



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS ODONTOLÓGICAS Y DE LA
SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

**“Comparación de la Actividad Bacteriostática en Sangre Completa contra
Mycobacterium tuberculosis y *M. bovis* BCG en individuos sanos con
combinaciones discordantes de Prueba Cutánea de Tuberculina y Ensayos
de Liberación de Interferón- γ ”**

MODALIDAD DE GRADUACIÓN: TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA

PEDRO TORRES GONZÁLEZ

TUTOR

DR. JOSÉ SIFUENTES OSORNIO

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO 2016



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.

Responsable de la entidad academica

Dr. Carlos Alberto Aguilar Salinas

Tutor

Dr. José Sifuentes Osornio

Alumno

Pedro Torres González

INDICE

	Pàgina
Resumen	4
Marco teòric	6
Introducció	6
Antecedents	7
Planteamiento del problema	29
Justificació	29
Pregunta de investigació, hipòtesis	30
Objetivos	30
Metodos	31
Diseño del estudio	31
Justificació del tamaño de muestra	31
Lugar y población de estudio	31
Grupos de estudio	32
Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	32
Estrategia de cegamiento	33
Metodología	33
Análisis estadístico	37
Aspectos éticos	37
Resultados	38
Discusión	53
Conclusiones	58
Bibliografía	60

Resumen.

Comparación de la Actividad Bacterioestática en Sangre Completa contra *Mycobacterium tuberculosis* y *M. bovis* BCG en individuos sanos con combinaciones discordantes de Prueba Cutánea de Tuberculina y Ensayos de Liberación de Interferón-gamma

La tuberculosis (TB) es la principal causa de muerte debido a un agente bacteriano. La mayoría de los individuos infectados permanecen asintomáticos a lo cual se denomina tuberculosis latente (TBL). En la actualidad la prueba cutánea de tuberculina (TST) y los ensayos de liberación de interferón-gamma (IGRA) permiten conocer la exposición de los individuos a TB y definir TBL. Sin embargo, estas pruebas con frecuencia son discordantes entre estas pruebas. Los ensayos de actividad bacterioestática en sangre total (EBAST) han sido utilizados para caracterizar la actividad bactericida (AB) deficiente en poblaciones inmunocomprometidas y establecer la eficacia de diferentes vacunas en experimentación.

Objetivos: Principal; comparar la AB mediante EBAST con las cepas *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis* H37Rv entre sujetos jóvenes, sanos, con antecedente de vacunación con BCG y sin exposición conocida a TB que presenten diferentes combinaciones de TST e IGRA. Secundarios; comparar la concentración de citocinas basales y en el sobrenadante del co-cultivo (IL-17 A, IFN-gamma, TNF-alfa, IL-4, IL-10, IL-6 e IL-2).

Resultados: Se conformaron los siguientes grupos de estudio: 5 sujetos TST \geq 15 mm (+)/IGRA+, 5 TST (+)/IGRA(-), 5 TST \leq 5 mm (-)/IGRA(+) y 19 TST(-)/IGRA(-). Cepa *M. tuberculosis* H37Rv: la mediana del log/UFC al tiempo 96 hr-control de crecimiento fue 1.37 log UFC (RIC 1.19-1.38) en los TST+/IGRA+, 0.72 log UFC (RIC 0.51-0.94) en los TST+/IGRA-, 0.26 log UFC (RIC 0.208-1.14) en los TST-/IGRA+ y 1.06 log UFC (RIC

0.409-1.34) en los TST-/IGRA- ($p=0.170$). La mediana de la concentración de TNF-alfa fue 16.9 pg/mL (RIC 14.09-21.6) en los TST+/IGRA+ y de 8.2 pg/mL (RIC 7.2-11.2) en TST+/IGRA- (p - corregida <0.05). Cepa *M. bovis* BCG: la mediana del log UFC al tiempo 96 hr-control de crecimiento 0.43 log UFC (RIC 0.36-0.84) en los sujetos TST+/IGRA+, 0.38 log UFC (RIC -0.15-0.45) en los TST+/IGRA-, 0.52 log UFC (RIC-0.05-0.80) en los TST-/IGRA+ y 0.35 log UFC (RIC 0.009-0.71) en los TST-/IGRA- ($p=0.750$) IL-17 A en el grupo TST+/IGRA- fue 36.2 pg/mL (RIC 33.4- 37.5) y 61.9 pg/mL (RIC 48.08- 83.6) en el grupo TST-/IGRA- (p - corregida <0.05)

Conclusión: Las discrepancias entre TST e IGRA indican parecen indicar diferentes inmunofenotipos en el espectro de la TBL. Existe una mejor AB en los sujetos TST-/IGRA+.

Título: Comparación de la Actividad Bacterioestática en Sangre Completa contra *Mycobacterium tuberculosis* y *M. bovis* BCG en individuos sanos con combinaciones discordantes de Prueba Cutánea de Tuberculina y Ensayos de Liberación de Interferón- γ

RESULTADOS PRELIMINARES

MARCO TEORICO

INTRODUCCIÓN

M. tuberculosis, el agente causal de la tuberculosis (TB), es considerado el patógeno más exitoso en la historia de la humanidad. La TB es en la actualidad una amenaza para la salud mundial y la principal causa de muerte debido a un agente bacteriano. La gran mayoría de los individuos infectados permanecen asintomáticos a lo cual se denomina tuberculosis latente (TBL). Se estima que una tercera parte de la población mundial se clasifica con esta definición y que cerca del 10% presentará la enfermedad (tuberculosis activa: TBA) en algún momento de su vida, contagiando a otros individuos que a su vez permanecerán asintomáticos por un tiempo indeterminado por tanto, perpetuando así el reservorio de la enfermedad. En la actualidad existen dos tipos de pruebas que permiten conocer la exposición de los individuos a TB y que definen a la TBL en ausencia de síntomas: la prueba cutánea de tuberculina (*Tuberculin Skin Test: TST*) y los ensayos de liberación de interferón- γ (*Interferon- γ release assays: IGRA*). Sin embargo, estas pruebas no predicen quien presentará la enfermedad y con frecuencia se observan resultados discordantes entre estas pruebas, lo cual imposibilita administrar un tratamiento preventivo. En ausencia de medidas de control efectivas para la TB, el mejor conocimiento de la TBL y los factores que determinan eficacia de la

respuesta inmune en contra de *M. tuberculosis* es considerada una prioridad de investigación.

ANTECEDENTES

La TB es considerada una emergencia mundial desde 1994 y actualmente es la principal causa de muerte ocasionada por un agente infeccioso único. (1) En el reporte 2009 de la Organización Mundial de la Salud se estimó que una tercera parte de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis*, y que es causa de enfermedad en 9.3 millones de personas al año con una mortalidad de 1.8 millones.(2) En México, la incidencia estimada de TB, es de 21 casos por cada 100 mil habitantes y al igual que en la mayoría de los países en desarrollo, la estrategia para el control de esta enfermedad depende del diagnóstico y tratamiento tempranos TBA, el estadio transmisible de la enfermedad. (3)

Transmisión de la Tuberculosis

La fuente más importante de transmisión de la TB son los pacientes con TB pulmonar (TBP), lo cuales expectoran partículas de 1-5 μm que contienen al bacilo las cuales son inhaladas por individuos cercanos a estos enfermos. Estas partículas infectantes, se alojan en los alveolos en donde el bacilo *M. tuberculosis* es fagocitado por los macrófagos alveolares, quienes invaden el epitelio subyacente y ocasionan una respuesta inflamatoria local que resulta en el reclutamiento de otras células mononucleares de los capilares cercanos.(4, 5) Lo anterior, proporciona nuevas células susceptibles de ser infectadas y favorece el incremento la población bacteriana y permite al patógeno cruzar la barrera alveolar. (4, 6)

La inmensa mayoría de los individuos infectados por *M. tuberculosis*, desarrollan una respuesta inmune celular efectiva 2-8 semanas después del contagio, con lo cual se detiene la multiplicación del bacilo.(4) Los linfocitos T activados, macrófagos y otras células del sistema inmune forman granulomas que cercan el tejido necrótico limitando la replicación y diseminación del bacilo. Durante este proceso, la mayoría de las micobacterias son eliminadas y se detiene el progreso de la enfermedad.(7) Sin embargo, la capacidad de erradicar completamente al patógeno presenta una 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 (TBL).(7) El balance entre la inmunidad del hospedero y la multiplicación del bacilo determinan alguno de los siguientes desenlaces de la infección: 1) una minoría de la población desarrolla rápidamente TBA primaria con síntomas clínicos poco tiempo después del contagio, 2) la mayoría de las personas infectadas no muestran signos de enfermedad y adquieren inmunidad efectiva, los considerados como TBL, 3) y finalmente una proporción de los individuos con TBL se reactivan años después y desarrollan TBA post-primaria.(8, 9)

Inmunología de la Tuberculosis Latente

Estudios en modelos animales y en seres humanos han demostrado que una amplia gama de componentes del sistema inmune contribuyen a una respuesta inmune efectiva en contra de *M. tuberculosis*. Estos incluyen, además de macrófagos y células dendríticas, células T $\alpha\beta$ (ambas CD4+ y CD8+), células T citotóxicas así como las citocinas producidas por estas células. (9)

Células T cooperadoras

La respuesta inmune mediada por células T inicia posterior de la diseminación de *M. tuberculosis* a los linfonodos.(10) Posterior a la activación y expansión de las células T antígeno específicas, estas migran a los pulmones en donde se encuentran con otros leucocitos y forman parte de los granulomas. Diferentes tipos de células T cooperadoras (Th1, Th2, Th17 y T reguladoras) se encuentran presentes en el sitio de infección. (11) Sin embargo, el subtipo Th1 se ha asociado tradicionalmente a la contención del crecimiento y diseminación de *M. tuberculosis*. (8, 11)

Citocinas pro-inflamatorias

El reconocimiento de *M. tuberculosis* por las células fagocíticas conduce a la activación de macrófagos y a la producción de citocinas, lo cual a su vez amplifica la activación y la producción de citocinas en un proceso complejo de regulación y contra-regulación. Esta red de citocinas juega un papel crucial en la respuesta inflamatoria y el desenlace de las infecciones ocasionadas por micobacterias. (8)

Interferón- γ : IFN- γ es la principal citocina del perfil Th1, esta estimula las propiedades microbicidas de los macrófagos debido a que activa vías de señalización incluyendo la óxido nítrico sintasa (iNOS) e induce el proceso de acidificación-maduración de los fagosomas y la autofagia. (12, 13) La principal fuente de IFN- γ son las células T CD4+, las cuales son consideradas las responsables del control de la infección por *M. tuberculosis*. (14) Otras fuentes de estas citocinas son las células T CD8+, las células NK, las células $\gamma\delta$ entre otras. Sin embargo ninguna de estas puede compensar la ausencia de las células T CD4+. (8) La importancia de IFN- γ ha sido investigada

ampliamente en modelos humanos y animales. En modelos de ratón, el knockout (KO) del gen de IFN- γ en ratones infectados por vía intravenosa o mediante aerosoles con *M. Tuberculosis*, se demostró una mayor destrucción tisular, altas cargas bacterianas, diseminación hacia diferentes órganos y en algunos casos cuadros fulminantes.(15) En este mismo modelo, se demostró una expresión baja o indetectable del gene de la enzima iNOS así como niveles séricos disminuidos de intermediarios reactivos de nitrógeno los cuales, son esenciales para la destrucción intracelular de las micobacterias.(16) A pesar de la importancia de IFN- γ en la respuesta inmune contra TB, otros estudios han demostrado que la producción de esta citocina no es suficiente para prevenir TBA. Lo anterior ha sido demostrado en modelos de ratón KO para TNF- α , IL-1 e IL-6 en donde los animales mueren rápidamente después de ser infectados con *M. tuberculosis*. (17)

El papel protector de la vía IFN- γ en contra de la infección contra *M. tuberculosis* también se ha estudiado en niños con mutaciones en el gene del receptor tipo 1 de IFN- γ los cuales, desarrollan infecciones severas por micobacterias no patógenas. (18) Asimismo, diversos estudios también han demostrado que las células periféricas mononucleares (PBMCs) de los pacientes con TBA secretan niveles más bajos de IFN- γ *in vitro*. Lo anterior sugiere que existen otras vías que son esenciales para el control de la infección. (11)

En el contexto de la TBL, en un modelo paucibacilar de TBL, la neutralización de IFN- γ resultó en un incremento sostenido en la cantidad de bacilos en los pulmones lo cual apoya el papel de esta citocina en el mantenimiento del estado latente.(4) En humanos, se ha observado que sujetos con TBL tienen 15 veces mayor proporción de células T CD4+ IFN- γ + IL-2+ con fenotipo de memoria central y efectora que los sujetos con TBA

en los cuales predominan las células T CD4+ multifuncionales con fenotipo de memoria efectora.(19) Sin embargo, a pesar de que el IFN- γ es esencial en la respuesta inmune en contra de TB, la mayoría de los estudios en humanos han encontrado una pobre correlación de los niveles de esta citocina y protección contra TB.(20)

Factor de Necrosis Tumoral - α : El TNF- α es producido principalmente por macrófagos, células dendríticas y por células T. Esta citocina ejerce su acción a través de la unión a los receptores TNFR1 y TNFR2 los cuales señalizan a través de vías anti-apoptóticas y pro-inflamatorias contribuyendo a la respuesta inmune en contra de TB a través de diversos mecanismos que incluyen la secreción de quimiocinas, regulación a la alza de moléculas de adhesión y la inducción de la apoptosis en los macrófagos. (21, 22) Algunas otras funciones identificadas en modelos de ratón incluyen, el reclutamiento de células en el sitio de infección y la formación del granuloma así como el mantenimiento estructural del mismo. (23)

De manera reciente, como consecuencia del uso generalizado de los antagonistas TNF- α para el tratamiento de artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias, se ha observado una relación entre el uso de estos fármacos y el desarrollo de infecciones granulomatosas, principalmente TB. (24) El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-TNF ha mostrado inhibir la maduración inducida por IFN- γ de los fagosomas que contienen *M. tuberculosis* en los macrófagos humanos y la activación de las células T CD4+. Asimismo disminuyen la producción de IFN- γ en los cultivos de sangre completa y estimulan la apoptosis de monocitos, células T CD4+ cooperadoras y células T CD8+ con reactividad específica contra *M. tuberculosis*. (25) En un modelo de TBL en macacos cynomolgus, la neutralización de TNF- α ocasionó una tasa elevada de

reactivación de tuberculosis.(26) Otros estudios han demostrado la importancia de TNF- α en el control de la infección en modelos de TB paucibacilares en el ratón (modelos de TBL), en donde los animales con deficiencia de TNF- α presentaron reactivación de la infección con altas carga bacilar.(27) Por lo anterior la evidencia apoya el papel de TNF- α en el mantenimiento del estado de TBL previniendo la reactivación. A pesar de que la producción de TNF- α se considera benéfica para el hospedero, la sobreexpresión de esta citocina ha demostrado ocasionar inflamación severa en pulmones y bazo así como una muerte más temprana en ratones infectados con *M. bovis* BCG. (28) Adicionalmente, TNF- α parece modular el beneficio inmunopatológico conferido por la vacunación con *M. bovis* BCG ante el reto con cepas virulentas de *M. tuberculosis* en un modelo de cobayos. (22) Por lo anterior, parece ser que la expresión de esta citocina debe ser regulada estrictamente durante la infección por *M. tuberculosis* para ejercer un efecto bactericida minimizando la destrucción tisular.(23) Consistente con esta hipótesis, niveles elevados de TNF- α se han asociado a mayor deterioro clínico posterior al inicio de tratamiento con fármacos anti-tuberculosis.(29) Sin embargo, los mecanismos precisos mediante los cuales TNF- α contribuye al control de *M. tuberculosis* aún son poco claros. (23)

Interleucina-6: IL-6 es una citocina con propiedades pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, la cual se produce de manera temprana en el sitio de infección de por micobacterias. El efecto de IL-6 se considera deletéreo debido a que inhibe la producción de TNF- α y de IL-1 β . Sin embargo, otros estudios sugieren un papel protector de IL-6 contra la infección por *M. tuberculosis* el cual parece compensar la

producción deficiente de IFN- γ en fases tempranas de la infección previo al desarrollo de la inmunidad celular adaptativa.(30)

Interleucina-12: IL-12 juega un papel crucial en la defensa del hospedero en contra de *M. tuberculosis*. IL-12 es producida principalmente por las células fagocíticas, y la fagocitosis de *M. tuberculosis* parece esencial para la su producción. El papel protector de IL-12 se ha inferido de observaciones en ratones IL-12 KO los cuales, son altamente susceptibles a las infecciones por micobacterias. En humanos las mutaciones de los genes que codifican para IL-12p40 y IL-12R se han asociado a infecciones recurrentes por micobacterias no tuberculosas. Estos pacientes muestran una capacidad disminuida para la producción de IFN- γ . Aparentemente IL-12 es una citocina reguladora la cual conecta la inmunidad innata y la respuesta adaptativa en contra de las micobacterias y ejerce su papel protector principalmente a través de estimular la producción de IFN- γ . (8)

Interleucina-2: Durante la respuesta inmune adaptativa, los principales productores de citocinas son las células T CD4⁺ entre estas, se encuentra IL-2 la cual es secretada de manera temprana posterior al reconocimiento antigénico. Esta citocina estimula la proliferación, supervivencia y diferenciación de las células T antígeno activadas. La población de células T que responden rápidamente con la producción de IFN- γ posterior a la estimulación *ex vivo* pertenecen al pool de células de memoria efectora CD4⁺ CD45RA-CCR7⁻. (31) En contraste, las células T de memoria central pueden persistir incluso posterior al tratamiento eficaz de la tuberculosis (y probablemente a la erradicación completa del bacilo) y liberan menos IFN- γ posterior a una incubación corta, sin embargo producen mayor cantidad de IL-2 que las células efectoras.(32)

Citocinas anti-inflamatorias

La respuesta pro-inflamatoria iniciada por *M. tuberculosis* es antagonizada por mecanismos anti-inflamatorios. Algunos receptores solubles de citocinas evitan la unión de los receptores celulares y por lo tanto bloquean la señalización, como en el caso de los receptores solubles de TNF- α I y II. En el caso de IL-1 β tiene un mecanismo antagónico específico IL-RA. Adicionalmente tres citocinas anti-inflamatorias IL-4, IL-19 y el factor de crecimiento transformante β (TGF β) pueden inhibir la producción de citocinas pro-inflamatorias en tuberculosis.(8)

Interleucina-10: Esta citocina es producida por los macrófagos posterior a fagocitosis de *M. tuberculosis* y posterior la unión del lipoarabinomano de las micobacterias. Los linfocitos T, incluidos las células T antígeno específicas contra *M. tuberculosis*, también pueden producir IL-10. IL-10 antagoniza la respuesta de citocinas pro-inflamatorias mediante la regulación a la baja de la producción de TNF- α e IL-12. Por lo anterior se esperaría un papel deletéreo IL-10 interfiriera con la respuesta del hospedero contra *M. tuberculosis*. Sin embargo los datos en modelos animales y humanos son contradictorios. Experimentos en modelos de ratones deficientes de IL-10 mostraron menor carga bacteriana en un reporte y resistencia normal en otros dos.(33-35) En humanos, la producción de IL-10 se ha encontrado aumentada en pacientes anérgicos, lo cual sugiere que la producción de IL-10 suprime la respuesta inmune efectiva. (9) Sin embargo, en otros estudios se ha demostrado que la respuesta Th1, caracterizada por una producción incrementada de IFN- γ y TNF- α ocurre de manera tardía durante la resolución de la infección y se acompaña de una producción incrementada de IL-10, lo

cual sugiere que esta citocina tiene un papel importante en la regulación de estas citocinas pro-inflamatorias. Estudios en otros modelos de infección diferentes a TB, sugieren que el papel de IL-10 no es tan antagónico con la respuesta Th1 como se creía con anterioridad, sino que limita los efectos deletéreos de la inflamación ocasionada por las citocinas Th1, sin afectar la eliminación del agente infeccioso. (34, 36). Adicionalmente se ha demostrado un papel importante de IL-10 en el mantenimiento de las poblaciones celulares con fenotipo de células de memoria efectora favoreciendo la inmunidad contra la reinfección. (37) En el contexto de la TBL, es probable que IL-10 inhiba la apoptosis de las células T lo cual es crucial para mantener el repertorio de células responsables del control de la carga bacilar, el mantenimiento del estado de latencia. (11)

Interleucina-4: IL-4 tiene un papel deletéreo en las infecciones intracelulares incluida *M. tuberculosis* en la cual se ha relacionado con la supresión en la producción de IFN- γ y la activación de macrófagos.(35, 38) En ratones infectados con *M. tuberculosis* el incremento en la producción de IL-4 se ha asociado a reactivación y progresión de la enfermedad.(38, 39) En contraste, experimentos con ratones IL-4 KO mostraron un incremento en el tamaño de los granulomas y altas cargas bacterianas después del inoculo por vía respiratoria de *M. tuberculosis* así como un producción incrementada de citocinas pro-inflamatorias las cuales se acompañaron de mayor daño tisular.(40) En humanos, se ha detectado una producción incrementada de IL-4 en pacientes con enfermedad cavitaria, sin embargo este hallazgo no ha sido consistente. (41-43)

Interleucina-17: Recientemente se describió una nueva población de linfocitos T cooperadores (Th) además de los previamente identificados como Th1 y Th2. Estas

subpoblaciones, denominadas Th17 producen IL-17 A.(44, 45) El receptor de IL-17 A se expresa en diferentes órganos como pulmón, hígado y bazo. Entre las células capaces de responder a IL-17 se encuentran las células dendríticas, macrófagos, linfocitos, células epiteliales, queratinocitos y fibroblastos. IL-17 induce la expresión genes pro-inflamatorios, quimiocinas, defensinas y favorece el reclutamiento de neutrófilos y otros componentes inflamatorios.(44) En modelos de infección, IL-17 y las células Th17 se han implicado en la respuesta inmune a bacterias extracelulares que se multiplican rápidamente. Sin embargo datos más recientes han implicado a estas células y citocinas en un rango más amplio de infecciones incluidas infecciones ocasionas por bacterias intracelulares, hongos y virus en diferentes mucosas. El potencial de mediar patología autoinmune por IL-17 sugiere que esta citocina podría tener un efecto deletéreo en infecciones crónicas como la TB.(11) Sin embargo, otros estudios sugieren que la contra-regulación de las poblaciones Th1 y Th17 es esencial para conferir un efecto protector contra *M. tuberculosis* modulando un daño excesivo.(46) En este mismo sentido, se ha demostrado que durante la infección con *M. tuberculosis*, IFN- γ inhibe la producción de IL-17 por células T CD4+ disminuyendo la sobrevivencia de los neutrófilos y la acumulación de estas células en tejido pulmonar infectado.(47) Otros estudios han mostrado que las células que producen IL-17 (y no exclusivamente las células Th17) podrían proporcionar protección en pacientes con TB. En un modelo de ratón experimental mostró que IL-17 se requiere para acelerar el reclutamiento de las células que producen IFN- γ en el pulmón como resultado del aumento en la concentración de quimiocinas.(46) Así mismo la respuesta de IL-17 parece ser necesaria para inducir la respuesta Th1 posterior a la vacunación con BCG.(48)

Tuberculosis latente: cambiando el paradigma

Tradicionalmente se considera que en la TBL, el bacilo quiescente conserva capacidad de replicación y es capaz de causar enfermedad si ocurre alguna alteración en el sistema inmunológico. Este concepto es útil en la práctica clínica para priorizar el tratamiento de la TBL a los individuos considerados en mayor riesgo de reactivación.

(49) Sin embargo, considerar a la TBL como una entidad homogénea limita el desarrollo racional de nuevos fármacos, vacunas, biomarcadores e imposibilita determinar el riesgo de reactivación de cada individuo.(50)

Un concepto más actual y en evolución para definir TBL, es el considerar a esta entidad como un espectro de individuos en diferentes estadios que abarca desde aquellos que han eliminado completamente la infección, hasta los que contienen al bacilo el cual se encuentra replicándose activamente en ausencia de síntomas clínicos, lo cual recientemente se ha descrito como TB sub-clínica.(9)

El principal inconveniente de este cambio en el paradigma de la TBL es que ninguna de las pruebas diagnósticas actuales es capaz de ubicar a los individuos dentro de este espectro. (50)

Se conocen algunos factores de riesgo que predisponen a TBA, como son: la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), la diabetes mellitus (DM), el uso prolongado de esteroides, el uso de inhibidores de TNF- α , la inmunosupresión asociada al trasplante de órganos, entre otros. En todos estos pacientes es fundamental realizar el escrutinio de la TBL con el propósito de administrar el tratamiento (isoniacida por 6 a 9 meses) y disminuir el riesgo de enfermedad. Sin embargo, en ausencia de estos factores de riesgo y sin biomarcadores que permitan

establecer el riesgo de reactivación esta estrategia es costo-inefectiva en países con cargas intermedias o altas de TB.

Uso clínico de la Prueba cutánea de tuberculina y los Ensayos de Liberación de Interferón- γ

Las personas expuestas a *M. tuberculosis*, se pueden identificar mediante la reactividad al Derivado Proteínico Purificado (PPD) durante la TST seis a ocho semanas después de la exposición al bacilo de la tuberculosis. La TST es una intradermorreacción basada en la hipersensibilidad retardada, en respuesta a una mezcla compleja de más de 200 antígenos proteicos 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 10 mm, (5 mm en pacientes inmunocomprometidos) medida entre 48 a 72 horas después de la aplicación del PPD es considerada positiva. Sin embargo, la TST no puede distinguir entre la infección por los diferentes microorganismos del complejo *M. tuberculosis* ni entre la reactividad cruzada que existe tras la sensibilización con micobacterias ambientales.(51) Por otro lado, la vacunación con *M. bovis* BCG, puede causar falsos positivos hasta 5 a 10 años posterior a su aplicación, sin embargo, este tipo de reactividad cruzada a los antígenos contenidos en el PPD, ocasiona induraciones de moderada intensidad (5-10 mm).(52)

En la actualidad, se encuentran disponibles pruebas más específicas que la TST para establecer el estado de TBL. Estas pruebas son denominadas ensayos de liberación de IFN- γ (Interferon Gamma Release Assays: IGRA), las cuales cuantifican la liberación de

IFN- γ de las células T al ser estimuladas con los antígenos ESAT-6, CFP-10. Estos dos epítopes, son codificados por la región de diferencia 1 (RD-1), la cual se encuentra ausente en la cepa vacunal *M. bovis* BCG lo cual, aumenta la especificidad de la prueba en la población que ha sido vacunada. Mediante la técnica de ELISPOT (T.SPOT.TB) el resultado se expresa en unidades formadoras de manchas (SFU *Spot Forming Units*) y se considera positivo cuando se detectan >8 SFU. Si se emplea la técnica de ELISA (Quantiferon Gold In-tube) se cuantifica la concentración de IFN- γ y el resultado se expresa en unidades internacionales por mililitro (positiva >35 UI/mL). (53)

Recomendaciones actuales para el uso e interpretación de los Ensayo de Liberación de Interferón- γ y la Prueba Cutánea a Tuberculina

Una de las grandes dificultades en el estudio de la TBL, es la ausencia de un estándar de referencia para evaluar a los IGRA en comparación con el TST excepto las cohortes que evalúan la progresión a largo plazo a TBA. A falta de un estándar de referencia los IGRA han sido comparados con TST en estudios transversales utilizando los casos de TBA para determinar la sensibilidad y población de bajo riesgo para determinar la especificidad.(54)

En general, se considera que la TST y los IGRA proporcionan información clínica equivalente, sin embargo la concordancia entre estas pruebas es de 60% a 80% de acuerdo a las diferentes series. La sensibilidad y especificidad de los IGRA en países con baja prevalencia de TB es del 78-90% y 96% respectivamente. En el caso de la TST tiene una sensibilidad de 77% y una especificidad del 95% en sujetos no vacunados previamente con BCG.(55)

Las recomendaciones para el uso de estas pruebas son heterogéneas en la literatura, y

algunos países han creado sus propias guías de uso.(56) Una revisión reciente identificó 33 guías realizadas en 25 países diferentes y en 2 organizaciones internacionales, encontrando una gran diversidad en las recomendaciones con cuatro abordajes frecuentemente utilizados:

1) Abordaje en 2 pasos, primero TST seguido de realización de IGRA ya sea cuando la primera es negativa (para aumentar la sensibilidad en personas inmunocomprometidas) o cuando la TST es positiva (para aumentar especificidad principalmente en individuos vacunados con BCG)

2) Utilización de una u otra prueba de manera equivalente

3) Utilización de ambas pruebas juntas para aumentar la sensibilidad

4) Utilización de IGRA únicamente reemplazando al TST

La mayoría de estas guías, no cuentan con un nivel de evidencia suficiente para establecer de manera objetiva sus recomendaciones.(57) Por otro lado, un meta-análisis reciente mostró que ninguna de las pruebas tiene capacidad de predecir el desarrollo de TB durante el seguimiento.(58)

Discrepancias entre la Prueba Cutánea a Tuberculina y los Ensayos de Liberación de Interferón- γ

A pesar de ser la TST y los IGRA consideradas pruebas equivalentes en algunas guías de práctica clínica, es frecuente encontrar discrepancias en los resultados entre ambas pruebas. Este fenómeno, se explica parcialmente por la diferente prevalencia de la enfermedad entre las regiones, la edad de la población, el estado de vacunación con BCG y por la sensibilización a micobacterias ambientales. Sin embargo, existe aún un porcentaje importante de estas discrepancias que no son explicadas por estos

factores.(59)

La discrepancia más frecuentemente reportada en las distintas series es TST+/IGRA-, la cual en la mayoría de los casos se atribuye a la vacunación previa con BCG, sin embargo este fenómeno se observa con mayor frecuencia en países que tienen una política de vacunación que incluye una segunda dosis de BCG durante la adolescencia. Otros autores postulan que, en ausencia de vacunación reciente con BCG, esto puede indicar una mayor sensibilidad de las prueba de TST para detectar infecciones resueltas o TBL “antigua”, mientras que el IGRA detecta TBL o infección reciente. En contraste, se ha prestado menos atención en la literatura a aquellos casos TST-/IGRA+, ya que se asume que el IGRA es altamente específico y que lo más probable es que la combinación indique TBL, o bien corresponda a una exposición reciente al bacilo de la TB que aún no es detectable mediante el TST por requerir esta un mayor tiempo para la positivización. Se ha discutido también, que este pudiera ser un efecto de la edad la cual, disminuye la sensibilidad del TST más no del IGRA. A este respecto, un estudio realizado en Alemania, incluyó datos de 1033 sujetos a los cuales les fueron administradas ambas pruebas y en el cual, se encontró discordancia en el 15% de los sujetos. La combinación discordante mas frecuente fue TST+/IGRA-, la cual fue explicada en el 85.1% de los casos, por la vacunación con BCG y por la procedencia de los sujetos de una región. Por otro lado, la edad avanzada explicó el 49.1% de las discordancias TST-/IGRA+ en el mismo modelo. La concordancia entre ambas pruebas fue del 95.6.% en aquellos individuos nacidos en Alemania menores de 40 años y no vacunados con BGC.(60)

En contraste, un estudio realizado en un país de alta prevalencia de tuberculosis como es Brasil, y donde existe una política de vacunación con BCG solo durante la infancia,

demonstró que la discordancia entre las pruebas no puede ser atribuida únicamente a la vacunación. Se estudiaron los contactos de pacientes con tuberculosis mediante ambas pruebas y la concordancia encontrada fue de 76% ($\kappa=0.53$, 95% IC 0.43-0.63), 24% de los casos fueron discordantes (44 TST+/IGRA- y 17 TST-/IGRA+). En comparación con el grupo TST-/IGRA-, en los individuos TST+/IGRA+ y TST+/IGRA- fue más probable encontrar datos de TB antigua en la radiografía de tórax (RM 6.8, IC 95% 1.3-35.0; RM 7.4, IC 95% 2.2-24.4 respectivamente). Respecto al grupo TST-/IGRA+, se demostró que este grupo tuvo una exposición mayor a los casos índice de tuberculosis que los TST-/IGRA-, los autores concluyen que en países de alta prevalencia TST es una mejor herramienta para la toma de decisiones clínicas respecto a la TBL.(61)

En otro estudio, realizado por Kang et al., cuyo objetivo fue contrastar la inmunidad celular *in vitro* en aquellos individuos con TST/IGRA discordante se demostró que, en los contactos de individuos con TBP estudiados, aquellos con IGRA+ en presencia de una TST >15mm tuvieron una menor actividad bactericida medida, a diferencia de aquellos individuos con TST>15mm e IGRA(-), en quienes se observó una mayor respuesta celular *in vitro* de acuerdo a dicho ensayo. Los autores postulan que las respuestas enérgicas a PPD pudieran representar inmunidad protectora frente a las micobacterias y en otros pudiera representar un riesgo de reactivación a mediano plazo y que esto, al relacionarlos con los resultados de los IGRAs pudiera establecer el significado de las discrepancias entre las pruebas. Los autores concluyen que en aquellos individuos con IGRA-, la reactividad enérgica a PPD tanto *in vitro* como medida por la prueba de TST, refleja inmunidad protectora contra la micobacteria y por lo tanto un menor riesgo de reactivación a diferencia de aquellos individuos con ambas

pruebas positivas en los cuales se demostró una menor capacidad de la inmunidad celular en *in vitro* de eliminar las micobacterias y que son estos últimos individuos quienes probablemente presenta un mayor riesgo de enfermedad.(62)

Por otro lado diversos estudios han mostrado que solo entre el 20 a 50% de los contactos cercanos de los pacientes con TB desarrollan una TST positiva y de ellos solo 1-2% eventualmente presentarán la enfermedad. (63) Lo anterior sugiere, que los sujetos con estas características pudieran corresponder a que o bien no fueron o son resistentes a la infección por *M. tuberculosis* y eliminaron la infección a través de una respuesta innata efectiva, sin necesidad de presentación antigénica, sin embargo lo anterior ha difícil de comprobar en humanos. (64)

Ensayos de Actividad Bacterioestática

Debido a que solo 5%-10% de los sujetos con TBL desarrollarán TBA durante el curso de su vida, es difícil evaluar de manera prospectiva cuales son los factores que condicionan la reactivación. Lo anterior, también imposibilita evaluar la efectividad de las vacunas para prevenir la infección, sobre todo en países con prevalecía elevada.

Por ello, en años recientes se han desarrollado otras estrategias de evaluación *in vitro* que permiten valorar la inmunidad celular en el hospedero.(65)

En la actualidad existen diversos ensayos *in vitro* que permiten caracterizar la respuesta inmune celular de cada individuo ante la infección, ya sea adquirida por exposición a las micobacterias o la que confiere la vacunación por BCG. Estos ensayos son realizados *in vitro* mediante el aislamiento y cultivo de PBMC, o bien son realizados con sangre total, con cepas e inóculos conocidos de diferentes micobacterias . Estos han sido denominados Ensayos de Actividad Bactericida/ bacteriostática.

Estos ensayos se clasifican de acuerdo con las subpoblaciones específicas de células mono-nucleadas (CMN) utilizadas y según la estimulación previa (con antígenos de *M. tuberculosis*) o en ausencia de ésta, antes del cultivo celular con las cepas problema de *M. tuberculosis*. Así, a los ensayos donde se separan los linfocitos y sin estimulación antigénica previa al co-cultivo, se les denomina ensayos de inhibición linfocitaria primaria. Otros ensayos, en donde se emplean CMN estimulados con antígenos de la micobacteria (ESAT-6, CFP-10 y PPD) previo al co-cultivo, se les denomina genéricamente ensayos de inhibición linfocitaria secundaria. Estos ensayos permiten conocer la participación de las células de memoria central principalmente. Finalmente, otro grupo de ensayos emplea sangre total heparinizada, la cual se cultiva directamente con la cepa problema; éstos se conocen como ensayos de actividad bactericida en sangre total. (EABST). Los EABST se han empleado con el propósito de determinar la intervención, de las diferentes subpoblaciones celulares en la respuesta de inmunidad celular y humoral ante las micobacterias. Los EABST son considerados apropiados para el estudio de poblaciones mas grandes debido a su simplicidad técnica.(66)

Ensayos de Actividad Bacterioestática en Sangre Total

Las micobacterias residen y se multiplican dentro de los macrófagos y por tanto, la habilidad de estas células para regular a la alza los mecanismos bactericidas parece fundamental para la contención exitosa de los microorganismos.

Se ha documentado que pequeñas cantidades de micobacterias sufren fagocitosis casi en su totalidad después de agregarse a un cultivo de sangre total indicando su papel potencial en el modelo de TB intracelular. A diferencia de los modelos de inhibición bactericida primaria y secundaria, el ensayo en sangre total evalúa la compleja

interrelación entre los factores humorales y celulares del hospedero los cuales se conoce juegan un papel importante en la respuesta inmunológica exitosa ante la infección por micobacterias. La limitación principal del modelo es que los monocitos en sangre pudieran no representar completamente las actividades de los macrófagos pulmonares maduros.(67)

Los ESBST han sido utilizados para caracterizar la actividad bactericida deficiente en poblaciones inmunocomprometidas y establecer la eficacia de diferentes vacunas en experimentación.(62, 68)

Kampmann et al. reportaron una inhibición mayor del crecimiento de una cepa de *M. bovis* BCG en el cultivo con sangre total de sujetos con prueba de tuberculina positiva (n=10) en comparación con los sujetos evaluados con prueba de tuberculina negativa (n=10),(tasa de crecimiento 1.8 vs. 4.9 p=0.005) indicando el efecto de la inmunidad celular adquirida en ese modelo. En ese reporte, se utilizó la cepa recombinante BCG *lux* para la medición del crecimiento de las micobacterias expresadas en tasa de crecimiento calculada mediante la medición unidades relativas de luz (URL).(69).

Mediante el mismo método, estos autores demostraron la diferencia sobre la actividad bacteriostática en recién nacidos antes de la aplicación de la vacuna BCG y a los 3-6 meses posterior a la aplicación de la misma. Se estudiaron 50 recién nacidos procedentes de una región con alta prevalencia de TB, en los cuales se realizó el ensayo de EABST mediante la determinación de la tasa de crecimiento por URL de la cepa BCG *lux*, antes y después de la vacunación encontrando diferencias estadísticamente significativas (mediana de tasa de crecimiento 9.6 vs 3.9 p<0.0001).(66)

Hoft et al, realizaron el EABST en 10 voluntarios adultos sanos con TST negativa,

previo a la vacunación con BCG, a los 6 meses posterior a la aplicación, y posterior a la aplicación de una segunda dosis. Los resultados mostraron un incremento en el índice micobactericida de 1 a 3 posterior a la segunda aplicación de BCG ($P < 0.05$).⁽⁶⁷⁾

Este mismo ensayo se utilizó en pacientes pediátricos con infección VIH que presentaban Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) previo al inicio de terapia antirretroviral altamente activa. Se estudiaron 22 niños VIH negativos y 22 niños VIH positivos y se encontró una tasa de crecimiento medida mediante RLU significativamente mayor (media 10.5 vs 6.5 $p = 0.001$) en los niños con diagnóstico de VIH comparado con los niños sanos.⁽⁶⁸⁾

Otras poblaciones y situaciones clínicas en las cuales se ha utilizado este ensayo son: durante el uso de diferentes bloqueadores de TNF- α , como marcador de riesgo para TB con el uso de dichos fármacos,⁽⁷⁰⁾ en pacientes con TBP como predictor de recaída posterior a la administración de fármacos anti-tuberculosis, ⁽⁷¹⁾ y para medir la efectividad del suplemento de vitamina D como adyuvante en el tratamiento de TBP.⁽⁷²⁾

La simplicidad de los EABST, facilita su utilización en estudios clínicos, ya estos requieren solamente de una mezcla de sangre heparinizada con un agente infeccioso en un medio de cultivo tisular. Dos revisiones recientes, sugieren estos ensayos como herramientas útiles en estudios de enfoque clínico como un marcador de inmunidad en diferentes situaciones clínicas.^(73, 74)

Ensayos de actividad bactericida en sangre total en métodos automatizados

Como una alternativa al uso de micobacterias recombinantes con genes reporteros en los EABST (*BCG lux*) desde el 2002, Cheon et al, informaron el empleo de una

plataforma automatizada (BACTEC 460) para demostrar el efecto de la inmunidad *in vitro* en sujetos adultos vacunados con BCG en contra de cepas atenuadas, cepas hipervirulentas y estándar de *M. tuberculosis*, correlacionando el índice de crecimiento proporcionado por el instrumento (método radiométrico) con las unidades formadoras de colonias (UFC).(75)

Recientemente, ha resurgido el interés en realizar EABST utilizando equipos automatizados, específicamente con la plataforma MGIT/ BACTEC 960.

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 utilizado y el fluorocromo se reduce, dando como resultado la emisión de fluorescencia la cual es visualizada bajo luz UV. La intensidad de la fluorescencia, es directamente proporcional al consumo de oxígeno por la micobacteria. Los tubos MGIT incubados en el instrumento, son monitoreados para detectar el incremento de fluorescencia cada 60 minutos. El instrumento declara 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 inóculo, a mayor inóculo, se acorta del TDP. Esta relación se ha utilizado para cuantificar el cambio en la viabilidad de las micobacterias durante los EABST y por consiguiente como un método de cuantificación de UFC.

Esta metodología se ha empleado exitosamente para demostrar la efectividad de nuevos fármacos contra tuberculosis,(76-78) así como para determinar la inmunidad

específica a algunas cepas aisladas en casos de tuberculosis resuelta,(78) y para determinar la posibilidad de falla durante el tratamiento de TB con fármacos convencionales.(71)

Ensayos en Sangre Total para Evaluar la respuesta inmune a citocinas en contra de Tuberculosis

La evaluación de las citocinas y quimiocinas de los sobrenadantes de cultivos es un componente importante de los estudios de respuesta inmune ante un reto antigénico. Sin embargo estas determinaciones generalmente se realizan en células purificadas y por tanto excluyen otros componentes importantes de la sangre que pudieran tomar parte en la respuesta inmunológica. Por otro lado, los resultados difieren dependiendo del estímulo utilizado (proteínas específicas de *M. tuberculosis* o mitógenos), la población de estudio, el medio de cultivo y la metodología de laboratorio y la cantidad de diluciones empleada.

Como obstáculos frecuentes en los estudios inmunológicos que evalúan la respuesta a antígenos de micobacterias en cultivos de PBMC se ha descrito la cantidad de limitada de citocinas que se detectan así como una pobre reproducibilidad. Las metodologías que emplean únicamente PBMC, presentan como inconveniente una menor viabilidad de estas células y menor capacidad de respuesta antigénica en comparación a los ensayos en sangre total, probablemente debido a que los procedimientos de separación son tóxicos para algunas poblaciones celulares.(79). Los ensayos en sangre total tienen ventajas adicionales como son: un tiempo de procesamiento menor, menor costo, requieren menor entrenamiento del personal además de mantener un ambiente más fisiológico debido a que conservan elementos celulares y no celulares

como plasma y granulocitos. En un estudio reciente se comparó la secreción de 17 citocinas utilizando PBMC y sangre total en 23 individuos asintomáticos, estimulando con los antígenos Ag85A, Ag85B, ESAT-6. Se observó una buena concordancia entre ambos métodos para la detección de IL-2, IL-5, IL-6, IFN- γ TNF- α , sin embargo IL-10, IL-17 e IL-4 se detectaron en mayor concentración en el sobrenadante del cultivo de PBMC. Los autores concluyen que los ensayos en sangre completa constituyen un método adecuado y de bajo costo para la búsqueda de biomarcadores.(80)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las pruebas disponibles para el diagnóstico de TBL (TST e IGRA) no predicen por sí solas la progresión a enfermedad y es necesario determinar mediante otras estrategias el riesgo de desarrollar la enfermedad. Debido al cambio en el paradigma de la TBL, las herramientas diagnósticas son insuficientes para ubicar a los individuos en el espectro de la infección. Por otro lado, existe gran controversia acerca del significado de los resultados discrepantes y la utilidad en general de estas dos pruebas en los países con alta prevalencia como el nuestro.

JUSTIFICACION

El significado biológico de las discrepancias entre los resultados de la TST y los IGRA no se ha determinado en poblaciones con alta prevalencia de enfermedad y en las cuales no existe una política de vacunación con BCG durante la adolescencia.

Es posible que el empleo de otras metodologías como son los EABST, permitan conocer la respuesta inmune contra TB podrían ser de utilidad para ubicar a los sujetos con TBL en el espectro de la infección.

El mejor conocimiento de la TBL, permitirá desarrollar estrategias efectivas para el control de la infección y progresión a enfermedad en la población..

PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Existe diferencia en la actividad bacterioestática en sangre total entre los sujetos entre las diferentes combinaciones de TST e IGRA?

HIPÓTESIS

Los individuos con la combinación TST (+)/IGRA (-) presentan una mejor actividad bacterioestática en los EBAST en comparación con aquellos individuos o con la combinación TST (-)/IGRA (-), TST(-)/IGRA(+) o TST (+)/IGRA (+)

OBJETIVOS

Principal:

- Comparar la actividad bacteriostática en sangre completa entre sujetos con diferentes combinaciones de TST e IGRA

Secundarios:

- Comparar la concentración de citocinas basales (IL-17 A, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10, IL-6 e IL-2) entre los sujetos con diferentes combinaciones de TST e IGRA.
- Comparar la concentración de citocinas del sobrenadante del co-cultivo durante 96h con las cepas *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG entre los sujetos con diferentes combinaciones de TST e IGRA.

METODOS

1. Diseño del estudio:

Se realizó un estudio transversal comparativo prolectivo

2. Justificación del tamaño de muestra:

No existen en la literatura estudios que muestren la dispersión de los datos en los EABST en las condiciones que plantea el estudio. Sin embargo, contamos con los datos preliminares del estudio en curso en nuestro laboratorio entre sujetos sanos TST positivo y TST negativo, con los cuales utilizando la fórmula para la comparación de dos medias [$N = 2s^2(z\alpha + z\beta)^2 / \Delta^2$] con un α 0,05 y un poder de 90% se requieren 15 pacientes por grupo.

3. Lugar de estudio

Los EABST fueron realizados en el Laboratorio de Máxima Seguridad Biológica (BSL-3) del Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

4. Población de estudio:

La población de estudio fueron estudiantes de la carrera de medicina cursando el tercer semestre en la Escuela de Medicina de la Universidad Panamericana (Ciudad de México). Lo anterior previo a la realización de prácticas clínicas y por tanto sin exposición potencial a pacientes con TB.

5. Grupos a estudiar

Grupo 1: Individuos TST > 15 mm (positivo) de induración y resultado de IGRA positivo

Grupo 2: Individuos TST > 15 mm (positivo) de induración y resultado de IGRA negativo.

Grupo 3: Individuos TST < 5 mm (negativo) de induración y resultado de IGRA positivo

Grupo 4: Individuos TST < 5 mm (negativo) de induración y resultado de IGRA negativo

6. Criterios de Inclusión

- Mayores de 18 años de edad
- Que acepten participar en el estudio y firmen consentimiento informado
- Antecedente conocido de vacunación con BCG o presencia de cicatriz en región deltoidea

7. Criterios de exclusión

- Mayores de 30 años de edad
- Antecedente de tuberculosis activa en cualquiera de sus formas diagnosticada por cultivo o manifestaciones clínicas
- Uso de medicamentos inmunosupresores
- Imposibilidad para obtener la muestra de sangre por venopunción
- Contacto con personas con tuberculosis
- Evidencia de conversión a la prueba de tuberculina reciente
- Pacientes en tratamiento para TBL con isoniacida

- Consumo antibióticos con actividad sobre microorganismos del CMTB durante la semana previa a la toma de muestra (fluorquinolonas, claritromicina, amoxicilina-clavulanato, rifampicina, rifapentina, isoniacida, etambutol, pirazinamida, protionamida/etionamida, cicloserina, aminoglicosidos, PAS, linezolid, imipenem, meropenem)
- Ausencia de cicatriz o antecedente de vacunación con BCG o desconocimiento del mismo
- Vacunación BCG después de la infancia

8. Criterios de Eliminación:

- Mediciones incompletas (TST o IGRA)
- Imposibilidad de determinar citocinas de los sobrenadantes de co-cultivos de todos los tiempos establecidos (basal y 96 hrs co-cultivo con cepa *M. tuberculosis* H37Rv o *M. bovis* BCG)

9. Estrategia de cegamiento

Posterior a ser incluidos en el estudio, las muestras de los pacientes, recibieron un identificador único con el cual se realizó el manejo de las muestras de sangre. El personal del laboratorio que realizó las pruebas estuvo cegado al resultado de la TST e IGRA, y demás características del individuo de quien se procesa la muestra. El resultado del ensayo se relacionó con las características del individuo hasta el análisis de los datos.

METODOLOGÍA

Evaluación de los sujetos

Una vez que los individuos aceptaron participar en el estudio y firmaron el

consentimiento informado se realizó una evaluación que consistió en la aplicación de un cuestionario, en el cual se interrogaron co-morbilidades, historia de medicamentos consumidos durante la última semana, viajes recientes, historia de exposición a enfermos con TB y síntomas que pudieran relacionarse con TBA. Posteriormente se realizó y documentó una exploración física completa.

Toma de la muestra y manejo

Se obtuvieron 20 ml de sangre venosa por venopunción en región del antebrazo. La muestra se transportó en tubos heparinizados en cadena fría (5-8 C temperatura) sin que transcurrieran más de 4 horas para el inicio de su procesamiento. Adicionalmente se obtuvieron 3ml de sangre venosa para la realización de biometría hemática completa y 5 ml para la realización de IGRA.

Ensayos de Actividad Bacteriostática en Sangre Total

Se determinó la actividad bacteriostática en sangre total de acuerdo a la metodología descrita por Wallis RS et al, en la plataforma BACTEC MGIT/960 (Beckton Dickinson, Sparks, MD, EUA).

La realización de los ensayos consta de las siguientes etapas: cultivo y conservación del stock, titulación del stock, cultivo de la micobacteria con sangre completa (co-cultivo) y cosecha de las micobacterias del co-cultivo.

Cultivo y conservación del stock.

Se utilizaron cepas de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG con tres semanas de crecimiento en medio de cultivo Lowestein-Jensen, para realizar una suspensión al 0.5 de McFarland (1×10^8 UFC/ml) y se realizaron una dilución 1:200.

Posteriormente, de la cepa diluida se agregó 400µL a 6 tubos MGIT suplementados con enriquecimiento (OADC, Becton-Dickinson) y se incubaron en el instrumento BACTEC 960, hasta que su detección como positivo, posteriormente el cultivo se homogeneizó mediante agitación en vórtex y se colocaron diferentes volúmenes en tubos de crio preservación y fueron almacenados a -70 °C hasta su uso.

Titulación del stock

Se descongeló una alícuota de 1200 µL de cada cepa y se realizaron las siguientes diluciones seriadas: 1:500, 1:50, 1:5, 1:0.5, 1:0.05 y 1:0.005. A partir de cada dilución se inocularon 500µL en dos tubos MGIT, los cuales se incubaron en el instrumento BACTEC 960 y se registró el TDP en días y horas. El resultado fue introducido en el software diseñado para este propósito (RS Wallis). Mediante una regresión exponencial se determinó una curva pre-dicho y el volumen requerido del cultivo stock para alcanzar el umbral de positividad en 7 días.

Cultivo con sangre completa (co-cultivo)

Se tomó el volumen del inóculo calculado para un crecimiento en 7 días y se agregó a un tubo con tapa de rosca (Axygen SCT-200-C-S) de 2 ml por duplicado para cada tiempo de lectura (0 y 96 hr). Los tubos se centrifugaron a 10,000 RPM por 10 min, se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 300 µL de medio de cultivo RPMI. Posteriormente se agregó a cada tubo 300 µL de sangre completa de los sujetos y se incubó a 37 °C en agitación suave hasta concluir las 96 hr de incubación.

Cosecha de micobacterias del co-cultivo

Al concluir el tiempo de incubación se retiraron los tubos con su duplicado de la incubadora, se centrifugaron a 10,000 RPM por 5 min, se retiró el sobrenadante y se colocó en criotubos de 1.5 ml, los cuales se almacenaron a -70 °C y posteriormente se

determinó la concentración de citocinas. Posteriormente, se agregó 1 ml de agua estéril a cada tubo y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 10 min. Los tubos fueron centrifugados nuevamente a 10,000 RPM durante 10 min, el sobrenadante fue desechado y el pellet se re-suspendió en 500 μ L de caldo Middlebrook 7H9. La suspensión se inoculó en tubos MGIT; los cuales fueron incubados en el aparato BACTEC 960 y se registró el TDP en horas y días para ser analizado en el software. Se utilizó como control de crecimiento de la cepa el volumen predeterminado de stock en 2 en tubos MGIT.

Lectura los resultados del EABST

El resultado final de los EABST se obtuvo mediante el procesamiento de los datos de TDP en el software. La Δ log UFC (cambio en la viabilidad durante el cultivo en sangre) se calcula de siguiente manera: $\log \text{UFC (final)} - \log \text{UFC (inicial)}$, donde inicial y final son los volúmenes del inóculo que corresponden a los valores de TDP inicial y del TDP final del ensayo. Posteriormente para controlar la variabilidad en cada experimento, se restó el log UFC del control de crecimiento.

Detección de citocinas

De los sobrenadantes obtenidos suero de los donadores así como del co-cultivo de los EABST se determinó la concentración de las siguientes citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17A mediante citometría de flujo utilizando el kit BD Cytometric Bead Array Human Th1, Th2, Th17 (Beckton Dickinson) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Los ensayos de citometría se llevaron a cabo en el aparato BD FACSCanto II (Beckton Dickinson).

Ensayos de liberación de Interferón- γ

Se realizaron los IGRA a partir de plasma utilizando el kit Quantiferon TB Gold In-Tube (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se llevó cabo un análisis descriptivo de los datos utilizando medidas de tendencia central y de dispersión estadística no-paramétrica [mediana y rangos intercuartilares (RIC)]. En el caso de las variables cualitativas, se utilizaron frecuencias absolutas y relativas (porcentajes). Se determinaron las diferencias entre las medianas del log UFC de los EABST y los niveles de citocinas del sobrenadante con de los diferentes grupos mediante la prueba de Kruskal-Wallis, para la comparación entre grupos se realizó la prueba de Dunn con ajuste de Bonferroni. Se determinó el coeficiente de variabilidad de la prueba intra-ensayo durante la estandarización del mismo. Se determinó un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo para todas las pruebas. El análisis de los datos se realizó en el programa Stata 13 (StataCorp, College Station Tx EUA) y

ASPECTOS ÉTICOS

El presente estudio de investigación fue sometido y aprobado por el Comité Institucional de Investigación Biomédica en Humanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (Ref: 952). A todos los sujetos incluidos se les explicó verbalmente los propósitos del estudio y una vez resueltas las dudas se les solicitó que firmaran el formato de consentimiento informado por triplicado y se les proporcionó una copia. Los participantes no recibieron remuneración económica.

RESULTADOS

Estandarización de la técnica y Coeficiente de Variación

Se estandarizaron los EABST de acuerdo a la metodología antes descrita. Se utilizó la una cepa de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv para la realización del stock, el cual posteriormente fue titulado en el software y se obtuvo un volumen de 83 μ L para un predicho de crecimiento en 7 días. Posteriormente se realizaron de manera seriada seis en diferentes fechas con la sangre de un mismo donador. Se calculó el coeficiente de variación (CV) del log/UFC para control de crecimiento el cual fue de 5.0% así como de la medición principal que fue el Δ log/UFC en el co-cultivo con sangre completa por 96 hr, del cual se obtuvo un CV de 10.1%.

Datos demográficos y resultados de Prueba Cutánea a Tuberculina y Ensayos de Liberación de Interferón- γ

Entre 2011 y 2015, 59 estudiantes aceptaron participar en el estudio y firmaron consentimiento informado. Catorce se excluyeron por ausencia de cicatriz de BCG y/o porque refirieron no haber sido vacunados durante la infancia. Un sujeto se excluyó debido a que recibió una dosis de BCG dos semanas previas a la realización de la toma de muestra. En cuatro de los sujetos, no se localizaron todos los sobrenadantes de co-cultivos para la determinación de las citocinas y en dos el EABST con la cepa BCG mostraron contaminación y los datos no fueron analizables. Seis sujetos mostraron induración de TST entre 6-14 mm por lo cual no pudieron ser asignados a los grupos de análisis. Finalmente analizaron los datos de 34 sujetos.

De acuerdo a lo anterior los grupos de interés se conformaron de la siguiente manera; cinco sujetos presentaron la combinación TST \geq 15 mm (+)/IGRA+, 5 TST (+)/IGRA(-),

5 la combinación TST \leq 5 mm (-)/IGRA(+) y 19 TST(-)/IGRA(-) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características demográficas y resultados de la prueba cutánea de tuberculina y Ensayos de Liberación de Interferón γ .

N=34	Mediana n/N	RIC 25%-75% %
Edad	20	20-21
Sexo (Masculino)	13/34	38.2
Vacunación BCG	34/34	100
Cicatriz BCG	30/34	88.2
Induración TST (mm)	0	0-15
IGRA positivo	10/34	29.4
Grupo 1: TST >15 mm/ IGRA positivo	5/34	14.7
Induración TST grupo 1 (mm)	23	20-24
Grupo 2: TST >15 mm/IGRA negativo	5/34	14.7
Induración TST grupo 2 (mm)	24	20-26
Grupo 3: TST <5 mm/IGRA positivo	5/34	14.7
Induración TST grupo 3 (mm)	0	0-0
Grupo 4: TST <5 mm/IGRA negativo	19/34	55.8
Induración TST grupo 4 (mm)	0	0-0

Citocinas basales

Se midió la concentración de citocinas de suero basal (sin estimulación antigénica) en los 34 participantes. La mediana de la concentración de IL-17A fue: 59.3 pg/mL (RIC 44.0- 92.2), IFN- γ : 7.1 pg/mL (RIC 6.5-8.4), TNF- α : 7.1 pg/mL (RIC 6.5- 8.4), IL-10: 6.1 pg/ml (RIC 5.3-6.3), IL-6: 7.8 pg/mL (RIC 7.3- 8.5), IL-4: 6.9 pg/mL (RIC 6.3- 7.09) y IL-2: 11.07 pg/mL (RIC 10.6-11.5). Se analizaron las citocinas según las combinaciones de TST e IGRA. La concentración de IL-17 A mostró diferencia entre los grupos ($p=0.05$). La mediana de la concentración de IL-17 A fue 101.6 pg/mL (RIC 75.4-121.7) en los sujetos TST+/IGRA+ y 42.8 pg/mL (RIC 39.8- 59.1) en los sujetos TST-/IGRA+ (p corregida <0.05) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Citocinas basales (sin estimulación antigénica) de acuerdo a la combinación de la prueba cutánea de tuberculina (TST) y los ensayos de liberación de interferón- γ (IGRA).

	Total	TST+/IGRA+	TST+/IGRA-	TST-/IGRA+	TST-/IGRA-	p
	Mediana (RIC 25%-75%)					
N	34	5	5	5	19	
IL-17 A pg/mL	59.3 (44.0- 92.4)	101.6 (75.4- 121.7)*	43.1 (40.7- 44.4)	42.8 (39.8- 59.1)*	59.4 (54.0- 92.4)	0.05
IFN-γ pg/mL	7.1 (6.5- 8.4)	7.07 (7.07- 7.2)	7.2 (6.8- 9.6)	9.0 (8.4- 9.2)	6.6 (6.4- 7.3)	0.09
TNF-α pg/mL	7.09 (6.4- 7.5)	7.5 (7.2- 8.05)	6.2 (6.1- 7.2)	6.5 (6.4-7.1)	6.9 (6.7-7.6)	0.1
IL-10 pg/mL	6.1 (5.3-6.3)	6.1 (5.3- 6.3)	6.1 (5.1-6.2)	5.4 (4.7-5.6)	6.2 (5.5- 6.5)	0.1
IL-6 pg/mL	7.8 (7.3- 8.5)	7.7 (7.6- 7.9)	7.8 (7.8- 8.5)	7.1 (6.4- 7.5)	8.03 (7.3- 8.8)	0.5
IL-4 pg/mL	6.9 (6.3-7.09)	7.3 (6.3- 7.8)	7.4 (6.3- 7.6)	6.2 (5.8- 6.6)	6.9 (6.3- 7.09)	0.1
IL-2 pg/mL	11.07 (10.6- 11.5)	11.6 (10.6- 11.8)	11.4 (11.02- 12.1)	11.02 (10.9- 11.4)	10.9 (10.5- 11.4)	0.3

* p-correctada <0.05

Ensayos de Actividad Bacterioestática y citocinas en el co-cultivo con la cepa *M. tuberculosis* H37Rv

La mediana del log UFC de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv menos el control de crecimiento en el tiempo 96 hrs fue de 1.06 Δ log UFC (RIC 0.409-1.34). Las concentraciones de citocinas de los sobrenadante del co-cultivo con *M.*

tuberculosis H37Rv a las 96 fueron: IL-17 A: 45.4 pg/mL (RIC 36.7-55.7), IFN- γ : 10.1 pg/mL (RIC 7.7-14.9), TNF- α : 11.03 pg/mL (RIC 8.5-16.2), IL-10: 21.8 pg/mL (RIC 10.6- 30.05), IL-6 8280.3 pg/mL (RIC 3078.4- 14236.3), IL-4: 6.8 pg/mL (RIC 6.6-7.3), IL-2; 12.6 pg/mL (RIC 11.4-14.5) IFN- γ /IL-10: 0.64 pg/mL (RIC 0.3-1.64) y IFN- γ /IL-4: 1.44 pg/mL (RIC 1.07-2.35). La mediana de la diferencia de la concentración de citocinas al tiempo 96 hr y la concentración basal fue: IL-17A: - 11.9 pg/mL (RIC -47.8-1.1), IFN- γ 2.3 pg/ml (RIC 1.1-7.8), TNF- α : 3.9 pg/mL (RIC 1.06- 10.4), IL-10: 15.5 pg/mL (RIC 4.7- 23.9), IL-6: 8270.7 pg/mL (RIC 3070.8- 14228.3), IL-4: 0.1 pg/mL (RIC -0.2-0.6), IL-2: 1.5 pg/mL (RIC 0.5-2.3), IFN- γ /IL-10: 0.1 pg/mL (RIC 0.5-2.3) y IFN- γ /IL-4: 0.7 pg/mL (RIC -1.4-4.1). (Cuadro 3)

Se comparó la actividad bacterioestática contra la cepa *M. tuberculosis* H37Rv según los grupos de estudio. La mediana del log/UFC al tiempo 96 hr menos el control de crecimiento fue 1.37 Δ log UFC (RIC 1.19-1.38) en los sujetos TST+/IGRA+, 0.72 Δ log UFC (RIC 0.51-0.94) en los TST+/IGRA-, 0.26 Δ log UFC (RIC 0.208-1.14) en los TST-/IGRA+ y 1.06 Δ log UFC (RIC 0.409-1.34) en los TST-/IGRA- ($p=0.170$).

Se observó diferencia en la concentración de TNF- α entre los grupos de estudio en el sobrenadante en el co-cultivo a las 96 hr ($p=0.03$); la mediana de la concentración de TNF- α fue 16.9 pg/mL (RIC 14.09-21.6) en el grupo TST+/IGRA+

y de 8.2 pg/mL (RIC 7.2-11.2) en el grupo TST+/IGRA- (p - corregida <0.05).

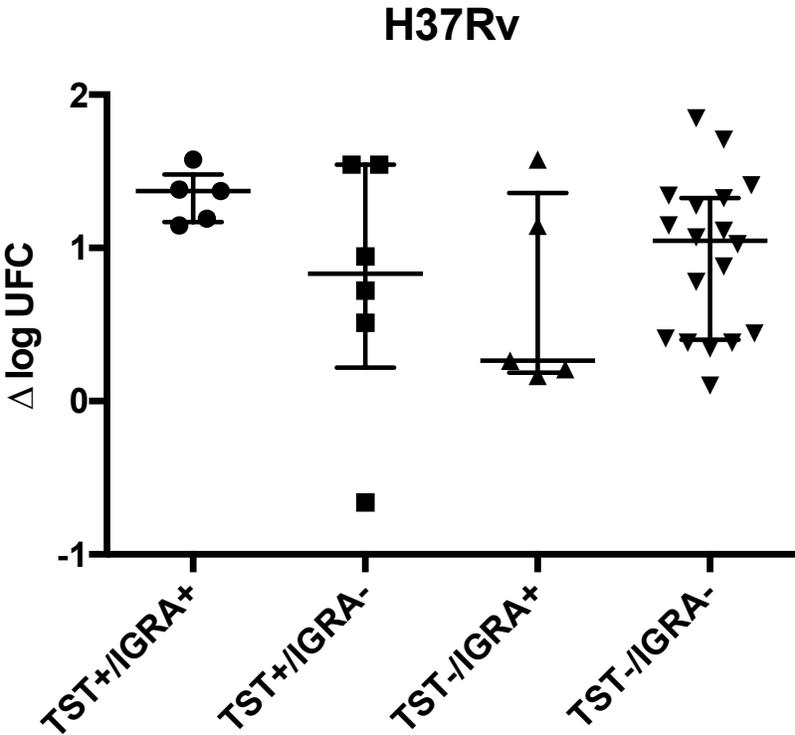
La concentración de IL-2 en el sobrenadante del co-cultivo al tiempo 96h mostró diferencia entre los cuatro grupos ($p= 0.002$); la mediana de la concentración fue 11.4 pg/mL (RIC 11.02-12.7) en los sujetos TST-/IGRA- vs. 17.2 pg/mL (RIC 15.1-19.9) en los sujetos TST+/IGRA+ (p - corregida <0.05), vs. 14.7 pg/mL (RIC 13.1-16.2) en los TST+/IGRA- (p - corregida <0.05). La diferencia en la concentración de IFN- γ pg/mL en el sobrenadante a las 96 hr del co-cultivo y la concentración basal mostró diferencia estadísticamente significativa entre los cuatro grupos ($p=0.056$); la mediana de concentración de IFN- γ fue 7.8 pg/mL (RIC 3.2- 43.2) en los sujetos TST+/IGRA+ y de 1.3 pg/mL (RIC 0.6-3.1) en los sujetos TST-/IGRA- (p - corregida <0.05). La diferencia en la concentración de IL-2 pg/mL en el sobrenadante a las 96 hr del co-cultivo y la concentración basal fue 0.7 pg/mL (RIC 0.3- 1.6) TST-/IGRA- vs. 3.2 pg/mL (RIC 2.1- 4.1) TST-/IGRA+ (p - corregida <0.05) y vs. 6.6 pg/mL (RIC 4.5- 8.3) en los sujetos TST+/IGRA+ (p - corregida <0.05). La diferencia en la concentración en la concentración IFN- γ /IL-10 en el sobrenadante a las 96 hr del co-cultivo y la concentración basal 2.3 pg/mL (RIC 2.2- 3.2) en los sujetos TST+/IGRA+ y 0.05 pg/mL (RIC 0.003-0.4) en los sujetos TST-/IGRA- (p - corregida <0.05) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados de los Ensayos de Actividad Bacterioestática en Sangre Total con la cepa *M. bovis* BCG y perfil de secreción de citocinas de acuerdo a los resultados de la prueba cutánea de tuberculina (TST) y los ensayos de liberación de interferón- γ (IGRA)

	Total	TST+/IGRA+	TST+/IGRA-	TST-/IGRA+	TST-/IGRA-	p
	Mediana (RIC 25%-75%)					
N	34	5	5	5	19	
Δ log UFC H37Rv 96h-ctrl	1.06 (0.409-1.34)	1.37 (1.19- 1.38)	0.72 (0.51- 0.94)	0.26 (0.208- 1.14)	1.06 (0.409- 1.34)	0.170
Concentración de citocinas en sobrenadante del co-cultivo 96 hr						
IL-17 A pg/mL	45.4 (39.7- 55.7)	59.4(48.1- 62.7)	38.4 (38.4- 41.8)	46.08 (41.4- 46.7)	44.8 (37.1- 60.6)	0.218
IFN-γ pg/mL	10.1 (7.7- 14.9)	14.9 (10.6- 49.5)	11.3 (7.9- 12.8)	12.5 (11.9- 25.1)	8.2 (7.2- 11.8)	0.077
TNF-α pg/mL	11.03 (8.5- 16.2)	16.2 (14.09-21.6)*	8.2 (7.2- 11.2)*	9.09 (8.8-12.3)	10.6(8.5- 17.1)	0.038
IL-10 pg/mL	21.8(10.6-30.05)	16.9 (13.8-23.6)	24.9 (23.0- 37.5)	16.1(8.03- 22.6)	21.6 (10.6-30.05)	0.683
IL-6 pg/mL	8280 (3078-14236)	8718 (7540-9982)	6378 (813- 15248)	8092 (1868- 8467)	10857 (3199- 15620)	0.593
IL-4 pg/mL	6.8 (6.6- 7.3)	6.9 (6.7- 7.3)	6.7 (6.7- 7.8)	6.6 (6.3- 7.6)	6.8 (6.6-7.2)	0.788
IL-2 pg/mL	12.6 (11.4- 14.5)	17.3 (15.1- 19.9)*	13.3 (12.5- 13.7)	14.7 (13.1- 16.2)§	11.4 (11.02- 12.7)*§	0.002
IFN-γ/IL-10	0.64 (0.30- 1.64)	1.68 (0.62- 2.09)	0.55 (0.28- 1.64)	1.55 (0.52- 1.84)	0.56 (0.28- 0.94)	0.344
IFN-γ/IL-4	1.44 (1.07- 2.35)	2.22 (1.58- 6.69)	1.44 (1.17- 1.45)	1.87 (1.64- 2.96)	1.13 (1.03- 1.87)	0.062
Concentración de Citocinas en sobrenadante del co-cultivo 96 hr menos medición basal (sin estimulación antigénica)						
IL-17 A pg/mL	-11.9 (-47.8- 1.1)	-42.1 (-73.5- -25.9)	-6.06 (-8.4- 1.1)	-2.02 (-13.04- 11.1)	-12.5 (-47.8 -2.01)	0.468
IFN-γ pg/mL	2.3 (1.1- 7.8)	7.8 (3.2- 43.2)*	3.2 (1.2- 4.1)	4.1 (2.3- 16.1)	1.3 (0.6- 3.1)*	0.056
TNF-α pg/mL	3.9 (1.06- 10.04)	9.1 (6.5- 14.4)	1.6 (1.06- 4.9)	2.7 (2.4- 5.8)	2.6 (0.9- 10.6)	0.100
IL-10 pg/mL	15.5(4.7- 23.9)	10.6 (6.9- 18.4)	18.6 (16.8- 30.8)	11.7 (2.6- 17.9)	15.2 (4.7- 23.9)	0.707
IL-6 pg/mL	8270 (3070- 14228)	8710 (7532- 9974)	6369 (2805- 15240)	8081 (1861- 8460)	10848 (3189- 15612)	0.593
IL-4 pg/mL	0.1 (-0.2- 0.6)	0 (-0.9- 0.4)	0.10 (-0.6- 0.5)	0.6 (0.3- 0.7)	0.07 (-0.07- 0.6)	0.428
IL-2 pg/mL	1.5 (0.5- 2.3)	6.6 (4.5- 8.3)§	1.5 (1.3- 1.8)	3.2 (2.1- 4.1)*	0.7 (0.3- 1.6)*§	0.007
IFN-γ/IL-10	0.1 (0.02- 2.01)	2.3 (2.2- 3.2)*	0.1 (0.03- 0.2)	1.3 (0.1- 2.01)	0.05 (0.003- 0.4)*	0.022
IFN-γ/IL-4	0.7 (-1.4- 4.1)	2.9 (0- 17.4)	2.9 (-0.2-4.1)	2.3 (-7.7- 6.08)	0.5 (-1.5- 3.9)	0.665

*§ p-correctada < 0.05, Δ log UFC H37Rv 96h- ctrl: delta del logaritmo de las unidades formadoras de colonias de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv a las 96 horas de incubación menos el control de crecimiento.

Gráfica 1. Actividad bacteriostática contra la cepa *M. tuberculosis* H37Rv de 34 sujetos sanos de acuerdo con los resultados de la prueba cutánea de tuberculina (TST) y los ensayos de liberación de interferón- γ (IGRA)



Ensayos de Actividad Bacterioestática y citocinas en el co-cultivo con la cepa *M. bovis* BCG

La mediana del Δ log UFC menos el control de crecimiento en el tiempo 96 hrs fue de 0.42 log UFC (RIC 0.04-0.77). Las concentraciones de citocinas de los sobrenadante del co-cultivo con *M. bovis* BCG a las 96 hr fueron: IL-17A: 47.08 pg/mL (RIC 37.5-69.9), IFN- γ : 7.6 pg/mL (RIC 6.6-10.2), TNF- α : 8.06 pg/mL (RIC 7.6-10.5), IL-10: 10.06 pg/mL (RIC 6.9- 16.9), IL-6: 3865.7 pg/mL (RIC 596.2-10036.4), IL-4: 6.6 pg/mL (RIC 6.3- 6.7), IL-2: 11.2 pg/mL (RIC 10.7-12.1) IFN- γ /IL-10: 0.86 pg/mL (RIC 0.47-1.2) y IFN- γ /IL-4: 1.12 pg/mL (RIC 0.99-1.49). La mediana de la diferencia de las concentraciones de citocinas al tiempo 96 hrs y las concentraciones basales fueron: IL-17A: -9.3 pg/mL (RIC -40.1-9.8), IFN- γ 0.30 pg/ml (RIC 0-1.5), TNF- α : 1.3 pg/mL (RIC 0.42-3.7), IL-10: 4.7 pg/mL (RIC 1.003-11.3), IL-6: 3856.8 pg/mL (RIC 588.07- 10028.4), IL-4: 0 pg/mL (RIC -0.52-0.37), IL-2: 0.26 pg/mL (RIC 0-0.7), IFN- γ /IL-10: 0.05 pg/mL (RIC -0.05- 0.7) y IFN- γ /IL-4: 0.26 pg/mL (RIC -0.57-2.3). (Cuadro 4)

Se comparó la actividad bacterioestática contra la cepa *M. bovis* BCG según los grupos de estudio. La mediana de Δ log UFC al tiempo 96 menos el control de crecimiento fue 0.43 Δ log UFC (RIC 0.36-0.84) en los sujetos TST+/IGRA+, 0.38 Δ log UFC (RIC -0.15-0.45) en los TST+/IGRA-, 0.52 Δ log UFC (RIC- 0.05-0.80) en los TST-/IGRA+ y 0.35 Δ log UFC (RIC 0.009-0.71) en los TST-/IGRA- ($p=0.750$). Se observó diferencia en la concentración de IL-17 A entre los grupos de estudio en el sobrenadante en el co-cultivo a las 96 hr con la cepa *M. bovis* BCG ($p=0.003$); la mediana de la concentración de IL-17 A en el grupo TST+/IGRA- fue 36.2 pg/mL (RIC 33.4- 37.5) y 61.9 pg/mL (RIC 48.08- 83.6) en el

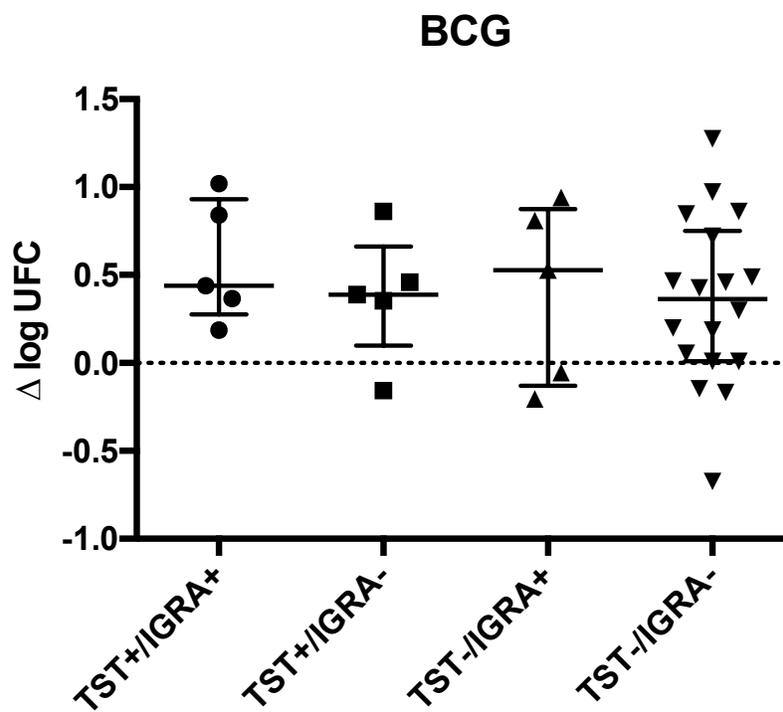
grupo TST-/IGRA- (p - corregida <0.05). Así mismo, se observaron diferencias en la concentración de IFN- γ /IL-4 entre los cuatro grupos ($p=0.51$); la mediana de la concentración en los sujetos TST-/IGRA+ fue 1.61 pg/mL (RIC 1.48-2.23) y de 1.03 pg/mL (RIC 0.98-1.45) en los sujetos TST-/IGRA- (p -corregida <0.05) (Cuadro 4)

Cuadro 4. Resultados de los Ensayos de Actividad Bacterioestática en Sangre Total con la cepa *M. bovis* BCG y perfil de secreción de citocinas de acuerdo a los resultados de la prueba cutánea de tuberculina (TST) y los ensayos de liberación de interferón- γ (IGRA)

	Total	TST+/IGRA+	TST+/IGRA-	TST-/IGRA+	TST-/IGRA-	p
	Mediana (RIC 25%-75%)					
N	34	5	5	5	19	
Δ log UFC BCG 96h- ctrl	0.40 (0.009- 0.80)	0.43 (0.36- 0.84)	0.38 (-0.15- 0.45)	0.52 (-0.05- 0.80)	0.35 (0.009- 0.71)	0.750
Concentración de citocinas en sobrenadante del co-cultivo 96 hr						
IL-17 A pg/mL	47.08 (37.5- 69.9)	44.8 (37.9- 72.2)	36.2 (33.4-37.5)*	36.8 (35.6- 39.2)§	61.9 (48.08- 83.6)*§	0.003
IFN-γ pg/mL	7.6 (6.6- 10.2)	7.7 (7.07-7.8)	10.2 (6.5- 10.7)	10.3 (9.9- 14.03)	6.8 (6.5- 8.9)	0.091
TNF-α pg/mL	8.06 (7.6- 10.5)	9.8 (8.05-14.2)	7.6 (7.4-8.08)	8.1 (6.8- 11.5)	8.05 (7.6-10.5)	0.430
IL-10 pg/mL	10.06 (6.9- 16.9)	9.6 (6.3- 19.6)	16.9 (10.6- 17.5)	8.3 (7.2- 9.1)	10.07 (6.8- 14.4)	0.413
IL-6 pg/mL	3865 (596-10036)	4511.6 (863- 6651)	4524 (1295- 11983)	2920 (471- 6459)	3219 (596- 10158)	0.878
IL-4 pg/mL	6.6 (6.3- 6.7)	6.7 (6.4- 6.7)	6.3 (6.1- 7.8)	6.3 (6.2- 6.6)	6.6 (6.4- 6.7)	0.697
IL-2 pg/mL	11.2 (10.7- 12.1)	11.2 (11.02- 11.4)	12.4 (10.8- 12.9)	11.9 (11.6- 12.3)	10.9 (10.5-11.6)	0.253
IFN-γ/IL-10	0.86 (0.47- 1.2)	0.66 (0.39-1.2)	0.63 (0.60- 0.81)	1.63 (1.38- 1.67)	0.91 (0.45- 1.15)	0.069
IFN-γ/IL-4	1.12 (0.99- 1.49)	1.14 (1.11- 1.15)	1.12 (1.04- 1.73)	1.61 (1.48- 2.23)*	1.03 (0.98- 1.45)*	0.051
Concentración de Citocinas en sobrenadante del co-cultivo 96 hr menos medición basal (sin estimulación antigénica)						
IL-17 A pg/mL	-9.3 (-40.1- 9.8)	-30.6 (-87.6- -28.1)	-10.9 (-11.1- -3.1)	-7.3 (-19.8- -4.2)	-6.3 (-40.1- 19.4)	0.638
IFN-γ pg/mL	0.30 (0- 1.50)	0.60 (0-1.50)	0.58 (-0.20- 1.0)	1.91 (0.60- 5.02)	0.20 (0- 0.71)	0.378
TNF-α pg/mL	1.3 (0.42- 3.7)	2.3 (0.8- 6.1)	1.1 (0.4- 2.8)	0.9 (0.4- 5.4)	1.5 (0.3-3.7)	0.723
IL-10 pg/mL	4.7 (1.003-11.3)	3.3 (0.99- 14.5)	11.3 (4.4-11.8)	3.2 (2.5- 4.00)	6.3 (0.58- 7.67)	0.567
IL-6 pg/mL	3856 (588-10028)	4503 (854-6643)	4516 (1286- 11977)	2912 (465- 6453)	3209 (588- 10149)	0.878
IL-4 pg/mL	0 (-0.52- 0.37)	-0.52 (-1.4- 0.37)	0.14 (-1.2-0.30)	0.14 (0-0.46)	-0.22 (-0.45- 0.29)	0.487
IL-2 pg/mL	0.26 (0- 0.7)	-0.08 (-0.35- 0.79)	0.23 (0- 0.99)	0.49 (0.33- 0.69)	0.08 (0- 0.49)	0.451
IFN-γ/IL-10	0.05(-0.05- 0.70)	0 (-0.30- 0.10)	0.05 (-0.09- 0.08)	1.25 (0.18- 2.79)	0.01 (0- 0.29)	0.211
IFN-γ/IL-4	0.26 (-0.57- 2.30)	0.69 (0- 3.07)	1.91 (0.31- 6.94)	0 (-0.24- 10.70)	0 (-0.66-1.10)	0.288

*§ p-correctada <0.05, Δ log UFC BCG 96h- ctrl: delta del logaritmo de las unidades formadoras de colonias de la cepa *M. bovis* BCG a las 96 horas de incubación menos el control de crecimiento.

Gráfica 2. Actividad bacteriostática contra la cepa *M. bovis* BCG de 34 sujetos sanos de acuerdo con los resultados de la prueba cutánea de tuberculina (TST) y los ensayos de liberación de interferón- γ (IGRA).



Concentración de citocinas en el co-cultivo de 96 hr *M. bovis* vs. *M. tuberculosis*

La mediana de la concentración de IFN- γ en el sobrenadante del co-cultivo de 96 hr con la cepa *M. tuberculosis* H37Rv fue 45.4 pg/mL (RIC 39.7- 55.7) y de 47.08 pg/mL (RIC 37.5- 69.9) con la cepa *M. bovis* BCG ($p=0.001$); la mediana de la concentración TNF- α fue 11.03 pg/mL (RIC 8.5-16.2) con la cepa *M. tuberculosis* H37Rv y 8.06 pg/mL (RIC 7.6- 10.5) con la cepa *M. bovis* BCG ($p=0.003$), la mediana de la concentración IL-10 fue 21.8 pg/mL (RIC 10.6-30.05) con la cepa *M. tuberculosis* H37Rv y 10.06 pg/mL (RIC 6.9- 16.9) con la cepa *M. bovis* BCG ($p=0.001$). La mediana de la concentración de IL-6 fue 8280.3 pg/mL (RIC 3078-14236) con la cepa *M. tuberculosis* y 3865 pg/mL (RIC 596- 10036) con la *M. bovis* BCG ($p=0.011$); la mediana de la concentración de IL-4 fue 6.8 pg/mL (RIC 6.6-7.3) con la cepa *M. tuberculosis* y 6.6 pg/mL (RIC 6.3- 6.7) con la cepa *M. bovis* BCG ($p=0.004$). La mediana de la concentración de IL-2 fue 12.6 pg/mL (RIC 11.4-14.5) con la cepa *M. tuberculosis* y 11.2 pg/mL (RIC 10.7- 12.1) con la cepa *M. bovis* BCG ($p < 0.001$) y la mediana de la concentración IFN- γ /IL-4 fue 1.44 pg/mL (RIC 1.07- 2.35) con la cepa *M. tuberculosis* y 1.12 pg/mL (RIC 0.99- 1.49) con la cepa *M. bovis* BCG ($p=0.016$) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Comparación de la concentración de citocinas en sobrenadante del co-cultivo de 96h con las cepas *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG

Citocina	H37Rv 96 hr	BCG 96 hr	p
	Mediana (RIC 25%-75%)	Mediana (RIC 25%-75%)	
N	34	34	
IL-17A pg/mL	45.4 (39.7- 55.7)	47.08 (37.5- 69.9)	0.581
IFN-γ pg/mL	10.1 (7.7- 14.9)	7.6 (6.6- 10.2)	0.001
TNF-α pg/mL	11.03 (8.5- 16.2)	8.06 (7.6- 10.5)	0.003
IL-10 pg/mL	21.8(10.6- 30.05)	10.06 (6.9- 16.9)	0.001
IL-6 pg/mL	8280 (3078- 14236)	3865 (596- 10036)	0.011
IL-4 pg/mL	6.8 (6.6- 7.3)	6.6 (6.3- 6.7)	0.004
IL-2 pg/mL	12.6 (11.4- 14.5)	11.2 (10.7- 12.1)	<0.001
IFN-γ/IL-10	0.64 (0.30- 1.64)	0.86 (0.47- 1.2)	0.612
IFN-γ/IL-4	1.44 (1.07- 2.35)	1.12 (0.99- 1.49)	0.016

DISCUSIÓN

En este trabajo mostramos los resultados preliminares, por lo cual no es posible concluir respecto algunas de las observaciones. Sin embargo, se logró observar una diferencia en la secreción de citocinas durante el co-cultivo de *M. tuberculosis* de los EABST entre los sujetos con diferentes combinaciones discordantes de TST/IGRA por lo cual, es posible que representen diferentes inmunofenotipos en el espectro de las TBL. Adicionalmente, al comparar *M. tuberculosis* con *M. bovis* BCG, se observó una respuesta más intensa de citocinas en contra de la cepa virulenta, sin embargo esto no se reflejó en una mayor actividad bacterioestática, la cual fue mayor en contra de la cepa vacunal.

Al comparar la actividad bacterioestática entre los cuatro grupos se observó una mayor inhibición del crecimiento de la micobacteria en el co-cultivo en los sujetos TST-/IGRA+ en comparación de los sujetos TST+/IGRA+ sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, probablemente debido al número de pacientes analizados. Por el contrario, se observó una menor actividad bacterioestática en el los sujetos TST+/IGRA+, a pesar de una mayor respuesta de citocinas Th1, esto pudiera estar en relación a la heterogeneidad de la respuesta del hospedero y el control de la infección a otros niveles como fagocitosis, apoptosis, polimorfismos en receptores de citocinas las cuales pudieran estarse reflejando nuevamente durante el reto *in vitro* a pesar de una respuesta Th1 más enérgica. En este mismo sentido, la secreción de IFN- γ en el co-cultivo con la cepa *M. tuberculosis* H37Rv mostró gradiente entre los grupos de estudio, (TST+/IGRA+ > TST-/IGRA+ > TST+/IGRA- > TST-/IGRA-) sin embargo

no se observó diferencia estadística. A pesar de que la secreción de IFN- γ es esencial en la respuesta en contra de micobacterias, se ha observado una pobre correlación entre los niveles de esta citocina y la protección contra TB. (20) Lo anterior se cree es debido a que esta citocina se incrementa a medida que incrementa la carga bacteriana. Así mismo, en los sujetos TST+/IGRA+ se observó una mayor concentración basal de IL-17A, la cual fue estadísticamente significativa cuando se comparó con con el grupo TST-/IGRA+. IL-17 es una citocina pro-inflamatoria producida por linfocitos T CD4+ antígeno específicos la cual puede favorecer la respuesta de memoria Th1 y que contribuye a la inflamación al atraer neutrófilos. Un estudio reciente mostró Los niveles de IL-17 se han relacionado con un efecto protector contra TB en relación un mayor reclutamiento de neutrófilos en el tejido pulmonar.(45) Así mismo, se ha demostrado una concentración de IL-17 en conversores recientes a TST en un estudio de contactos lo cual, se considera parte de un inmunofenotipo de infección reciente.(81)

De manera interesante, los sujetos TST+/IGRA+ y los TST-/IGRA+ mostraron un incremento mayor de la concentración de IL-2 posterior a la estimulación en el co-cultivo con H37Rv que el grupo TST+/IGRA- y los TST-/IGRA-. Lo anterior pudiera estar en relación a diferencias en la cantidad de células de memoria central y de memoria efectora antígeno específicas a *M. tuberculosis*. Diversos estudios han propuesto a IL-2 como un marcador de protección en contra de la infección por TB, lo anterior derivado de otros modelos de infección como es el caso de influenza y de la observación de que posterior al tratamiento de la TB activa aumenta la cantidad de células secretoras de IL-2. (32) Se ha demostrado que, las

células T que responden a los antígenos después de 24 horas (como corresponde a los IGRA) de incubación son predominante células CD4+de memoria efectoras en contraste con las células de memoria central secretan menos IFN- γ y mas IL-2. Derivado de la anterior, se ha propuesto que la razón IL-2/IFN- γ se relaciona con el aclaramiento antigénico y que por lo tanto pudiera relacionarse a un inmunofenotipo protector. (82)

La combinación discordante TST+/IGRA-, es considerada la más frecuente de acuerdo con diversos estudios poblacionales, sobre todo en países en desarrollo lo cual se ha atribuido a falsos positivos de la TST como consecuencia de vacunación con BCG, una menor respuesta a PPD durante la TST en población de edad avanzada, sin embargo estos factores que fueron controlados en los criterios de inclusión en nuestro estudio. Otra explicación para este fenómeno es que el TST a diferencia de los IGRA pueden representar una cicatriz inmunológica consecuencia de una infección remota, lo cual colocaría a estos sujetos en otro punto del espectro de la TB, es decir enfermos que montaron una respuesta adaptativa antígeno específica que pero que a diferencia de los verdaderos latentes eliminaron la totalidad de la carga bacteriana. (23, 62) Al comparar el perfil de citocinas entre el grupo TST+/IGRA- y TST+/IGRA+, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentración de IFN- γ e IL-2 lo cual indicaría diferencias en la cantidad de células antígeno-específicas o bien de memoria central o periférica. Por otro lado, si se observó tendencia hacia una mayor producción de IL-10 y posiblemente en consecuencia menor producción de TNF- α en comparación con el grupo TST+/IGRA+. Contrario a lo observado en este estudio niveles elevados de IL-10 se han relacionado con fenómenos de

energía a TST y a una mayor susceptibilidad la infección.(83) Sin embargo, existe cada vez más evidencia que sugiere que la relación entre las citocinas Th1 y IL-10 no es tan antagónica como se creía en un inicio y que estas citocinas pudieran complementarse durante los procesos infecciosos evitando el daño tisular.(36) Un estudio reciente observó un aumento en los niveles de IL-10 en pacientes posterior al tratamiento exitoso de la TB sin embargo, este fenómeno solo ha sido observado en pacientes con TBA.(84)

Otro fenómeno que pudiera explicar la combinación discrepante TST+/IGRA-, es la reversión frecuente de los IGRA, la cual se presenta hasta en 30% de los pacientes con IGRA inicialmente positivo. Sin embargo esto se ha observado con mayor frecuencia en pacientes con TST con poca induración o en los que permanecen TST. Algunas de estas reversiones se han explicado por el aclaramiento de la infección sea espontánea o con tratamiento, de hecho se ha propuesto a los IGRA como un marcador de seguimiento en el tratamiento de distintas formas de TB. Algunas otras se pueden atribuir a variaciones biológicas o variabilidad en los procesos de laboratorio.(85) Otros autores sugieren que las respuesta a IGRA son inherentemente transitorias y que requieren exposición continua a los antígenos de TB para mantenerse positivas.(86) También se ha argumentado estas diferencias indican variaciones en el ciclo de vida del bacilo, durante el cual son secretados otros tipos de antígenos sin embargo lo anterior no ha sido demostrado.(85) Todo lo anterior apoya la posibilidad que el fenotipo TST+/IGRA- corresponda a los individuos que aclararon la infección mediante la inmunidad adquirida y que por lo tanto, tienen un menor riesgo de reactivación y en todo caso no requieren de tratamiento con isoniacida en caso de no ocurrir una

reinfección.

A diferencia de lo observado con *M. tuberculosis* H37Rv, la actividad bacterioestática entre los grupos se observó más uniforme con la cepa *M. bovis* BCG, sin embargo es evidente que la $\Delta \log$ UFC fue menor lo cual demuestra una mayor capacidad para contener el crecimiento de esta cepa entre los sujetos estudiados. El efecto de la viruencia de las cepas en los fenómenos de latencia y progresión a la enfermedad son conocidos. Por otro lado, se conoce que la ausencia de la region de diferencia 1 (RD1) en *M. bovis* BCG, condiciona la perdida de componentes inmunogénicos y de virulencia importantes como ESAT-6 la cual juega un papel crucial en permitir la sobrevivencia y replicación intracelular del bacilo, lo cual durante la infección estimula y amplifica la secreción de IFN- γ lo cual pudiera explicar también una menor concentración de citocinas en el co-cultivo al compararla con *M. tuberculosis* H37Rv. De manera interesante, la respuesta a IL-2 respecto a la basal tras la estimulación con BCG fue mucho menor los grupos con alguna prueba positiva en comparación con *M. tuberculosis* H37Rv lo cual ayuda a descartar el efecto de BCG como falso positivo de las pruebas, sino que pudiera representar una mayor respuesta antígeno específica por H37Rv.

Como principal limitación del estudio debemos señalar que no se alcanzó el tamaño de muestra suficiente para mostrar diferencias entre los grupos de estudio, lo anterior debido a lo estricto de los criterios de inclusión y lo poco frecuente de las combinaciones discordantes. A este respecto, el poder estadístico entre los grupos TST+/IGRA+ y TST-/IGRA- (grupos extremos), fue de 42.8%. Debemos señalar que durante el desarrollo del proyecto, hubo escasez a nivel mundial de

algunos de los insumos (tubos MGIT, PPD), lo cual redujo importantemente el tiempo de reclutamiento. Por otro lado, solo en el 88% de los sujetos se visualizó la cicatriz de BCG y el resto refirieron el antecedente. Por lo anterior es posible que esta variable haya tenido sesgo de memoria y que algunos de los sujetos eliminados del estudio hubieran podido ser incluidos o bien, que alguno de los que refirió el antecedente de vacunación sin cicatriz visible hubiera sido vacunado en realidad. Otra de las limitantes fue el kit empleado para la detección de citocinas el cual no incluyó la detección de IL-12, la cual es considerada esencial en la respuesta a TB. Y finalmente, no se ha completado la fase de identificación de células inmunológicas responsables de la secreción de citocinas, lo anterior es relevante debido a que la identificación de estos inmunofenotipos permitiría realizar mejores inferencias respecto al efecto de las combinaciones discrepantes y la actividad bacterioestática. Finalmente, el modelo de los EABST no permite ajustar de manera individual la carga bacilar, por lo que no descartamos que el sistema haya sido sobresaturado y pudiera ser menos representativo de la respuesta inmune al reto que ocurre naturalmente durante la exposición con el bacilo.

CONCLUSIONES

En conclusión, el presente análisis indica que en una población endémica para TB y con política de vacunación con BCG solo para la infancia, las discrepancias entre TST e IGRA indican diferentes inmunofenotipos en el espectro de la TBL. El análisis de los resultados nos permite inferir que es posible que exista una diferente actividad bacterioestática en los sujetos con la combinación TST-/IGRA+.

Lo anterior, puede ayudar a priorizar el tratamiento con isoniacida y de esta manera disminuir costos administran a los pacientes en mayor riesgo de progresión a TBA. Sin embargo es necesario analizar más sujetos para realizar conclusiones.

Bibliografía

1. Dheda K, Barry CE, 3rd, Maartens G. Tuberculosis. *Lancet*. 2015.
2. Global tuberculosis control: key findings from the December 2009 WHO report. *Wkly Epidemiol Rec*.85(9):69-80. Epub 2010/03/10.
3. WHO Tb country profile: Mexico 2010.
4. Ahmad S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:814943.
5. Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. *Lancet*. 2003;362(9387):887-99.
6. Teitelbaum R, Schubert W, Gunther L, Kress Y, Macaluso F, Pollard JW, et al. The M cell as a portal of entry to the lung for the bacterial pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity*. 1999;10(6):641-50.
7. Tufariello JM, Chan J, Flynn JL. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(9):578-90.
8. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP. The immune response in tuberculosis. *Annual review of immunology*. 2013;31:475-527.
9. Gideon HP, Flynn JL. Latent tuberculosis: what the host "sees"? *Immunologic research*. 2011;50(2-3):202-12. Epub 2011/07/01.
10. Chackerian AA, Alt JM, Perera TV, Dascher CC, Behar SM. Dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* is influenced by host factors and precedes the initiation of T-cell immunity. *Infection and immunity*. 2002;70(8):4501-9.
11. da Silva MV, Tiburcio MG, Machado JR, Silva DA, Rodrigues DB, Rodrigues V, et al. Complexity and Controversies over the Cytokine Profiles of T Helper Cell Subpopulations in Tuberculosis. *Journal of immunology research*. 2015;2015:639107.
12. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell*. 2004;119(6):753-66.
13. Choi HS, Rai PR, Chu HW, Cool C, Chan ED. Analysis of nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in human pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(2):178-86.
14. Green AM, Difazio R, Flynn JL. IFN-gamma from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*. 2013;190(1):270-7.
15. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *The Journal of experimental medicine*. 1993;178(6):2243-7. Epub 1993/12/01.
16. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The Journal of experimental medicine*. 1993;178(6):2249-54.
17. Nunes-Alves C, Booty MG, Carpenter SM, Jayaraman P, Rothchild AC, Behar SM. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. *Nature reviews Microbiology*. 2014;12(4):289-99.

18. Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annual review of immunology*. 2002;20:581-620.
19. Caccamo N, Guggino G, Joosten SA, Gelsomino G, Di Carlo P, Titone L, et al. Multifunctional CD4(+) T cells correlate with active Mycobacterium tuberculosis infection. *European journal of immunology*. 2010;40(8):2211-20. Epub 2010/06/12.
20. Hanekom WA, Abel B, Scriba TJ. Immunological protection against tuberculosis. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde*. 2007;97(10 Pt 2):973-7. Epub 2007/11/15.
21. Wallis RS. Tumour necrosis factor antagonists: structure, function, and tuberculosis risks. *Lancet Infect Dis*. 2008;8(10):601-11.
22. Ly LH, McMurray DN. The Yin-Yang of TNFalpha in the guinea pig model of tuberculosis. *Indian journal of experimental biology*. 2009;47(6):432-9.
23. Dutta NK, Karakousis PC. Latent tuberculosis infection: myths, models, and molecular mechanisms. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2014;78(3):343-71.
24. Wallis RS, Broder MS, Wong JY, Hanson ME, Beenhouwer DO. Granulomatous infectious diseases associated with tumor necrosis factor antagonists. *Clin Infect Dis*. 2004;38(9):1261-5.
25. Harris J, Keane J. How tumour necrosis factor blockers interfere with tuberculosis immunity. *Clinical and experimental immunology*. 2010;161(1):1-9.
26. Lin PL, Myers A, Smith L, Bigbee C, Bigbee M, Fuhrman C, et al. Tumor necrosis factor neutralization results in disseminated disease in acute and latent Mycobacterium tuberculosis infection with normal granuloma structure in a cynomolgus macaque model. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(2):340-50.
27. Botha T, Ryffel B. Reactivation of latent tuberculosis infection in TNF-deficient mice. *J Immunol*. 2003;171(6):3110-8.
28. Bekker LG, Moreira AL, Bergtold A, Freeman S, Ryffel B, Kaplan G. Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose dependent. *Infection and immunity*. 2000;68(12):6954-61.
29. Bekker LG, Maartens G, Steyn L, Kaplan G. Selective increase in plasma tumor necrosis factor-alpha and concomitant clinical deterioration after initiating therapy in patients with severe tuberculosis. *J Infect Dis*. 1998;178(2):580-4.
30. Saunders BM, Frank AA, Orme IM, Cooper AM. Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to Mycobacterium tuberculosis infection. *Infection and immunity*. 2000;68(6):3322-6. Epub 2000/05/19.
31. Streitz M, Tesfa L, Yildirim V, Yahyazadeh A, Ulrichs T, Lenkei R, et al. Loss of receptor on tuberculin-reactive T-cells marks active pulmonary tuberculosis. *PLoS one*. 2007;2(8):e735. Epub 2007/08/22.
32. Millington KA, Innes JA, Hackforth S, Hinks TS, Deeks JJ, Dosanjh DP, et al. Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells and antigen load. *J Immunol*. 2007;178(8):5217-26. Epub 2007/04/04.
33. Erb KJ, Kirman J, Delahunt B, Chen W, Le Gros G. IL-4, IL-5 and IL-10 are not required for the control of M. bovis-BCG infection in mice. *Immunology and cell biology*. 1998;76(1):41-6. Epub 1998/04/29.
34. Mocellin S, Marincola F, Rossi CR, Nitti D, Lise M. The multifaceted

relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. *Cytokine & growth factor reviews*. 2004;15(1):61-76.

35. Powrie F, Coffman RL. Inhibition of cell-mediated immunity by IL4 and IL10. *Research in immunology*. 1993;144(8):639-43. Epub 1993/10/01.

36. Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, Goldszmid RS, Collazo CM, Wilson M, et al. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(2):273-83. Epub 2007/02/07.

37. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature*. 2002;420(6915):502-7.

38. Hernandez-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavon L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, et al. Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*. 1996;89(1):26-33. Epub 1996/09/01.

39. Howard AD, Zwilling BS. Reactivation of tuberculosis is associated with a shift from type 1 to type 2 cytokines. *Clinical and experimental immunology*. 1999;115(3):428-34. Epub 1999/04/08.

40. Sugawara I, Yamada H, Mizuno S, Iwakura Y. IL-4 is required for defense against mycobacterial infection. *Microbiology and immunology*. 2000;44(12):971-9. Epub 2001/02/28.

41. Sanchez FO, Rodriguez JI, Agudelo G, Garcia LF. Immune responsiveness and lymphokine production in patients with tuberculosis and healthy controls. *Infection and immunity*. 1994;62(12):5673-8. Epub 1994/12/01.

42. Portoukalian J, Bugand M, Zwingelstein G, Precausta P. Comparison of the lipid composition of rabies virus propagated in Nil 2 cells maintained in monolayer versus spinner culture. *Biochimica et biophysica acta*. 1977;489(1):106-18. Epub 1977/10/24.

43. Lin Y, Zhang M, Hofman FM, Gong J, Barnes PF. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infection and immunity*. 1996;64(4):1351-6. Epub 1996/04/01.

44. Torrado E, Cooper AM. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. *Cytokine & growth factor reviews*. 2010;21(6):455-62. Epub 2010/11/16.

45. Khader SA, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine*. 2008;41(2):79-83. Epub 2008/01/26.

46. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nature immunology*. 2007;8(4):369-77. Epub 2007/03/14.

47. Nandi B, Behar SM. Regulation of neutrophils by interferon-gamma limits lung inflammation during tuberculosis infection. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(11):2251-62. Epub 2011/10/05.

48. Gopal R, Lin Y, Obermajer N, Slight S, Nuthalapati N, Ahmed M, et al. IL-23-dependent IL-17 drives Th1-cell responses following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. *European journal of immunology*. 2012;42(2):364-73. Epub 2011/11/22.

49. Ahmad S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent

- Mycobacterium tuberculosis infection. Clin Dev Immunol.2011;814943. Epub 2011/01/15.
50. 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. Epub 2009/10/27.
 51. Miranda C, Tomford JW, Gordon SM. Interferon-gamma-release assays: Better than tuberculin skin testing? Cleve Clin J Med.77(9):606-11. Epub 2010/09/03.
 52. Jasmer RM, Nahid P, Hopewell PC. Clinical practice. Latent tuberculosis infection. N Engl J Med. 2002;347(23):1860-6. Epub 2002/12/06.
 53. Pai M, Riley LW, Colford JM, Jr. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. Lancet Infect Dis. 2004;4(12):761-76. Epub 2004/11/30.
 54. Rangaka MX, Wilkinson KA, Glynn JR, Ling D, Menzies D, Mwansa-Kambafwile J, et al. Predictive value of interferon-gamma release assays for incident active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2012;12(1):45-55. Epub 2011/08/19.
 55. Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. Ann Intern Med. 2008;149(3):177-84. Epub 2008/07/03.
 56. Mazurek GH, Jereb J, Vernon A, LoBue P, Goldberg S, Castro K. Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect Mycobacterium tuberculosis infection - United States, 2010. MMWR Recomm Rep. 2010;59(RR-5):1-25. Epub 2010/06/26.
 57. Denkinger CM, Dheda K, Pai M. Guidelines on interferon-gamma release assays for tuberculosis infection: concordance, discordance or confusion? Clin Microbiol Infect. 2011;17(6):806-14. Epub 2011/06/21.
 58. Rangaka MX, Wilkinson KA, Glynn JR, Ling D, Menzies D, Mwansa-Kambafwile J, et al. Predictive value of interferon-gamma release assays for incident active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2011. Epub 2011/08/19.
 59. Dheda K, van Zyl Smit R, Badri M, Pai M. T-cell interferon-gamma release assays for the rapid immunodiagnosis of tuberculosis: clinical utility in high-burden vs. low-burden settings. Curr Opin Pulm Med. 2009;15(3):188-200. Epub 2009/04/24.
 60. Nienhaus A, Schablon A, Diel R. Interferon-gamma release assay for the diagnosis of latent TB infection--analysis of discordant results, when compared to the tuberculin skin test. PloS one. 2008;3(7):e2665. Epub 2008/07/17.
 61. Machado A, Jr., Emodi K, Takenami I, Finkmoore BC, Barbosa T, Carvalho J, 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. Epub 2009/04/02.
 62. Kang JS, Cherian A, Gan SH, Lee TH, Lee KC, Chee CB, et al. Strong purified protein derivative responses are associated with poor mycobacterium inhibition in latent TB. Eur Respir J.36(2):348-54. Epub 2009/12/10.
 63. Jereb J, Etkind SC, Joglar OT, Moore M, Taylor Z. Tuberculosis contact investigations: outcomes in selected areas of the United States, 1999. Int J Tuberc

Lung Dis. 2003;7(12 Suppl 3):S384-90.

64. Lin PL, Flynn JL. Understanding latent tuberculosis: a moving target. *J Immunol*. 2010;185(1):15-22.

65. Shinnick TM. Diagnostic test needs for evaluating antituberculosis vaccines. *Clin Infect Dis*. 2000;30 Suppl 3:S276-8. Epub 2000/06/30.

66. Kampmann B, Tena GN, Mzazi S, Eley B, Young DB, Levin M. Novel human in vitro system for evaluating antimycobacterial vaccines. *Infection and immunity*. 2004;72(11):6401-7. Epub 2004/10/27.

67. Hoft DF, Worku S, Kampmann B, Whalen CC, Ellner JJ, Hirsch CS, 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(10):1448-57. Epub 2002/10/31.

68. Tena GN, Young DB, Eley B, Henderson H, Nicol MP, Levin M, 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(10):1544-51. Epub 2003/05/02.

69. Kampmann B, Gaora PO, Snewin VA, Gares MP, Young DB, Levin M. Evaluation of human antimycobacterial immunity using recombinant reporter mycobacteria. *J Infect Dis*. 2000;182(3):895-901.

70. Saliu OY, Sofer C, Stein DS, Schwander SK, Wallis RS. Tumor-necrosis-factor blockers: differential effects on mycobacterial immunity. *J Infect Dis*. 2006;194(4):486-92. Epub 2006/07/18.

71. Wallis RS, Vinhas SA, Johnson JL, Ribeiro FC, Palaci M, Peres RL, et al. Whole blood bactericidal activity during treatment of pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis*. 2003;187(2):270-8. Epub 2003/01/29.

72. Martineau AR, Wilkinson RJ, Wilkinson KA, Newton SM, Kampmann B, Hall BM, et al. A single dose of vitamin D enhances immunity to mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(2):208-13. Epub 2007/04/28.

73. Wallis RS, Wang C, Doherty TM, Onyebujoh P, Vahedi M, Laang H, et al. Biomarkers for tuberculosis disease activity, cure, and relapse. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(2):68-9. Epub 2010/02/02.

74. Walzl G, Ronacher K, Hanekom W, Scriba TJ, Zumla A. Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(5):343-54. Epub 2011/04/09.

75. Cheon SH, Kampmann B, Hise AG, Phillips M, Song HY, Landen K, et al. Bactericidal activity in whole blood as a potential surrogate marker of immunity after vaccination against tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9(4):901-7. Epub 2002/07/03.

76. Wallis RS, Jakubiec W, Mitton-Fry M, Ladutko L, Campbell S, Paige D, 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(1):e30479. Epub 2012/01/27.

77. Wallis RS, Jakubiec WM, Kumar V, Silvia AM, Paige D, Dimitrova 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(5):745-51. Epub 2010/07/16.

78. Wallis RS, Vinhas S, Janulionis E. Strain specificity of antimycobacterial immunity in whole blood culture after cure of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009;89(3):221-4. Epub 2009/03/27.
79. Kuleshova LL, Shaw JM, Trounson AO. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology*. 2001;43(1):21-31. Epub 2002/01/29.
80. Silva D, Ponte CG, Hacker MA, Antas PR. A whole blood assay as a simple, broad assessment of cytokines and chemokines to evaluate human immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Acta tropica*. 2013;127(2):75-81.
81. Buchwald UK, Adetifa IM, Bottomley C, Owiafe PK, Donkor S, Bojang AL, et al. Broad adaptive immune responses to *M. tuberculosis* antigens precede TST conversion in tuberculosis exposed household contacts in a TB-endemic setting. *PLoS one*. 2014;9(12):e116268. Epub 2014/12/31.
82. Gourgouillon N, de Lauzanne A, Cottart CH, Curis E, Debord C, Guerin-El Khourouj V, et al. TNF-alpha/IL-2 ratio discriminates latent from active tuberculosis in immunocompetent children: a pilot study. *Pediatric research*. 2012;72(4):370-4. Epub 2012/07/17.
83. Yan L, Cui H, Xiao H, Zhang Q. Anergic pulmonary tuberculosis is associated with contraction of the Vd2+T cell population, apoptosis and enhanced inhibitory cytokine production. *PLoS one*. 2013;8(8):e71245. Epub 2013/08/13.
84. da Silva MV, Figueiredo AA, Machado JR, Castellano LC, Alexandre PB, Oliveira RF, et al. T Cell Activation and Proinflammatory Cytokine Production in Clinically Cured Tuberculosis Are Time-Dependent and Accompanied by Upregulation of IL-10. *PLoS one*. 2013;8(6):e65492. Epub 2013/07/05.
85. Pai M, O'Brien R. Serial testing for tuberculosis: can we make sense of T cell assay conversions and reversions? *PLoS medicine*. 2007;4(6):e208. Epub 2007/06/15.
86. Hill PC, Brookes RH, Fox A, Jackson-Sillah D, Jeffries DJ, Lugos MD, et al. Longitudinal assessment of an ELISPOT test for *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS medicine*. 2007;4(6):e192. Epub 2007/06/15.