinar el efecto de la terapia antirretroviral en la inmunidad contra MTB, se demostró disminución en la tasa de crecimiento de las micobacterias (10.5 vs 6.5 $p=0.001$) posterior al inicio del tratamiento (47).

Otras poblaciones y contextos clínicos en las cuales se ha utilizado este ensayo son: usuarios de bloqueadores de factor de necrosis tumoral (TNF- α), pacientes con TBP como predictor de falla a tratamiento y para medir la efectividad del suplemento de vitamina D como adyuvante en el tratamiento de TBP (48,49).

Todo lo anterior, demuestra la utilidad del ensayo en diferentes situaciones clínicas, y su buena correlación con la respuesta inmune del hospedero, dos revisiones recientes, sugieren estos ensayos como herramientas útiles en estudios de enfoque clínico como un marcador de inmunidad (50,51).

2.8. Ensayos de inhibición del crecimiento micobacteriano en sangre total en métodos automatizados

Como una alternativa al uso de micobacterias recombinantes con genes reporteros en los EICMST (BCG lux), Cheon SH y cols., informaron el empleo de una plataforma automatizada (BACTEC 460, método radiométrico) para demostrar el efecto en la inmunidad *in vitro* de sujetos adultos vacunados con BCG en contra de cepas atenuadas, cepas hipervirulentas y estándar de *M. tuberculosis*, y

correlacionaron el índice de crecimiento proporcionado por el instrumento con las UFC (50).

Recientemente, ha resurgido el interés en realizar EICMST utilizando equipos automatizados, específicamente con la plataforma MGIT/ BACTEC 960 que es una plataforma fluorométrica.

El principio de la detección de crecimiento de las micobacterias mediante este sistema, es el siguiente: los tubos MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) contienen caldo Middlebrook 7H9 más un fluorocromo saturado con oxígeno (pentahidrato de rutenio tris 4,7- difenil-1, 10-fenontrolina) embebido en silicón en el fondo del tubo. Durante el crecimiento de las bacterias en tubo, el oxígeno es consumido por las bacterias y el fluorocromo se reduce, en estas condiciones el pentahidrato de rutenio tris 4,7- difenil-1, 10-fenontrolina fluoresce, dando como resultado la emisión de fluorescencia la cual es visualizada bajo luz UV. Los tubos MGIT incubados en el instrumento, son monitoreados para detectar el incremento de fluorescencia cada 60 minutos. El instrumento detecta positivo un cultivo si se alcanza el umbral de fluorescencia predeterminado. El tiempo de crecimiento registrado en el instrumento o tiempo de positividad (TDP) es inversamente proporcional al logaritmo del tamaño del inóculo, a mayor concentración del inóculo, se acorta del TDP. Esta ecuación se ha utilizado para cuantificar el cambio en la viabilidad de las micobacterias durante los EICMST y por consiguiente como un método de cuantificación de UFC/mL.

Esta metodología se ha empleado exitosamente para demostrar la efectividad de nuevos fármacos contra Tb (53-55), así como para determinar la inmunidad específica de los pacientes a cepas aisladas en casos de cura de Tb, (55) y para determinar la posibilidad de falla al tratamiento de Tb con fármacos convencionales (53).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La prevalencia de DM2 en México es elevada. Recientemente se ha demostrado que existe una asociación entre la DM2 con la reactivación de Tb, de acuerdo a datos reportados por Delgado y col., en 2015 el 83% de los casos de TBPA se presenta en pacientes con DM2.

En la actualidad no existen herramientas de laboratorio que identifiquen a los sujetos con mayor riesgo de desarrollar la enfermedad, debido a que las pruebas disponibles para el diagnóstico de TBL (TST e IGRA) no predicen por si solas la progresión a TBA.

4. JUSTIFICACIÓN

La OMS calcula que una tercera parte de la población mundial padece TBL, se ha comprobado un riesgo de presentar TBPA del 5 al 10% a lo largo de la vida; la mayoría de las personas contraen TBPA en los primeros 5 años después de la infección inicial (1). El riesgo de contraer esta enfermedad después de la infección depende de varios factores, y el principal es el estado inmunitario del huésped. En la DM2 se presentan alteraciones en el sistema inmune (35), en México el 15% de la población adulta padece DM2 y el 83% de los casos de TBPA se han

presentado en esta población. Por lo tanto es necesario el desarrollo de herramientas de laboratorio que permitan identificar a los pacientes con DM2 que presentan mayor riesgo de desarrollar TBA (27). Este estudio permitirá utilizar los EICMST como un método para medir la respuesta inmune de los pacientes con DM2 contra *M. tuberculosis*.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe diferencia en la inhibición del crecimiento micobacteriano en sangre total de pacientes con diagnóstico de DM2 comparado con la inhibición del crecimiento micobacteriano en sangre total de Sujetos sanos?

6. HIPÓTESIS

Existe diferencia en la inhibición del crecimiento micobacteriano en sangre total de pacientes con DM2 comparado con la inhibición del crecimiento micobacteriano de sujetos sanos.

7. OBJETIVO GENERAL

Comparar la inhibición del crecimiento micobacteriano en sangre total de pacientes que padecen DM2 contra la inhibición del crecimiento micobacteriano en sangre total de sujetos sanos.

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar los EICMST de pacientes con DM2 controlados (HbA1c <7%) contra los EICMST de pacientes que padecen DM2 no controlados (HbA1c >9%).
- Comparar los EICMST de pacientes con DM2 controlados (HbA1c <7%) contra los EICMST de sujetos sanos.
- Comparar los EICMST de pacientes con DM2 no controlados (HbA1c >9%) contra los EICMST de sujetos sanos.

9. MÉTODO

9.1. Diseño del estudio: Estudio transversal.

9.2. Lugar de estudio: El estudio se realizó en el laboratorio de bioseguridad nivel 3 (BSL-3) del Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición (INCMNSZ).

9.3. Población de estudio: Pacientes con registro en el INCMNSZ, que pertenecen a la cohorte de pacientes con DM 2 de la Clínica de Diabetes, que aceptaron participar en el estudio y firmaron consentimiento informado. Los controles sanos fueron personal de salud del INCMNSZ a los cuales se les invitó a participar en el estudio y firmaron consentimiento informado.

9.4. Grupos de estudio:

Grupo 1: Pacientes con DM2 no controlados (HbA1c>9%).

Grupo 2: Pacientes con DM2 controlados (HbA1c<7%).

Grupo 3: Sujetos sanos.

9.5. Criterios de Inclusión pacientes con DM2:

- Hombres y mujeres mayores de 18 años y menores de 65 años
- Que pertenezcan a la cohorte de pacientes con DM2 de la Clínica de Diabetes y de quienes se tenga documentado el diagnóstico de DM2 de acuerdo a los criterios actuales de la Asociación Americana de Diabetes.
- Que se conozca la fecha de diagnóstico de DM2
- Que acepten participar y firmen la carta de consentimiento informado

9.6. Criterios de inclusión sujetos sanos:

- Hombres y mujeres mayores de 18 años y menores de 65 años
- Personal de salud sano que acepten participar y firmen consentimiento informado.
- Que se haya excluido el diagnóstico de DM2 (glucemia de ayuno <98 mg/mL o curva de tolerancia a la glucosa normal)

9.7. Criterios de exclusión pacientes con DM2:

Diagnóstico previo o actual de alguno de los siguientes padecimientos:

- Infección por VIH
- Enfermedades del tejido conectivo
- Neoplasia sólida o hematológica
- Trasplante de órganos sólidos o de médula ósea
- Insuficiencia renal crónica en cualquier estadio
- Diabetes mellitus tipo 1
- Microalbuminuria en micción única mayor a 300 mg/mL
- Índice de masa corporal mayor de 30 o menor de 15
- DM2 de más de 10 años de diagnóstico
- Presencia de alguna complicación crónica relacionada con DM2 (cardiopatía isquémica, retinopatía diabética, insuficiencia vascular periférica, neuropatía diabética, pie diabético)
- Uso de insulina para el manejo de la DM2
- Contacto domiciliario con pacientes diagnosticados con TBA
- Trabajadores de la salud y de laboratorio en contacto con muestras o pacientes con TB
- Conversión de la TST reciente (menor de dos años)
- Que hayan recibido o se encuentren en tratamiento de TBL
- Diagnóstico previo de tuberculosis
- Presencia de signos o síntomas que sugieran la presencia de TBA

- Datos radiológicos en la Rx de Tórax que sugieran la presencia de TBA
- Que hayan padecido un cuadro infeccioso durante las dos semanas previas
- Tabaquismo activo (cinco o más cigarrillos diarios)
- Uso de medicamentos (antibióticos) con actividad sobre *M. tuberculosis* (cicloserina, PAS, isoniacida, rifampicina, pirazinamida, etambutol, amikacina, capreomicina, estreptomina, amoxicilina-clavulanato, ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, linezolid, meropenem, imipenem) durante las dos semanas previas a la inclusión al estudio
- Leucopenia o linfopenia documentada en la citometría hemática a su ingreso en el estudio
- Consumo de medicamentos inmunosupresores tres meses previos a su ingreso al estudio
- Uso de cualquier medicamento (biológicos) basado en anticuerpos contra uno o varios componentes del sistema inmune.

9.8. Criterios de exclusión sujetos sanos:

Sujetos que decidan en algún momento salir del estudio.

10. METODOLOGÍA

10.1. Escrutinio, selección de los sujetos y toma de muestra de sangre venosa:

A todos los pacientes con criterios de inclusión de la Clínica de Diabetes y que aceptaron participar en el estudio y sujetos sanos, se realizó la toma de 21 mL de sangre venosa con al menos 8 horas de ayuno, en la región antecubital. La

muestra se distribuyó de la siguiente manera: 5mL para los EICMST, 3 mL para la citometría hemática, 3 mL el Quantiferon Gold-In plus (Qiagen, Hilden GA), y 5mL para determinación de glucosa en ayuno.

10.2. Realización de la prueba de TST:

Para la realización de esta prueba, se aplicó 0.1 mL de PPD de 5 U (Tubersol, Sanofi-Pasteur, Francia) en la superficie volar del antebrazo derecho mediante la técnica de Mantoux, la lectura de la prueba se realizó de 48-72 hrs con la medida del diámetro mayor de la induración. Se registró la induración en mm y se consideró positiva si fue ≥ 10 mm.

10.3. Aplicación de cuestionario e historia clínica completa:

A todos los individuos se les aplicó un cuestionario previamente estandarizado con la finalidad de conocer la exposición a Tb y factores de riesgo relacionados con la infección, así como el consumo de medicamentos. Así mismo, se realizó una historia clínica completa para identificar signos y síntomas que pudieran relacionarse con Tb, comorbilidades y complicaciones relacionadas con la DM2.

10.4. Telerradiografía de Tórax:

Se realizó una radiografía de tórax en proyección postero-anterior, la cual fue evaluada por los médicos radiólogos del INCMNSZ y se consignaron los hallazgos.

10.5. Ensayos de inhibición del crecimiento micobacteriano en sangre total:

Se realizaron los ensayos de inhibición del crecimiento micobacteriano en sangre total por duplicado de acuerdo con la metodología desarrollada por Robert Wallis en la plataforma BACTEC MGIT/960 (Beckton Dickinson, Sparks, MD, EUA) (51).

Los ensayos se realizaron en las siguientes etapas: cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv para obtener un stock, titulación del stock, conservación del stock y finalmente se realizó el co-cultivo de la micobacteria con sangre completa del paciente.

10.5.1. Cultivo y preparación del stock.

Las cepas de referencia *M. tuberculosis* H37Rv con tres semanas de crecimiento en medio de cultivo Lowestein Jensen (Lab microbiología Clínica, INCMNSZ) se tomaron colonias para preparar una suspensión a concentración de 0.5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL) y se realizó dilución 1:200 con solución salina. Posteriormente, se inocularon 400µL de la cepa diluida en cada uno de los 6 tubos MGIT suplementados con OADC (Becton Dickinson, Sparks MD, EUA), se incubaron en el instrumento BACTEC 960, hasta que el equipo los detectó como positivos, posteriormente se realizó una mezcla del cultivo de todos los tubos MGIT en un tubo estéril de 50mL y se agitó en vortex, posteriormente se prepararon alícuotas de 1200 µL en tubos de crio preservación y se almacenaron a -70 C hasta su uso.

10.5.2. Titulación del stock

Se descongeló una alícuota de 1200 µL de cada cepa y se hicieron diluciones seriadas 1:500, 1:50, 1:5, 1:0.5, 1:0.05 y 1:0.005 con caldo Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson Sparks MD,EUA), de cada dilución se inocularon 500µL en 2 tubos MGIT, se incubaron en el instrumento BACTEC 960 y se registró el TDP en días y horas, el resultado se capturó en un software llamado “WBA workbook versión 13 “diseñado para este propósito por R. Wallis(64), quien lo cedió al laboratorio. Luego, se calculó una curva predicha mediante regresión exponencial y se determinó el volumen requerido del cultivo stock para alcanzar el umbral de crecimiento en 7 días.

10.5.3. Cultivo con sangre completa (co-cultivo)

Se tomó el volumen del inóculo stock para un crecimiento en 7 días y se agregó a un tubo con tapa de rosca (Axygen, NY, EUA) de 2 mL por duplicado para cada tiempo de lectura de incubación (0 y 96 hrs). Los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min, se retiró el sobrenadante, y el paquete celular se suspendió en 300 µL de medio RPMI (Gibco, NY, EUA), se agregaron 300 µL de sangre completa del paciente y se incubó a 37 °C en agitación suave hasta concluir el tiempo de incubación para su cosecha. Se incluyó un cultivo control en cada experimento con el volumen del stock y el medio de cultivo.

10.5.4. Cosecha de micobacterias del co-cultivo

Al concluir el tiempo de incubación (0 y 96 hrs) los tubos se sacaron con su duplicado de la incubadora, se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 min.

Posteriormente, se agregó 1 mL de agua estéril a cada tubo y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min; posteriormente se centrifugaron nuevamente a 10,000 rpm por 10 min, el sobrenadante obtenido se desechó y el paquete celular se suspendió en 500 µL de caldo Middlebrook 7H9 y se inoculó en tubos MGIT; después los tubos se incubaron en el BACTEC 960 y se registró el tiempo de positividad (TDP) en horas y días para ser analizado en el software proporcionado por RW. Se utilizó como control de viabilidad de la cepa, el volumen predeterminado de stock en dos tubos MGIT.

10.5.5. Lectura de los resultados del EICMST

El resultado final de los EICMST se obtuvo mediante el procesamiento de los datos del TDP en el software, el cual da las unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en el cultivo y posteriormente se obtiene el log UFC. La Δ log UFC (cambio de UFC durante el co-cultivo) se calculó de siguiente manera:

$$\Delta \log \text{ UFC} = \log \text{ UFC (final)} - \log \text{ UFC (inicial)}$$

Donde log UFC inicial es el log del número de UFC del cultivo stock inoculado inicialmente y final es el log de UFC obtenido después de la incubación del co-cultivo.

10.5.6 Ensayos de liberación de Interferón- γ

Se realizó la determinación de INF- γ en plasma con el uso del kit Quantiferon TB Gold plus (Qiagen, GmbH, GA), según las instrucciones del fabricante. En resumen, la sangre obtenida de los sujetos participantes, se incubó en cuatro

tubos: tubo mitógeno, tubo Nil y dos tubos con antígenos ESAT-6 y CFP10 específicos de *M. tuberculosis*. Los tubos se incubaron a 37°C por 16 horas, posterior a la incubación, se colectó el plasma y se determinó la producción de interferón gamma (IU/mL) mediante ELISA, según las instrucciones del fabricante. Se consideró como positivo si la respuesta del tubo con antígeno fue $\geq 25\%$ del valor del tubo NIL. El tubo Mitógeno se utilizó como control positivo.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

11.1 Justificación del tamaño de muestra

No existen en la literatura estudios que muestren la dispersión de los datos en los EICMST en las condiciones que plantea el estudio.

11.2 Análisis estadístico

Se realizó un análisis univariado de las características clínicas, sociodemográficas y las asociadas a Tb de los sujetos incluidos. En la tabla 1 se muestran las variables incluidas en este estudio, su definición y la prueba estadística empleada, se consideró estadísticamente significativa una $p \leq 0.05$ para cada prueba.

Variable	Definición nominal	Definición operacional	Tipo de Variable	Prueba estadística utilizada
Sexo	Condición de un organismo que distingue entre masculino y femenino	Femenino: género gramatical, propio de la mujer. Masculino: género gramatical propio del hombre	Independiente	Chi2
Edad	Tiempo cronológico de vida cumplido por la persona	Tiempo de vida en años	Independiente	t de Student
Positividad TST	a Reacción de hipersensibilidad positiva al derivado proteico purificado de Tb	Porcentaje de población positiva a esta prueba	Independiente	Chi2

Positividad IGRA	a	Reacción positiva de células T antígeno específicas a ESAT-6, y CFP10	Porcentaje de población positiva a esta prueba	Independiente	Chi2
Índice de vacunación con BCG	de	Personas que fueron vacunadas con BCG	Porcentaje de personas que fueron vacunadas con BCG	Independiente	t de Student
Δ log UFC		Capacidad inhibitoria contra <i>M. tuberculosis</i> menos el control de cada experimento	Capacidad inhibitoria en UFC/mL	Dependiente	Kruskal Wallis

Tabla1. Variables del estudio. Variables presentes en el estudio, definición y prueba estadística empleada para su análisis.

Posteriormente se realizó un análisis de regresión lineal múltiple para las variables independientes: DM2, edad, sexo, TST positivo con induración de 10mm y la variable dependiente Δ log UFC. La variable Δ log UFC y se analizó como una diferencia de la mediana entre los grupos mediante U de Mann Whitney y la comparación entre más de dos grupos se aplicó la prueba de Kruskal Wallis. Se consideró como significativa una $p \leq 0.05$. El análisis de los datos se realizó en el programa Stata 13 (StataCorp, College Station Tx EUA).

La concordancia entre la prueba de TST e Igra entre los grupos de sujetos sanos y pacientes con DM2 se determinó mediante un análisis kappa con la calculadora disponible en <https://www.bioestadistica.uma.es/analisis/kappa/> , el resultado obtenido se interpretó de acuerdo a los criterios que se muestran en la tabla 2.

Coeficiente Kappa	Fuerza de la concordancia
0.00	Pobre
0.01-0.20	Leve
0.21-0.40	Aceptable
0.41-0.60	Moderada
0.61-0.80	Considerable
0.81-1.00	Casi perfecta

Tabla2.Valoración del coeficiente de correlación Kappa. (Landis y Koch, 1977). Interpretación del coeficiente de correlación Kappa.

12. ASPECTOS ÉTICOS

Debido a que la TST es una prueba de escrutinio rutinario en pacientes considerados con inmunocompromiso en el INCMNSZ, no fue necesario la firma de consentimiento informado, para caracterizar el estatus de TST de los pacientes de la cohorte de la Clínica de Diabetes, sin embargo a todos los sujetos que decidieron participar en el estudio se les explicó detalladamente el propósito de la misma y la prueba no generó costo para el paciente. Una vez explicado detalladamente el propósito del estudio a los pacientes y sujetos sanos se les invitó a participar y se les proporcionó el consentimiento informado en el cual se les solicitó firmar y se les proporcionó una copia del mismo.

El proyecto fue aprobado por el Comité Institucional de Investigación Biomédica en Humanos del INCMNSZ (Clave 952)

13. RESULTADOS

13.1. Participantes en el estudio.

Se reclutaron un total de 133 individuos, los cuales se distribuyeron de la siguiente manera: 43 sujetos sanos, 55 pacientes con DM2 controlados (HbA1c<7%) y 35 pacientes con DM2 no controlados (HbA1c>9%), a todos se aplicó TST y se tomó muestra de sangre para las pruebas IGRAs y EICMST. En los sujetos sanos se encontró 39% de positividad a TST, en los pacientes con DM2 la positividad de IGRAs fue del 43%. Los sujetos con DM2 controlados presentaron mayor antecedente de vacunación con BCG (44%) comparados con los demás grupos (Tabla3).

Variable	Total	Sujetos Sanos	DM tipo 2 controlado	DM tipo 2 no controlado	Valor p*
	N=133	n=43	n=55	n=35	
Hombre	53(39%)	15 (28%)	28 (53%)	10 (19%)	0.06*
Edad (años) (mediana, RIC)		41 (29-64)	60 (29-65)	52 (29-65)	<0.001**
Positivo a TST	59(43%)	23 (39%)	22 (36%)	14 (25%)	0.2594*
Positivo a IGRA	54(40%)	19 (44%)	22 (41%)	11 (37%)	0.556*
Antecedente de vacunación con BCG	86(63%)	24 (28%)	38 (44%)	24 (28%)	0.4549*
Hb1AC% (media, RIC)		NR	6.3(5.8 – 6.6)	10.2(9.6 – 11.0)	<0.001**
H37RVT96-CTRL (Δ log UFC/ml) (media, RIC)		0.7527 (-0.2678 a - 2.098)	1.018(-0.5883 a 2.495)	1.082 (0.685 a 2.333)	0.0399***

* Prueba de Chi cuadrada de Pearson. **Prueba t de Student*** Kruskal Wallis

Tabla 3. Variables analizadas por grupo de estudio. Resultados de las características demográficas, respuesta a TST e IGRAS según el tipo de paciente.

En la Tabla 4 se muestran los resultados de la regresión lineal múltiple en donde se observa correlación leve de DM2 (0.32, IC 0.01-0.63) con inhibición del crecimiento micobacteriano. Este cambio persiste al controlar por confusores como TST+, edad y sexo.

Variable	Coeficiente de asociación	IC 95%		Valor p*
		Límite inferior	Límite superior	
DM2	0.32	0.01	0.63	0.045
Edad	-0.01	-0.03	0.00	0.057
Sexo	-0.19	-0.52	0.13	0.245
TST +	-0.09	-0.36	0.19	0.545

* Regresión lineal ajustada.

Tabla 4. Análisis de regresión lineal múltiple. Resultados de las variables incluidas en la regresión lineal múltiple, en donde se realizó el ajuste de estas variables en el modelo de la inhibición del crecimiento micobacteriano.

En la tabla 5, se describen los resultados concordantes entre las pruebas de TST e IGRA en los dos grupos de estudio sujetos sanos y pacientes con DM2, se observó mayor porcentaje de resultados concordantes TST-/IGRA- en los dos grupos principales del estudio (Kappa = 0.495).

Grupo	Sujetos Sanos (%)	DM2 (%)
TST+/IGRA+	13(30%)	23(25%)
TST+/IGRA-	5(12%)	11(12%)
TST-/IGRA+	5(12%)	11(12%)
TST-/IGRA-	20(46%)	45(51%)
Total	43	90

Tabla5. Grupos de estudio por resultado de pruebas inmunológicas para TB.

Resultados concordantes entre las pruebas de TST e IGRA por grupo de estudio.

13.2. Ensayos de Inhibición del Crecimiento Micobacteriano en Sangre Total.

Se realizó la comparación de los EICMST contra *M. tuberculosis H37Rv* de los 133 sujetos que participaron en el estudio divididos en dos grupos: sujetos sanos (n=43) y pacientes con DM2 (n=90). En la Figura 4, se observa que hubo mejor capacidad de inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis H37Rv* en el grupo de sujetos sanos ($p < 0.05$) (Fig. 4)

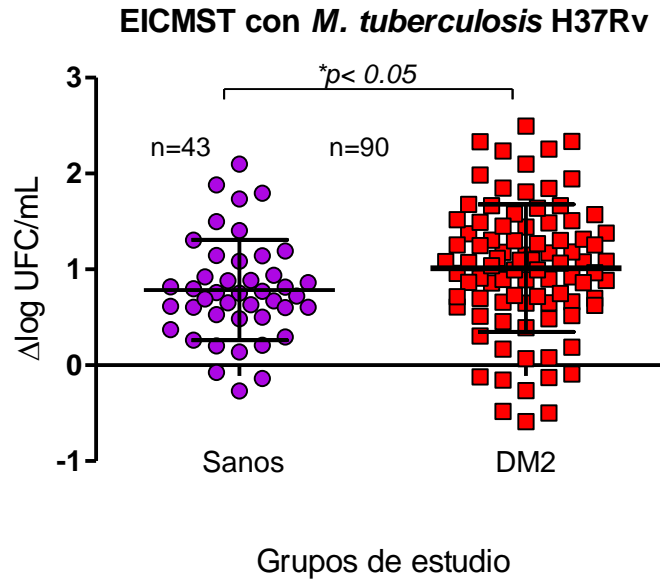


Figura 4. Ensayos de inhibición del crecimiento micobacteriano en sangre total de sujetos sanos vs pacientes con diabetes. Resultados de la capacidad inhibitoria de la sangre de sujetos sanos vs pacientes con DM2 contra la cepa *M. tuberculosis* H37Rv. (U de Mann Whitney)

La comparación de los resultados obtenidos entre los EICMST con *M. tuberculosis* H37Rv de sujetos sanos, vs pacientes con DM2 no controlados y pacientes con DM2 controlados, se observó que los sujetos sanos presentan mayor capacidad inhibitoria en comparación con el grupo de DM2 no controlados ($p < 0.05$), y cuando se compara la capacidad inhibitoria de los sujetos sanos vs los pacientes con DM2 controlados no hubo diferencia entre estos dos grupos ($p > 0.05$) (Fig.5).

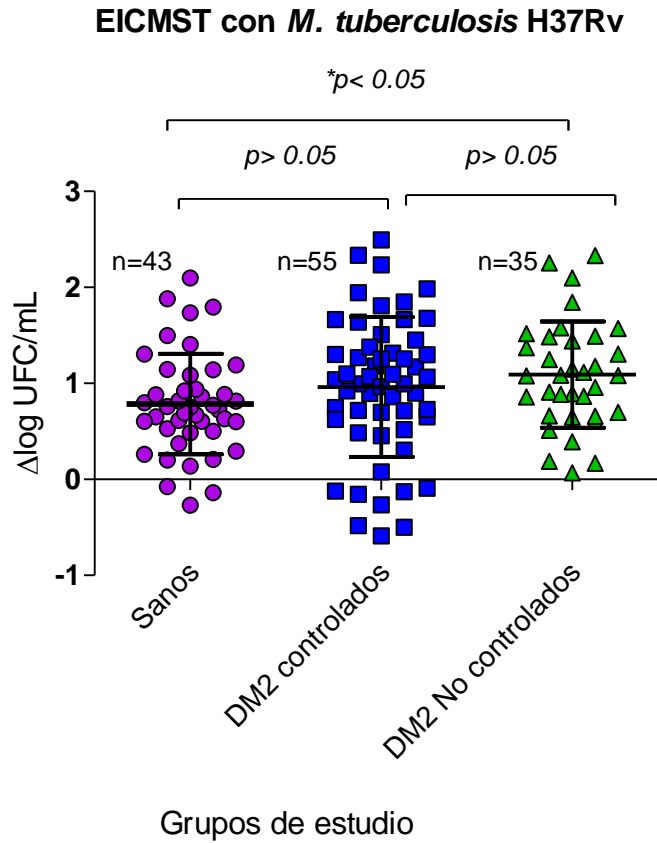


Fig. 5. Ensayos de inhibición del crecimiento micobacteriano en sangre total de cada grupo de estudio. Resultados de la capacidad inhibitoria de la sangre de sujetos sanos, vs pacientes con DM2 controlados y pacientes con DM2 no controlados contra *M. tuberculosis* H37Rv (Kruskal wallis y U de Mann Whitney).

En el gráfico 6 se muestra la comparación de la capacidad inhibitoria de sangre de sujetos sanos, vs pacientes con DM2 controlados y no controlados con TST positivo y *M. tuberculosis* H37Rv. No se observó diferencia en la capacidad inhibitoria entre los grupos ($p=0.5319$).

EICMST con *M. tuberculosis* H37Rv

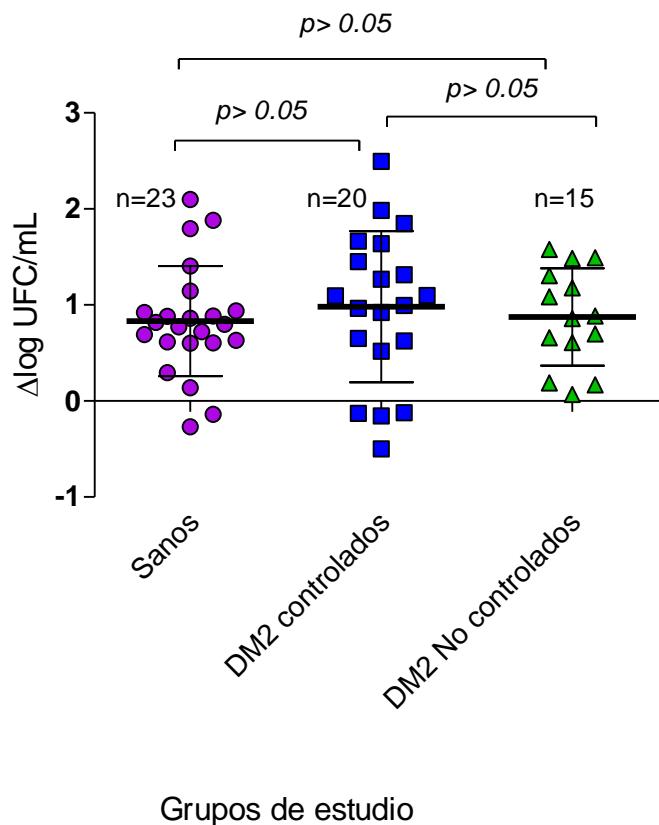


Gráfico 6. Ensayos de inhibición del crecimiento micobacteriano en sangre total de cada grupo de estudio con resultado positivo de TST. Resultados de la capacidad inhibitoria de la sangre de sujetos sanos, vs pacientes con DM2 controlados y pacientes con DM2 no controlados contra *M. tuberculosis* H37Rv. (Kruskal wallis y U de Mann Whitney).

En el gráfico 7 se observa la comparación de la capacidad inhibitoria de la sangre de sujetos sanos, vs pacientes con DM2 controlada y no controlada con TST negativo contra *M. tuberculosis* H37Rv. Se observó que el grupo de sujetos sanos tiene mayor capacidad de inhibir el crecimiento de la cepa comparado con

el grupo de sujetos no controlados ($p=0.0013$). No se observó diferencia entre la comparación del grupo de sujetos sanos con los pacientes controlados ($p=0.1229$). Cuando se realizó la comparación entre los grupos de pacientes con diabetes controlados y no controlados, no se observó diferencia en la capacidad inhibitoria ($p=0.0588$).

EICMST con *M. tuberculosis* H37Rv

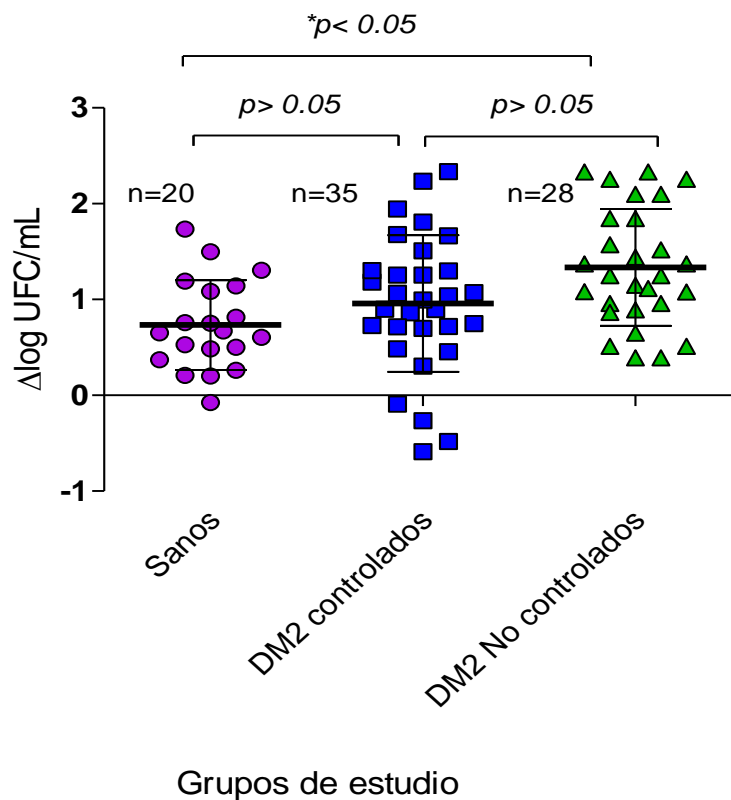


Gráfico 7. Ensayos de inhibición del crecimiento micobacteriano en sangre total de cada grupo de estudio con resultado negativo a TST. Resultados de la capacidad inhibitoria de la sangre de sujetos sanos, pacientes con DM2 controlados y no controlados contra la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv. (Kruskal wallis y U de Mann Whitney)

14. DISCUSIÓN.

El objetivo principal del estudio fue comparar la inhibición del crecimiento micobacteriano de la sangre total de pacientes con DM2 y sujetos sanos. Los resultados mostraron que efectivamente los sujetos sanos presentaron mejor capacidad de inhibición que los pacientes con DM2 contra la cepa *M. tuberculosis* H37Rv.

En los EICMST se determinó la capacidad de inhibición del crecimiento micobacteriano en sangre total de sujetos sanos, pacientes con DM2 controlados, DM2 no controlados contra *M. tuberculosis* H37Rv. Los resultados obtenidos mostraron que los sujetos sanos poseen una mejor capacidad para inhibir *M. tuberculosis* H37Rv en comparación con el grupo de pacientes con DM2. Estos experimentos demostraron que los pacientes con DM2 no controlados presentan un aumento en la alteración de la respuesta inmune que los hace incapaces de inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis*. A este respecto Martínez N y Kornfeld H₍₃₅₎ describieron que en los sujetos con DM2 se disminuye la fagocitosis, se retrasa el reclutamiento de macrófagos y células dendríticas, disminuye la respuesta de TH1 y quimiocinas (CCL5,CCL2), lo que explica la deficiencia de la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*.

En los pacientes con DM2 controlados se observó que existe tendencia a tener mayor capacidad inhibitoria comparada con la de los pacientes con DM2 no controlados. Estos resultados son apoyados por el estudio de Chen YC y cols., quienes describieron, que los pacientes con DM2 no controlados (Hb1Ac>9%) tienen mayor riesgo de desarrollar TBPA (OR=3.55) y el descontrol glucémico se

asocia con falla a tratamiento antituberculosis, mientras que con el control glucémico se puede reducir el riesgo de desarrollar Tb en sujetos con DM2 (59).

Los resultados de los EICMST en sujetos sanos, vs pacientes con DM2 controlados y no controlados con TST positiva en presencia de *M. tuberculosis* H37Rv, se observó que no existe diferencia en la capacidad de inhibir el crecimiento de la micobacteria en los tres grupos, pero cuando se compararon los EICMST de sujetos sanos, vs pacientes con DM2 controlados y no controlados con TST negativa, se observó que los sujetos sanos tienen mayor capacidad de inhibir el crecimiento de la micobacteria en comparación con los pacientes con DM2 no controlados. Resultados semejantes fueron reportados por Simone J y Cols.,(64) quienes compararon la capacidad inhibitoria de PBMC de sujetos sanos, sujetos que tuvieron contacto reciente con Tb, sujetos con TBL y sujetos con TBPA en presencia de *M. bovis* BCG con un protocolo semejante al realizado en nuestro estudio, (descrito por R. Wallis) (51) mostraron que los sujetos con reciente exposición a Tb tiene una mejor capacidad de inhibir el crecimiento de la micobacteria en comparación con los sujetos sanos, sujetos con TBL y sujetos con TBPA, probablemente porque los sujetos recientemente expuestos a Tb presentan un subtipo de monocitos no clásicos CD14dim productores de altos niveles de CXCL9, CXCL10 y CXCL11, las cuales se describen como marcadores de inmunidad entrenada contra Tb, lo que les permite tener una mejor capacidad inhibitoria contra la micobacteria (64).

Los EICMST realizados en esta investigación fue con la cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv en comparación con la mayoría de los estudios encontrados

en la literatura, que han utilizado la cepa atenuada *M. bovis* BCG. Actualmente, en la literatura existen discrepancias con el uso de cualquiera de las cepas, *M. bovis* BCG o *M. tuberculosis* H37Rv en los EICMST. Baguma R y cols., (59) evaluaron los EICMST con las cepas *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG en sujetos sanos de Sudáfrica, país con alta carga de Tb, además determinaron la respuesta inmune innata. Encontraron que no hubo diferencia en la inhibición del crecimiento con las dos cepas probadas, ni con la respuesta innata, por ello propusieron que la alta carga ambiental de Tb favoreció la inhibición del crecimiento micobacteriano. En contraste Seon-Hee C y cols.,(60) realizaron EICMST, con la misma metodología empleada en nuestro estudio, para evaluar el equilibrio entre la inmunidad y la virulencia de las cepas que probaron, utilizaron *M. tuberculosis* H37Rv, un aislado clínico de *M. tuberculosis* y las cepas avirulentas *M. tuberculosis* H37Ra y *M. bovis* BCG en sangre de sujetos sanos con TST negativa. Ellos encontraron que la sangre completa de los sujetos del estudio, fue capaz de inhibir mejor el crecimiento de la cepa *M. tuberculosis* H37Ra (0.14 log₁₀ UFC/mL), que *M. tuberculosis* H37Rv (0.43 log₁₀ UFC/mL) y el aislado clínico de *M. tuberculosis* (1.04 log₁₀ UFC/mL). Sin embargo, con *M. bovis* BCG la inhibición bacteriana fue del 50%.

La diferencia entre los resultados de los EICMST con las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG podría deberse a que *M. tuberculosis* H37Rv posee mecanismos de virulencia, mientras que *M. bovis* BCG es una cepa atenuada, que carece de la región de diferenciación RD1. Esta posibilidad se sustenta en estudios en ratones, en donde la cepa *M. bovis* BCG fue complementada con la

región RD1 y se observó aumento en su persistencia y replicación en pulmón, hígado y bazo. La región RD1 juega un papel importante en los factores de virulencia de la cepa durante la infección (61).

Actualmente, existen estudios sobre los EICMST en donde se puede utilizar sangre completa o PBMC (54-57). Flecher HA y cols., informaron que existe menor variabilidad biológica cuando se realizan los ensayos de inhibición micobacteriana con células mononucleares (EICMCMN), debido a que se tiene mayor control de las condiciones experimentales para obtener menor variabilidad en los resultados. Sin embargo, es necesario realizar más estudios con estas condiciones experimentales para confirmar si es mejor el uso de PBMC.

Por otro lado, realizamos las pruebas de TST e IGRA a todos los sujetos reclutados en el estudio y observamos que el 48%(65/133) del total de los sujetos presentaron ambas pruebas negativas y 28% (36/133) presentaron ambas pruebas positivas. Así mismo, encontramos discrepancias entre el porcentaje de TST e IGRA positivos en los grupos de estudio. La concordancia entre ambas pruebas fue moderada ($\kappa = 0.543$).

Estos resultados difieren con los reportados por Dagnev A y cols(56) en Etiopía, país con alta carga de Tb y esquema de vacunación de BCG al nacer. El estudio en Etiopía se realizó en 107 estudiantes sanos e informaron que el 46% presentó TST positiva y un 44% IGRA positiva. La concordancia entre ambas pruebas fue alta ($\kappa=0.83$). Sin embargo, Oren E y cols.,(57) al igual que nosotros reportaron muchas discrepancias entre las dos pruebas ($\kappa = 0.37$). Con estos resultados se observa que el IGRA y TST son pruebas altamente variables.

Aunque se desconoce realmente la razón de la variabilidad de IGRA y TST, algunos de los factores descritos que podrían estar afectando el resultado son: la edad, la raza, el estatus de vacunación con BCG, enfermedades y tratamiento que deprimen la respuesta inmune, la prevalencia de Tb en la región y por lo tanto la exposición al agente causal, el estado de infección y de manera importante la variabilidad per se entre individuos, lo que complica la interpretación de las pruebas.

En otro estudio llevado a cabo en un área con alta prevalencia de Tb, que tuvo por objetivo analizar los factores asociados a discordancias entre las pruebas de TST e IGRA entre contactos de pacientes con TBPA, se observó un 76% de concordancia entre pruebas y 24% de discordancias; 72% tuvieron TST+/IGRA- y 28% TST-/IGRA+, en los grupos TST+/IGRA- y TST+/IGRA+ se encontraron cicatrices pulmonares viejas, mientras que en el grupo TST-/IGRA+ presentaron periodos más prolongados de exposición a contactos con TBPA. Por lo que concluyen que el resultado de la prueba de TST es más adecuado para tomar la decisión de dar tratamiento a individuos con infección latente, en áreas con alta prevalencia de Tb (65).

15. CONCLUSIONES.

- a. Se observó correlación de la DM2 con la inhibición del crecimiento micobacteriano, independiente de la TST+, edad y sexo.
- b. Los sujetos sanos inhiben mejor que los pacientes con DM 2.
- c. Los pacientes con DM 2 tienen menor capacidad para inhibir *Mycobacterium tuberculosis* y se hace más evidente en los sujetos con DM2 no controlados.
- d. Los EICMST pueden ser utilizados de forma personalizada para cada paciente y conocer su respuesta inmune contra *M. tuberculosis*.
- e. Las pruebas TST/IGRA tuvieron concordancia moderada, por ello, el resultado deberá ser evaluado en base a las características clínicas y radiológicas del paciente.
- f. Las pruebas TST/IGRA, por su variabilidad no pueden ser utilizadas como diagnósticas de TBL o TBPA.

16. BIBLIOGRAFIA.

1. World Health Organization. (2018). Global tuberculosis report. [online] Available at: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ [Accessed 3 May. 2018].
2. Jeon CY, Murray MB. Diabetes Mellitus Increases the Risk of Active Tuberculosis: A Systematic Review of 13 Observational Studies. *PLoS Medicine*. 2008;5(7):e152.
3. Stevenson CR, Critchley JA, Forouhi NG, Roglic G, Williams BG, Dye C, et al. Diabetes and the risk of tuberculosis: a neglected threat to public health? *Chronic Illness*. 2007;3(3):228-45.
4. Baker MA, Harries AD, Jeon CY, Hart JE, Kapur A, Lönnroth K, et al. The impact of diabetes on tuberculosis treatment outcomes: A systematic review. *BMC Medicine*. 2011;9:81-.
5. Lönnroth K, Roglic G, Harries AD. Improving tuberculosis prevention and care through addressing the global diabetes epidemic: from evidence to policy and practice. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2014;2(9):730-9.
6. International Diabetes Federation.(2017). *IDF Diabetes Atlas*, eight ed.[online] Available at: <http://www.diabetesatlas.org/> [Accessed 3 May.2018].
7. Kumar, V. and S.L. Robbins, *Robbins basic pathology*. 8th ed2007, Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier.XIV,946p.

8. Ahmad S. Pathogenesis, Immunology, and Diagnosis of Latent Mycobacterium tuberculosis Infection %J Clinical and Developmental Immunology. 2011;2011:17.
9. Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. The Lancet. 2003;362(9387):887-99.
10. Tufariello JM, Chan J, Flynn JL. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. The Lancet Infectious Diseases. 2003;3(9):578-90.
11. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MPR. The Immune Response in Tuberculosis. Annual Review of Immunology. 2013;31(1):475-527.
12. Miranda C, Tomford JW, Gordon SM. Interferon-gamma-release assays: Better than tuberculin skin testing?. Cleve Clin J Med.2002. (77): 606-611.
13. Gideon HP, Flynn JL. Latent tuberculosis: what the host "sees"? Immunologic research. 2011;50(3):202-2012.
14. Diabetes. 2017. Fact sheet Number 312.: World Health Organization.
15. DeFronzo RA, Ferrannini E, Gropp L, et al. Type 2 diabetes mellitus.
16. Federación Mexicana de Diabetes.(2018).Diabetes en México. [online] Available at: <http://fmdiabetes.org/diabetes-en-mexico/> . [Accessed 12 Jan.2018]
17. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Reporte global. [online] Available at: http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/muertos2017_Nal.pdf . [Accessed 17 Jan 2018]

18. Soto-Estrada G, Moreno-Altamirano L, Pádua Díaz D. Panorama epidemiológico de México, principales causas de morbilidad y mortalidad %J Revista de la Facultad de Medicina (México). 2016;59:8-22
19. Dobler CC, Flack JR, Marks GB. Risk of tuberculosis among people with diabetes mellitus: an Australian nationwide cohort study. *BMJ open*. 2012;2(1):e000666-e.
20. Kim SJ, Hong YP, Lew WJ, Yang SC, Lee EG. Incidence of pulmonary tuberculosis among diabetics. *Tubercle and Lung Disease*. 1995;76 (6):529-33.
21. John GT, Shankar V, Abraham AM, Mukundan U, Thomas PP, Jacob CK. Risk factors for post-transplant tuberculosis. *Kidney International*. 2001;60(3):1148-53.
22. Leung CC, Lam TH, Chan WM, Yew WW, Ho KS, Leung GM, et al. Diabetic Control and Risk of Tuberculosis: A Cohort Study. *American Journal of Epidemiology*. 2008;167(12):1486-94.
23. Goldhaber-Fiebert JD, Jeon CY, Cohen T, Murray MB. Diabetes mellitus and tuberculosis in countries with high tuberculosis burdens: individual risks and social determinants. *International Journal of Epidemiology*. 2011;40(2):417-28.
24. Ponce-de-Leon A, García-García MdL, García-Sancho MC, Gómez-Pérez FJ, Valdespino-Gómez JL, Olaiz-Fernández G, et al. Tuberculosis and Diabetes in Southern Mexico. 2004;27(7):1584-90.
25. Sanghani RN, Udawadia ZF. The association of diabetes and tuberculosis: impact on treatment and post-treatment outcomes. 2013;68(3):202-3.

26. Ottmani SE, Murray MB, Jeon CY, Baker MA, Kapur A, Lönnroth K, et al. Consultation meeting on tuberculosis and diabetes mellitus: meeting summary and recommendations [Meeting report]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2010;14(12):1513-7.
27. Delgado-Sánchez G, García-García L, Castellanos-Joya M, Cruz-Hervert P, Ferreyra-Reyes L, Ferreira-Guerrero E, et al. Association of Pulmonary Tuberculosis and Diabetes in Mexico: Analysis of the National Tuberculosis Registry 2000-2012. *PloS one*. 2015;10(6):e0129312-e.
28. Martens GW, Arikan MC, Lee J, Ren F, Greiner D, Kornfeld H. Tuberculosis Susceptibility of Diabetic Mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2007;37(5):518-24.
29. Vallerskog T, Martens GW, Kornfeld H. Diabetic mice display a delayed adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;184(11):6275-82.
30. Yamashiro S, Kawakami K, Uezu K, Kinjo T, Miyagi K, Nakamura K, et al. Lower expression of Th1-related cytokines and inducible nitric oxide synthase in mice with streptozotocin-induced diabetes mellitus infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical and experimental immunology*. 2005;139(1):57-64. Stalenhoef JE, Alisjahbana B, Nelwan EJ, van der Ven-Jongekrijg J, Ottenhoff TH, et al. The role of interferon-gamma in the increased tuberculosis risk in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008. 27: 97-103.
31. Restrepo BI, Fisher-Hoch SP, Pino PA, Salinas A, Rahbar MH, Mora F, et al. Tuberculosis in poorly controlled type 2 diabetes: altered cytokine

- expression in peripheral white blood cells. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2008;47(5):634-41.
32. Barry CE, 3rd, Boshoff HI, Dartois V, Dick T, Ehrt S, Flynn J, et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nature reviews Microbiology.* 2009;7(12):845-55.
33. Ahmad S. Pathogenesis, Immunology, and Diagnosis of Latent Mycobacterium tuberculosis Infection %J *Clinical and Developmental Immunology.* 2011;2011:17.
34. Martinez N, Kornfeld H. Diabetes and immunity to tuberculosis. *European journal of immunology.* 2014;44(3):617-26.
35. Vallerskog T, Martens GW, Kornfeld H. Diabetic mice display a delayed adaptive immune response to Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol.*2010.184: 6275-82.
36. Parkash O, Singh BP, Pai M. Regions of differences encoded antigens as targets for immunodiagnosis of tuberculosis in humans. *Scand J Immunol.*2009. 70: 345-57
37. Rangaka MX, Wilkinson KA, Glynn JR, Ling D, Menzies D, et al. Predictive value of interferon-gamma release assays for incident active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.*2011.35.165-80.
38. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, et al. The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2013. 31: 475-527.
39. Gordin FM, Masur H. Current approaches to tuberculosis in the United States. *JAMA.*2012. 308: 283-289.

40. Pai M, Riley LW, Colford JM, Jr. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2004. 4: 761-776.
41. Kampmann B, Tena GN, Mzazi S, Eley B, Young DB, et al. Novel human in vitro system for evaluating antimycobacterial vaccines. *Infect Immun.* 2004. 72: 6401-6407.
42. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010. 87: 4-14.
43. Hoft DF, Worku S, Kampmann B, Whalen CC, Ellner JJ, et al. Investigation of the relationships between immune-mediated inhibition of mycobacterial growth and other potential surrogate markers of protective *Mycobacterium tuberculosis* immunity. *J Infect Dis.* 2002. 186: 1448-1457.
44. Tena GN, Young DB, Eley B, Henderson H, Nicol MP, et al. Failure to control growth of mycobacteria in blood from children infected with human immunodeficiency virus and its relationship to T cell function. *J Infect Dis.* 2003. 187: 1544-1551.
45. Kampmann B, Gaora PO, Snewin VA, Gares MP, Young DB, et al. Evaluation of human antimycobacterial immunity using recombinant reporter mycobacteria. *J Infect Dis.* 2000. 182: 895-901.
46. Saliu OY, Sofer C, Stein DS, Schwander SK, Wallis RS. Tumor-necrosis-factor blockers: differential effects on mycobacterial immunity. *J Infect Dis.* 2006. 194: 486-492.

47. Wallis RS, Wang C, Doherty TM, Onyebujoh P, Vahedi M, et al. Biomarkers for tuberculosis disease activity, cure, and relapse. *Lancet Infect Dis.*2010. 10: 68-69.
48. Walzl G, Ronacher K, Hanekom W, Scriba TJ, Zumla A. Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nat Rev Immunol.*2011. 11: 343-354
49. Cheon SH, Kampmann B, Hise AG, Phillips M, Song HY, et al. Bactericidal activity in whole blood as a potential surrogate marker of immunity after vaccination against tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol.*2002. 9: 901-907.
50. Wallis RS, Jakubiec W, Mitton-Fry M, Ladutko L, Campbell S, et al. Rapid evaluation in whole blood culture of regimens for XDR-TB containing PNU-100480 (sutezolid), TMC207, PA-824, SQ109, and pyrazinamide. *PLoS One.*2012. 7: e30479.
51. Wallis RS, Jakubiec WM, Kumar V, Silvia AM, Paige D, et al. Pharmacokinetics and whole-blood bactericidal activity against *Mycobacterium tuberculosis* of single doses of PNU-100480 in healthy volunteers. *J Infect Dis.*2010. 202: 745-751.
52. Wallis RS, Vinhas S, Janulionis E. Strain specificity of antimycobacterial immunity in whole blood culture after cure of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).*2009. 89: 221-224.
53. Wallis RS, Vinhas SA, Johnson JL, Ribeiro FC, Palaci M, et al. Whole blood bactericidal activity during treatment of pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis.*2003.187: 270-278.

54. Flecher HA, Tanner R, Wallis RS, et al. Inhibition of Mycobacterial Growth In vitro following primary but Not Secondary Vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG. *Clinical and Vaccine Immunology*.2013.20:1683-1689.
55. Dagneu Alemnew, Jemal Hussein, et al. Diagnosis of latent tuberculosis infection in healthy young adults in a country with high tuberculosis burden and BCG vaccination at birth. *BMC Research Notes* .2012, 5:415.
56. Oren Eyal, Alatorre Grabierla, et al. Interferon gamma-based detection of latent tuberculosis infection in the border states of Nuevo Leon and Tamaulipas, Mexico. *Frontiers in Public Health*. 2015.3:220-226.
57. Diel R, Goletti D, et al. Interferon- γ release assays for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2011; 37: 88–99.
58. Chiang CY, Bai KJ, Lin HH, et al. The Influence of Diabetes, Glycemic Control, and Diabetes-Related Comorbidities on Pulmonary Tuberculosis. *PLoS ONE*.2015 .10(3): e0121698.
59. Baguma R, Penn-Nicholson A. Application of a whole blood mycobacterial growth inhibition assay to study immunity against *Mycobacterium tuberculosis* in a high tuberculosis burden population. *PLoS ONE*.2017. 12(9): e0184563
60. Seon-Hee C, Beate K, et al. Bactericidal Activity in Whole Blood as a Potential Surrogate Marker of Immunity after Vaccination against Tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2002. 9:901-907.

61. Pym, A. S., Brodin, P., Brosch, R, et al, S. T. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Molecular Microbiology*, 2002. 46: 709–717
62. Brenna M, Tanner R, et al. The Cross-Species Mycobacterial Growth Inhibition Assay(MGIA) Project, 2010-2014. *Clinical and Vaccine Immunology*.2017.24:1-13
63. Wallis RS. Chapter 22: Assessment of Whole-Blood Bactericidal Activity in the Evaluation of New Antituberculosis Drugs..
64. Simone AJ, Kristal M, et al. Mycobacterial growth inhibition is associated with trained innate immunity. *J Clin Invest*. 2018;128(5):1837-1851
65. Machado A Jr, et al. Analysis of discordance between the tuberculin skin test and the interferon-gamma release assay. *Int J. Tuberc Lung Dis*.2009.13(4):446-53.