

**Tuberculosis pulmonar:
Diagnóstico microbiológico y su control**

Trabajo Fin de Grado
Curso 2022-2023

Daniel Ángel Benítez de Lugo Domínguez

Tutora: Laila Moujir Moujir

Índice

□	Glosario de términos.....	3
□	Resumen:	4
□	Abstract:.....	5
□	Introducción.....	6
□	Objetivos.....	7
□	Metodología.....	7
□	Resultados y discusión.....	8
-	Estructura y morfología.....	8
-	Fisiopatología	8
-	Tuberculosis y VIH	11
-	Diagnóstico.....	12
-	Tratamiento.....	16
-	Resistencia a fármacos.....	19
-	Profilaxis.....	20
□	Conclusiones.....	23
□	Bibliografía.....	24

▪ **Glosario de términos**

ATB: Tuberculosis activa.

BAARs: Bacilos ácido alcohol-resistentes.

ILTB: Infección latente por tuberculosis.

INH: Isoniacida.

PTB: Tuberculosis pulmonar.

TAR: Tratamiento antirretroviral.

TB: Tuberculosis.

TBA: Tuberculosis activa.

T-SPOT.TB: Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay Tuberculosis Test.

MBT: *Mycobacterium tuberculosis*.

QFR-GIT: QuantiFERON Tuberculosis Gold In-Tube Test.

RIF: Rifampicina.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

- **Resumen:**

Mycobacterium tuberculosis es el agente etiológico de la tuberculosis, que afecta principalmente a los pulmones, aunque se puede diseminar a otros órganos (tuberculosis extrapulmonar). Es una enfermedad compleja y transmisible con elevadas tasas de comorbilidad y mortalidad. Puede afectar a cualquier persona, pero existen grupos de población más vulnerables, como las personas con VIH, ancianos, niños y personas que padecen de enfermedades crónicas como la diabetes. También existen factores socioeconómicos que aumentan el riesgo de contraer la enfermedad, como la pobreza, el hacinamiento y la falta de acceso a servicios de salud.

A pesar de que se puede prevenir y curar, la tuberculosis sigue siendo una de las enfermedades transmisibles con mayor mortalidad a nivel global. En el año 2021 se estima se infectaron 10,6 millones de personas, de las cuales 6,4 millones fueron diagnosticadas. Murieron 1,6 millones de personas de las cuales 187.000 de ellas estaban infectadas por VIH.

El diagnóstico temprano y el tratamiento oportuno son fundamentales para el control de la tuberculosis y evitar la propagación de la enfermedad en las comunidades y la aparición de cepas resistentes. Tomando especial importancia el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico que permitan además de obtener un resultado positivo, discriminar entre la enfermedad activa y la latente, siendo clave el tratamiento de esta última para evitar nuevos contagios. Hoy en día, la tuberculosis farmacorresistente plantea un desafío inmenso para el control de la enfermedad.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, diagnóstico, tratamiento, vacuna.

▪ **Abstract:**

Mycobacterium tuberculosis is the etiological agent of tuberculosis, which affects the lungs primarily, although it can disseminate to other organs (extrapulmonary tuberculosis). It's a highly transmissible and complex disease, with high rates of morbidity and mortality. It can affect the general population, even though some groups are at greater risk, such as patients with HIV, old people, children, and those living with chronic illnesses like diabetes. Also, lower socioeconomic status increases the risk of developing tuberculosis, like those living in poverty, in overcrowded spaces and lacking healthcare accessibility.

Even though tuberculosis is preventable and treatable, it's still one of the leading causes of death globally. It's estimated that in 2021, 10,6 million people got infected, of which 6,4 million got a diagnosis. Around 1,6 million people died, of which 187.000 were also infected by HIV.

Early diagnosis and optimal treatment are fundamental for tuberculosis control, preventing the spread of the disease within the community and drug resistance. We need new diagnosis methods that differentiate between active and latent tuberculosis, being the main concern the treatment of the latter to avoid new infections. At the present time, drug resistant TB hinders the efforts to control the disease.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, diagnosis, treatment, vaccine.

▪ **Introducción**

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*, se transmite por el aire y afecta principalmente a los pulmones. Bajo ciertas condiciones puede diseminarse y afectar a otros órganos, lo que es conocido como tuberculosis extrapulmonar. Esta enfermedad ha sido conocida por la humanidad desde la antigüedad, y en la época medieval se le conocía como la “peste blanca” debido al aspecto blanquecino.^[1]

El responsable del descubrimiento de la micobacteria fue Robert Koch (1882), lo que le valió el Premio Nobel en 1905. En 1908, el mismo Koch desarrolla la tuberculina en colaboración con el veterinario Camille Guérin, un derivado proteico purificado estándar del bacilo (también denominado PPD) que creía útil como agente inmunizante, pero fue Charles Mantoux quien perfeccionaría el método para administrar por vía intradérmica, como método diagnóstico.^[2]

A pesar de que esta enfermedad acompaña a la humanidad desde hace miles de años, y casi se consigue su eliminación en Occidente. Tras la epidemia del VIH a finales de los años ochenta, junto al aumento de los fenómenos migratorios, su control ha recuperado más importancia que nunca.^[1,3] En la actualidad se cuenta con la vacuna del bacilo de Calmette-Guérin (BCG) que tras más de un siglo es la única vacuna en uso. Los factores que dificultan el desarrollo de nuevas vacunas son; el escaso apoyo económico y la ausencia de biomarcadores que permitan estimar el riesgo de desarrollar la enfermedad y el nivel de protección. Por otro lado, teniendo en cuenta el controvertido nivel de protección de la BCG en adultos, incapaz de ponerle freno a la enfermedad, es preciso resaltar la necesidad de una vacuna que reemplace la actual, y la mejora de los tratamientos y métodos de diagnóstico.^[4,5]

▪ **Objetivos**

Teniendo en cuenta los antecedentes anteriormente descritos, el presente trabajo se trata de una revisión bibliográfica, con el objetivo de:

- Analizar el agente etiológico de la tuberculosis, profundizar sobre su patogenia y las limitaciones que presenta su diagnóstico y como superarlas.
- Evaluar los medicamentos utilizados en el tratamiento, así como las dificultades que suponen las resistencias a fármacos antituberculosos.
- Examinar las nuevas vacunas en desarrollo y comprender las condiciones que impiden el control de la enfermedad.

▪ **Metodología**

Para lograr los objetivos anteriormente descritos se ha realizado una revisión bibliografía de diversos artículos científicos. Para la búsqueda de los artículos se utilizaron plataformas como Google Académico, bases de datos como Pubmed y Web of Science y paginas oficiales como CDC, OMS y Ministerio de Sanidad. Para esta revisión se han utilizado artículos encontrados en las bases de datos mencionadas, cuya fecha de publicación fuese desde 2000 hasta la actualidad, tanto en inglés como en español, y que se pudiera consultar el texto completo. Descartándose artículos que no fueran relevantes para este trabajo, como los que tratan de las formas extrapulmonares y sobre fármacos en fase preclínica. Empleando las siguientes palabras claves: *Mycobacterium tuberculosis*, pulmonary tuberculosis, virulence, physiopathology, vaccine, granuloma, drug resistance, diagnosis, vaccine development y treatment.

▪ **Resultados y discusión**

- **Estructura y morfología**

MTB es un bacilo recto o ligeramente curvo y delgado, aerobio estricto, inmóvil y no esporulado de crecimiento lento. Son ácido-alcohol resistentes, propiedad que se le atribuye a la composición de su pared celular, rica en lípidos (Figura 1). Se clasifica dentro del complejo *M. tuberculosis* que engloba a un grupo de micobacterias con >95% de homología en su ADN, entre las que se encuentra además de ésta otras micobacterias patógenas en humanos, como *M. leprae*, *M. africanum* (principal causante de la TB en África tropical), *M. bovis* y *M. bovis* (cepas del bacilo de Calmette- Guerin, BCG).^[1,6]

Un año tras el descubrimiento del bacilo por Koch, en pacientes con tuberculosis, se encontraron formas no replicativas de MTB, las cuales habían perdido la ácido-alcohol resistencia. Para que tenga lugar la evolución a la forma no replicativa, es necesario una serie de cambios metabólicos que modifiquen la composición de la pared celular y que induzcan la acumulación de inclusiones intracelulares de lípidos, en su mayoría de triacilglicerol, que serán de vital importancia en la reactivación y replicación ya que servirán como fuente de carbono y energía. Este fenómeno se conoce como la paradoja de Koch, en el que en un mismo paciente conviven formas replicativas y no replicativas del bacilo con diferentes características que afectan al diagnóstico.^[10]

- **Fisiopatología**

La tuberculosis puede ocurrir en tres etapas: Infección primaria, latente y activa. La infección por MTB ocurre al inhalar los bacilos, que se encuentran en las gotas generadas cuando una persona infectada tose o estornuda. En los pulmones son fagocitados por los macrófagos alveolares donde se multiplican y acaban destruyéndolos en colaboración con LTCD8⁺ (Figura 2). Se induce una respuesta proinflamatoria, con la secreción de citosinas, IL-10, TNF- α y el consecuente reclutamiento de otras células mononucleares. Algunos macrófagos infectados, se diseminan por vía hematogena, aunque es poco probable si se tiene inmunidad por vacunación o tras infección natural. En especial se ven afectados los pulmones, huesos largos, riñones, cuerpos vertebrales y meninges, donde pueden sobrevivir durante años (infección latente). Por otra parte, el balance entre resistencia del huésped y la virulencia del microorganismo determina la

posibilidad de que la infección resuelva sin tratamiento, permanezca latente o se active.^[11]

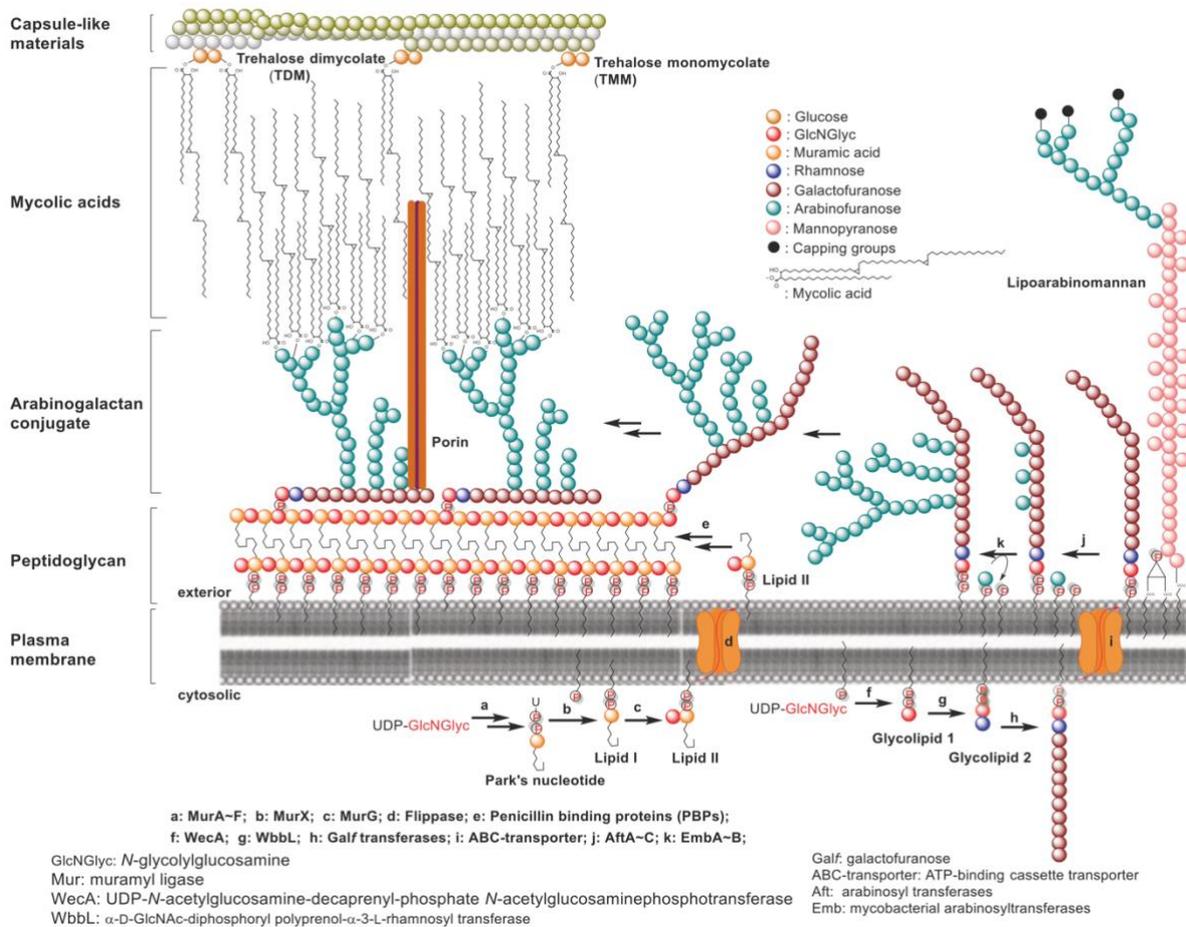


Figura 1. Pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*. Se caracteriza por su complejidad, y alto contenido en lípidos (60%). Se puede dividir en dos segmentos. El segmento inferior; que se encuentra sobre la membrana, está compuesto por una delgada capa de peptidoglicano, unida covalentemente a una capa de arabinogalactano, que a su vez esta esterificada con ácidos micólicos, los cuales están compuestos entre 70-90 átomos de carbono. A este segmento se le denomina complejo micolilarabinogalactano-peptidoglicano (mAGP). El segmento superior; está en la parte más externa, compuesta por lípidos libres como micósidos, sulfolípidos y glucopeptidolípidos.^[6,7,8] Tomada de Tuberculosis host-pathogen interactions. Springer International Publishing.^[9]

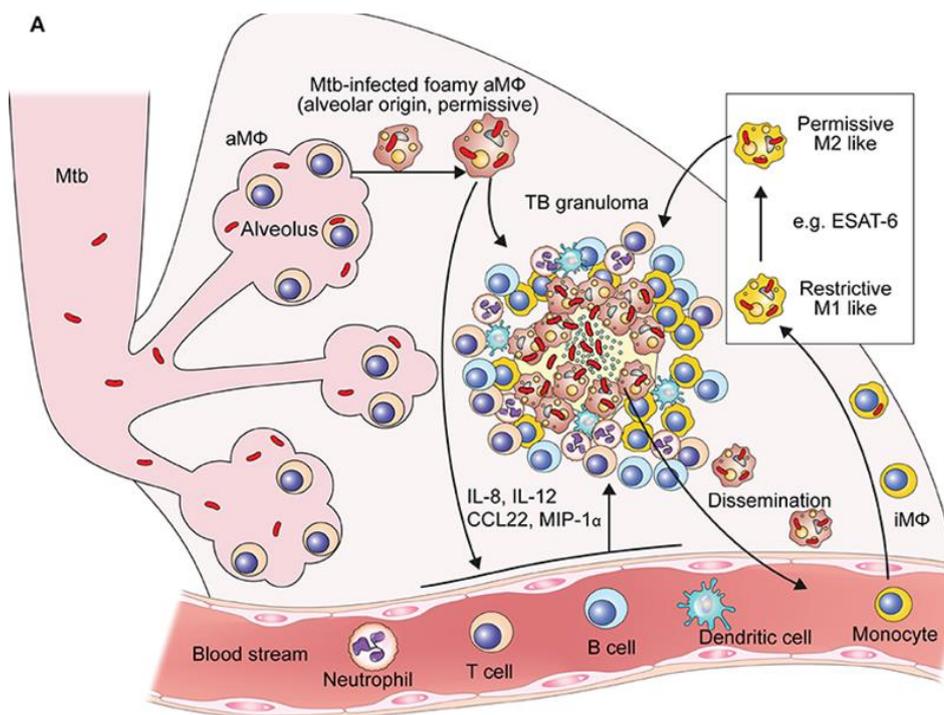


Figura 2. Fisiopatología de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Uno de los mecanismos principales que están implicados en la patogenia de la enfermedad es la respuesta inmunitaria celular donde participan los linfocitos-T, la cual brinda protección frente a patógenos intracelulares como MTB. Las células responden a los antígenos proteicos de los microorganismos fagocitados, presentados por los macrófagos como péptidos asociados a moléculas de MHC-I, lo que contribuye a su diferenciación a células efectoras Th1, bajo la influencia de la IL-12, que secretan IFN- γ , que estimula la producción de diversas sustancias microbicidas. En la mayoría de los casos, el MTB producirá infección latente por tuberculosis, debido a una eficaz activación de los macrófagos estimulados por células T, lo que propicia la formación de granulomas alrededor de los microorganismos y por tanto focaliza y evita su diseminación, pero, además les ofrece un ambiente donde permanecer latentes. El granuloma está formado por un núcleo de macrófagos infectados, rodeado por células gigantes y delineando el exterior linfocitos. Sin embargo, la respuesta inflamatoria granulomatosa está asociada a deterioro funcional debido a la necrosis y fibrosis tisulares acompañantes, situación en la que se vierten bacilos viables a las vías respiratorias con la consecuente diseminación, de estos. Sólo una minoría de los sujetos expuestos (probablemente <10%) desarrollan TBA, que esta propiciada por alteraciones de sistema inmune, como puede ser la infección por VIH.^[12,13] Tomada de *Mycobacterium tuberculosis* infection-driven foamy macrophages and their implications in tuberculosis control as targets for host-directed therapy. *Frontiers in Immunology*.^[14]

MTB presenta una serie de propiedades que son las que le confieren la capacidad de producir enfermedad, conocidos como factores de virulencia (Tabla 1), son fundamentales para que tenga lugar la infección.^[15]

Tabla 1. Factores de virulencia de *M. tuberculosis*.^[1,6,15]

Cord factor	Es uno de los lípidos más abundantes en MTB, compuesto por un disacárido, la trehalosa unida a dos cadenas de ácidos grasos. Su presencia en la superficie de la bacteria es imprescindible para su supervivencia dentro de los macrófagos. Estimula receptores de lectina tipo-C, como el Mincle y además, cuando interacciona con agua forma estructuras que tendrían importancia en su protección.
Sulfolípidos	Son glucolípidos que están implicados en la inhibición del desarrollo de los fagosomas.
Micobactinas y exoquelinas	Son sideróforos necesarios para su crecimiento. Las exoquelinas se unen al hierro extracelular y las micobactinas presentes en la pared celular lo importan al interior celular.
Catalasa	La producción de peróxido de hidrogeno por las células fagocitarias es uno de los mecanismos de defensa. Que MTB posea esta enzima es indispensable para su supervivencia.

- **Tuberculosis y VIH**

Una décima parte de los individuos infectados por MTB, están coinfectados por VIH, estos presentan mayor riesgo de desarrollar TBA y diseminación vía linfohematogena, debido a su sistema inmune comprometido. Las principales complicaciones que surgen al instaurar el tratamiento antituberculoso con los antirretrovirales, son los efectos adversos, el solapamiento de toxicidades y el síndrome inflamatorio de reconstitución inmune asociado a tuberculosis.^[16,17]

La manera en la que la infección por VIH exagera la TB es debido al lugar donde se establece la infección, en el caso del VIH la replicación tiene lugar en linfocitos T CD4+ y en macrófagos. A su vez, los macrófagos conforman la estructura de los granulomas, que contienen MTB donde se ha observado una mayor replicación de VIH. Además, la muerte de linfocitos T que rodean el granuloma explicaría la progresión a TBA, unido a la menor producción de INF- γ por parte de las células T.^[16]

En cuanto al diagnóstico, se ve comprometido, ya que se encuentran menor número de bacilos en esputo, y según disminuye el número de linfocitos CD4+ disminuye la sensibilidad de las pruebas PCT e IGRA.^[16,17]

- **Diagnóstico**

Tuberculosis activa

Cualquier persona con tos persistente por dos o más semanas que además presente fiebre crónica y/o pérdida de peso debería ser evaluada para descartar tuberculosis pulmonar.^[18,19]

- Radiología: En el caso de sospecha o de resultado positivo de PTB, se realiza una radiografía de tórax. En la TB primaria la afectación puede ocurrir en cualquier segmento aunque con predilección por los lóbulos superiores. Por si solas las pruebas radiológicas no son específicas por lo que los resultados se deben apoyar en pruebas complementarias.^[18,20]
- Baciloscopía: es la técnica de diagnóstico más utilizada, y consiste en la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en muestras respiratorias, como el esputo, que puede inducirse mediante la nebulización de suero salino. La baciloscopía se realiza mediante la tinción de Ziehl-Neelsen o la tinción de Kinyoun, de 3 muestras tomadas en días consecutivos. Es una técnica rápida y económica, a pesar de esto, existen una serie de recomendaciones que permiten aumentar la sensibilidad de la técnica (Tabla 2).^[21]

Tabla 2. Métodos para aumentar la sensibilidad de la baciloscopia.^[22]

Correcta preparación del frotis de forma uniforme y la tinción con reactivos de calidad.
La adición de hipoclorito sódico o hidróxido de sodio induce la digestión del moco presente en la muestra facilitando la identificación de los bacilos.
Utilizar diferentes concentraciones de carbol-fucsina
La utilización de otros métodos como la microscopia de fluorescencia, inmunofluorescencia.
El tiempo de observación de las muestras sería de al menos 5 minutos.

A la hora de emitir un resultado, existen diferencias según se utilice microscopía óptica o de fluorescencia, variando el número de bacilos para determinar si la muestra es positiva (Tabla 3).

Tabla 3. Interpretación e informe de la microscopia (baciloscopia) para la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR).

Tipo de tinción, aumento óptico y nº de BAAR observados.			
Informe	Fucsina (x1000)	Fluorocromo (x250)	Fluorocromo (x450)
No BAAR	0	0	0
Dudoso (repetir)	1-2 / 300 campos (3 barridos)	1-2 / 30 campos (1 barrido)	1-2 / 70 campos (1,5 barridos)
Positivo 1+	1-9 / 100 campos (1 barrido)	1-9 / 10 campos	2-18 / 50 campos (1 barrido)
Positivo 2+	1-9 / 10 campos	1-9 / campo	4-36 / 10 campos
Positivo 3+	1-9 / campo	10-90 / campo	4-36 / campo
Positivo 4+	>9 / campo	>90 / campo	>36 / campo

- Cuando una muestra haya sido teñida con carbolfucsina deberá examinarse un mínimo de 300 campos con el objetivo de inmersión (x 1.000) antes de emitir un informe negativo. Cuando se trata de tinción con fluorocromo el examen se hará con un microscopio de fluorescencia y a menor aumento (x 250). Al ampliar el campo visual será necesario observar al menos 30 campos, para informar la preparación como negativa. Sin embargo, el número de campos observados puede variar en función del nº de BAARs. Tabla tomada de los Procedimientos en Microbiología Clínica de las Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedad Infecciosas y Microbiología Clínica.^[23]

- Cultivo. El cultivo positivo a MTB se considera el patrón de referencia para el diagnóstico de tuberculosis y según la OMS un único cultivo define un caso de tuberculosis. El cultivo de las muestras además de confirmar el diagnóstico nos permite detectar la sensibilidad a los antibióticos. Su principal desventaja es el tiempo de incubación que oscila entre 4-8 semanas (medio Lowenstein-Jensen).^[19] Aunque existen medios como el Middlebrook 7H11, con el que se consigue reducir a 3 semanas. El cultivo en medio líquido requiere menor tiempo, entre 10-14 días por lo que son los más utilizado.^[20]

- Pruebas moleculares

1. Amplificación de ácidos nucleicos

Este método es útil para aumentar la especificidad del diagnóstico, a partir de una muestra de esputo, mediante la PCR, se detecta el material genético de MTB. La heterogeneidad de los resultados, en cuanto a toma de muestra y cantidad de bacilos presentes, hacen que un resultado negativo, no debe descartar PTB, especialmente si existen signos clínicos de TB.^[19,21]

2. Ensayos con sondas en línea

Permiten determinar la sensibilidad frente antibióticos de forma mucha más rápida que los métodos convencionales. Primero se extrae el ADN bacteriano, luego se amplifican regiones determinantes de resistencias mediante PCR, que se hibridan a nucleótidos inmovilizados dando lugar a una reacción colorimétrica. Es una prueba altamente sensible y específica para detectar la resistencia a rifampicina o en combinación con isoniacida.^[19,21]

3. Xpert MTB/RIF

Es un nuevo método automatizado basado en la amplificación de ácidos nucleicos que detecta MTB a la vez que resistencia a rifampicina, tras dos horas desde la toma de muestra. Se ha determinado que la especificidad y sensibilidad del método son aceptables.^[18]

Infección latente por tuberculosis (TBLI)

No existe prueba Gold standard para realizar el diagnóstico en TBLI.

- Prueba cutánea de la tuberculina (PCT)

La prueba Mantoux o PCT se basa en una reacción de hipersensibilidad retardada tras la inoculación intradérmica de derivados proteicos purificados (PPD), una mezcla de antígenos que comparten tanto MTB y BCG. Si las células T han sido sensibilizadas debido a una infección previa, estas son reclutadas a la zona de inoculación y liberan linfocinas, provocando una induración. Se mide el diámetro de esta, entre 48 y 72 horas tras la inyección, si es mayor de 5 mm se considera positivo. En condiciones de malnutrición, VIH y enfermedad por TB, su sensibilidad se ve disminuida. Presenta la desventaja de que su especificidad es baja, ya que no discrimina entre infecciones por micobacterias no tuberculosas donde estas son prevalentes, ni entre infecciones o reacciones post vacuna.^[24,25]

- IGRA (Ensayo de liberación de interferón gamma)

En la búsqueda de pruebas más específicas, se identificó una región en el ADN de MTB, denominada RD1, que no se encuentra en el BCG, que codifica dos péptidos, ESAT-6 y CFP-10, los cuales son altamente inmunógenos, que al enfrentarlo frente a células T de un individuo previamente infectado, se libera la INF- γ .^[20,21] El IGRA es una prueba, en la que a partir de una muestra de sangre, se puede determinar si una persona está infectada por MTB, pero no puede discernir entre infección latente o activa. Se recomienda realizar el test IGRA, como complemento a la prueba de la tuberculina si ésta ha sido positiva, en personas que han recibido vacunación con BCG previa (especialmente en los 15 años previos); o bien, si ha sido negativa en personas con algún tipo de inmunosupresión y en niños menores de 5 años.^[25,26]

La prueba IGRA mide el grado de reacción del sistema inmunitario de una persona ante MTB. Hay dos pruebas IGRA aprobadas por el FDA (Tabla 4) y disponibles en este país.^[26]

1. Prueba QuantiFERON ® Gold In Tube (QFT-GIT)
2. Prueba T-Spot ® para la tuberculosis (T-Spot.T)

Los resultados con mayor valor predictivo son de pacientes inmunocompetentes de > 5 años, (madurez inmunológica). En ancianos, por presentar mayor síntesis de la citocina se pueden dar casos de falsos positivos. Sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos (VIH, insuficiencia renal crónica, en tratamiento con antagonista del FNT), la síntesis de INF- γ , puede estar disminuida, por lo que se recomienda la repetición de la prueba en casos de que la evidencia clínica lo indique, ya que este tipo de paciente presenta mayor riesgo de desarrollar TB activa.

- Resultado positivo de la prueba IGRA, significa infección por MTB. Por lo que se deberían hacer más pruebas para determinar si la persona tiene ILTB o TBA.
- Resultado negativo de la prueba IGRA, significa que no es probable que exista una infección por MTB, ni la enfermedad.

Se recomienda su uso en países con baja incidencia y con altos recursos humanos y materiales. Algunos estudios han teorizado sobre el uso de la prueba en inmigrantes y turista provenientes de zonas de alta incidencia.^[26]

Tabla 4. Inmunoensayos que detectan la respuesta inmune contra antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* (IGRA).^[26]

Prueba	Técnica	Muestra	Antígenos	Resultado
T-SPOT.T	Elispot	Células mononucleares Incubación 37°C – 12h C+ (fitohemaglutinina) y C-	ESAT-6 CFP-10 TB7.7	Se cuantifica el número de células productoras, que se ven como manchas en el pocillo. Positivo ≥ 8 Negativo ≤ 4 Indeterminado 5-7
QFT-GIT	ELISA	Sangre total. Incubación 37° C 18-25h	ESAT-6 CFP-10	Se cuantifica el INF-γ en UI/mL, si este valor es considerablemente mayor que el C (-), se considera positivo.

- Cuando MTB es fagocitado, los macrófagos presentan los antígenos proteicos como péptidos asociados al MHC-I, lo que induce a la diferenciación de células Th1 que bajo el efecto de la IL-12, secretará INF-γ, que será cuantificado.

- **Tratamiento**

Es fundamental realizar un diagnóstico precoz, e instaurar terapia antibiótica para prevenir las resistencias y fomentar la adherencia.^[27] En general, se define como un tratamiento antituberculoso eficaz cuando se observa una tasa de recaída < 5% tras dos años de completar el tratamiento (Tabla 5).

Tabla 5. Fármacos antituberculosos de primera línea.

Farmacología Fármacos Clásicos TB				
	Mecanismo de acción	Distribución	Actividad	Efectos Adversos
Isoniazida (INH)	Profármaco (enzima KatG MTB) Inhibe la síntesis de ácido micólicos. Resistencias debido a mutaciones en la enzima KatG.	Se acumula en el fluido de revestimiento epitelial y en macrófagos alveolares, la concentración en las lesiones es similar a la del plasma y puede que no llegue al tejido caseoso.	EBA (“early bactericidal activity”, reduciendo los bacilos viables en esputo.	Daño hepático inducido por medicamentos (DILI). Neuropatía periférica y toxicidad que afecta al sistema nervioso central, que resuelven con la administración de bajas dosis de vitamina B6.
Rifampicina (RIF)	Inhibe la transcripción al unirse a la unidad subbeta de la ARN-polimerasa dependiente de ADN. Resistencias por mutaciones en la región 81-bp del gen rpoB.	Se acumula en los macrófagos alveolares. Buena penetración en el tejido caseoso, aunque lenta.	Modesta EBA Importante actividad esterilizante	Aumento de la bilirrubina y transaminasas, hipersensibilidad cutánea y reacciones de hipersensibilidad. Numerosas interacciones con otros fármacos.
Pirazinamida	Profármaco (activado por amidasas humanas y bacterianas que lo convierten en ácido pirazinoico que se acumula e impide múltiples procesos celulares). Resistencias debido a mutaciones en el gen pncA.	Se acumula en gran cantidad en el fluido de revestimiento epitelial, pero no en los macrófagos alveolares. No penetra correctamente en las lesiones pulmonares.	Leve EBA Importante actividad esterilizante	DILI
Etambutol	D-isómero del etambutol. Inhibe la arabinosil transferasa de la pared celular, reduciéndose el arabinogalactano y el lipoarabinomanano. Resistencias debido a mutaciones en el gen <i>embB</i> .	No se acumula en el fluido de revestimiento epitelial, pero si en gran cantidad en los macrófagos alveolares y lesiones pulmonares.	Modesta EBA Evitar las resistencias a RIF.	Aneurisma óptica dosis dependiente.

En casos de ILTB, donde el número de bacilos es <1000, se puede administrar isoniacida en monoterapia (Tabla 6).

Tabla 6. Tratamiento infección latente por tuberculosis.

INH	300 mg/diario/6 meses Adultos: 5-10mg/kg de peso.	Se debe tomar sin alimentos y dos horas antes o después de antiácidos.
INH + RIF	300mg+600 mg/diario/4 meses	Sospecha de resistencia INH. Evidencia de mayor seguridad y menor coste que la monoterapia con INH.
INH + Rifabutina	300mg+300 mg /diario/4 meses	En casos de que no sea posible implementar RIF.

- Orden decreciente de preferencia. En ILTB no se recomienda el uso combinado de pirazinamida y rifampicina por el riesgo de hepatotoxicidad.

Para los casos de tuberculosis activa, es imperativo el uso de múltiples fármacos. Pueden existir en las lesiones pulmonares más de 10⁹ organismos, número en el que se pueden producir las mutaciones necesarias para dar lugar a resistencias. En estos casos es necesario realizar previamente un antibiograma para la selección de los fármacos.^[28]

El tratamiento se divide en dos fases; una de inducción, en la que se emplea al menos isoniazida, rifampicina, etambutol (E) y pirazinamida (P) durante dos meses, y otra de consolidación, en la que se emplean isoniazida y rifampicina, durante 4 meses.

Aunque la mayoría de los pacientes no presentan bacilos viables en esputo tras dos meses de tratamiento, al ser de gran dificultad determinar que individuos no están curados, se extiende durante 4 meses más (Tabla 7).^[27,28]

Tabla 7. Tratamiento tuberculosis activa.

Fase 1 (4 meses)	INH (300mg) + RIF (600mg) + P (1,5g) + E (1,2g) / diario
Fase 2 (2 meses)	INH + RIF / diario
Imposibilidad de utilizar pirazinamida (9 meses)	INH + RIF / diario

- Desde que se confirma susceptibilidad al resto de fármacos durante la fase 1 puede retirarse el etambutol.

Se han estudiados otro tipo de regímenes terapéuticos donde las dosis son intermitentes, ej: semanal o mensual, en estos casos disminuye la adherencia, por lo que se recomienda el empleo de la terapia de observación directa.^[27,28]

- Resistencia a fármacos

Las resistencias se han atribuido a mutaciones genéticas al azar, debido a errores durante la replicación del ADN y no a resistencias adquiridas mediante conjugaciones y transposiciones. Idealmente, se debería determinar la sensibilidad antimicrobiana de las muestras de cada paciente, en casos de recursos limitados se restringe a contactos de pacientes con resistencias.^[29]

En el caso de tuberculosis multirresistentes, la pauta recomendada debe ser individualizada como se muestra en la Tabla 8.^[30,31]

Tabla 8. Tratamiento MDR-TB y XDR-TB

Fármacos de segunda línea RR-TB / MDR-TB				
Grupo A: Fluoroquinolonas	Grupo B: Inyectables segunda línea	Grupo C: otros	Grupo D1	Grupo D2
Levofloxacino Moxifloxacino Gatifloxacino	Amikacina Capreomicina Kanamicina (Streptomicina)	Etionamida/Protionamida Cicloserina/Terizidona Linezolid Clofazimina	Pirazinamida Etambutol Altas dosis isoniacida	Bedaquilina Delamanid

-La resistencia a INH y RIF, se considera tuberculosis multirresistente, conocida por las siglas MDR-TB. Si lo es además a una fluoroquinolona y a un inyectable de 2º línea, se denomina tuberculosis extremadamente resistente, conocida por las siglas XDR-TB. El enfoque del tratamiento es individualizado usando antibacterianos.

- El régimen a seguir debe incluir cinco fármacos; pirazinamida + 1 fármaco del Grupo A + 1 fármaco del Grupo B y al menos 2 fármacos del grupo C. Si no se pueden alcanzar los 5 fármacos, se utilizan los grupos D2 y D3 hasta alcanzarlo.

Fármacos como bedaquilina y delamanid están tomando especial relevancia debido al incremento de la MDR-TB. La bedaquilina es un antituberculoso bactericida intracelular por inhibición de la ATP-sintasa, frente a ATB y ILTB. Cuando se administra conjuntamente con linezolid aumenta su actividad. La principal desventaja son los efectos adversos cardiacos, prolongando el intervalo QT y la aparición de resistencia cuando se asocia a clofazimina. Delamanid, inhibe la biosíntesis de los ácidos micólicos. Está indicado como parte de un régimen de combinación adecuado para la TB-MDR pulmonar en pacientes adultos cuando no es posible establecer un régimen de tratamiento eficaz por razones de resistencia o tolerabilidad.^[32]

- Profilaxis

Vacuna BCG

Actualmente la única vacuna aprobada es la BCG, en uso desde 1921. Se trata de una vacuna viva atenuada (obtenida de una cepa bovina) incapaz de causar enfermedad en adultos sanos, es barata, accesible y segura excepto en pacientes VIH positivos e inmunocomprometidos. En la actualidad se utilizan diferentes cepas de BCG, que presentan diferencias genómicas entre ellas. Las más utilizadas son BCG-Dinamarca, BCG-Rusia y BCG-Japón.^[33] Al secuenciar el genoma de la vacuna y compararlo con el de MTB se determinó que son similares en un 99,95% y se encontró que la región 9,5 kb RD-1 estaba ausente en las cepas atenuadas atribuyéndosele la virulencia.^[33,34]

La eficacia de la vacuna está influenciada por diferentes factores por lo que es difícil delimitar que respuestas inmunitarias son responsables de la protección (Figura 3).

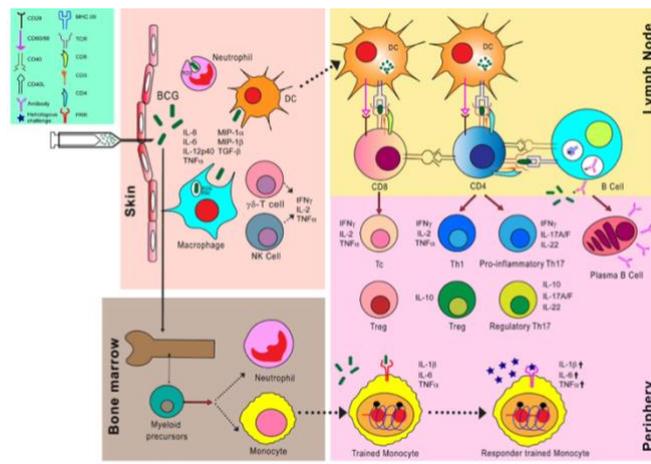


Figura 3. Mecanismo de la vacuna BCG. Su administración es intradérmica por lo que en la respuesta innata intervienen neutrófilos, macrófagos y células dendríticas, esta interacción ocurre mediante PAMPS (patrones moleculares asociados a patógenos), que son principalmente componentes de la pared celular. Posteriormente se produce la liberación de citocinas adaptativas como IL-2, INF- γ e IL-17. En cuanto la respuesta inmune adaptativa se demostró que está inducida por células T CD4+ y CD8+.^[34] Tomada de A century of BCG: Impact on tuberculosis control and beyond. Immunological Reviews.^[35]

A pesar de haberse reducido la incidencia de tuberculosis, ésta sigue siendo endémica en ciertos países que representan más del 80% de los nuevos casos, que en orden decreciente son: India, China, Indonesia, Filipinas, Pakistán, Nigeria, Bangladés y Sudáfrica.^[36]

La eficacia de la vacuna es muy variable, entre el 0-80% y de una duración entre 20-60 años frente a PTB. La OMS la recomienda a todos los recién nacidos (a excepción para bebés con infección por VIH u otra inmunodeficiencia) en países con alta incidencia, Con especial precaución tras la exposición frente a otras micobacterias no tuberculosas ya que su eficacia podría verse afectada al no aumentar la protección frente a MTB.^[35,37]

Desde 1980 no se vacuna en España con BCG a la población general, aunque se mantiene en el país vasco. Está indicada a trabajadores que estén en contacto con pacientes con TB, niños no infectados en contactos con enfermos con TB activa no tratados, mal tratados o infectados por bacilos resistentes. Además de poblaciones con tasas de infección anuales mayores al 1%.^[38]

Nuevas vacunas

La vacuna BCG no ha conseguido controlar la TB, lo que requiere el desarrollo de otras nuevas. El retraso en su desarrollo puede deberse entre otros factores a que no existe un consenso sobre los antígenos que generaran mayor protección.^[39]

Existen diversas estrategias que pueden ser clasificadas según vaya a ser su uso. Vacunas para uso en neonatos, antes de que exista la exposición a MTB (vacunas pre-exposición o “priming vaccines”); las que se usarían en adolescentes y adultos con ILTB e inmunización con BCG (vacunas post-exposición o “boosting vaccines”); las desarrolladas para su uso en conjunto con fármacos antituberculosos (vacunas terapéuticas).^[40]

De las indicadas en la Tabla 9, las más prometedoras son la M72, VPM 1002 y *Vaccae*. M72, es una vacuna recombinante de fusión de proteínas, que contiene los antígenos Mtb32A y Mtb39A, además del adyuvante AS01E, que consiguió demostrar en un estudio de fase IIb, comparada con placebo en individuos VIH negativo, una eficacia de un 50%, tras la administración de dos dosis. Por otro lado, *Vaccae*, (*M. vaccae* muerta por calor), al usarse en combinación con terapia farmacológica, se ha observado que aumenta su eficacia, Por último, VPM 1002, se ha diseñado con el propósito de prevenir PTB en neonatos y recaídas de TB en adultos, usándose de forma post-exposición.^[41]

Tabla 9. Vacunas candidatas para la TB en ensayos clínicos.^[42]

Tipo de vacuna	Candidata	Indicación	Descripción	Estado (2020)	País
BCG recombinante	VPM1002	Prime/Boost	Cepa rBCG	Fase III	Alemania
	AEC/BC02	Prime/Boost Post-infección Inmunoterapia	Fusión Ag85b, ESAT5-FP10 y CpG derivado de BCG	Fase I	Anhui Zhifei Longcom (China)
Vacunas vivas atenuadas (autotróficas)	MTBVAC	Prime	Micobacteria viva atenuada	Fase IIa	España
	BCG revacunación	Prime	Micobacteria viva	Fase IIb	España
Vectores virales	Ad6Ag85A	Prime/Boost Post-infección	Adenovirus 5 que expresa el antígeno Ag85B	Fase I	Canada/China
	ChAdOx1.85 A	Prime/Boost	Adenovirus simio que expresa el antígeno 85A	Fase I	Reino Unido
	ChAdOx1.85A MVA	Prime/Boost	ChAdOx185 A y MVA85A expresan el antígeno 85 A	Fase IIa	Reino Unido
	TB/FY-04 L	Prime/Boost	Influenza viva recombinante que expresa los antígenos Ag85A y ESAT-6.	Fase I	Rusia
Vacunas con subunidades y adyuvantes (proteínas de fusión)	M72 + AS01 / AS02	Prime/Boost Post-infección	Fusión de Rv1196 y Rv0125	Fase II	EU/MCN
	GamTBvac	Prime/Boost	Fusión de Ag85a y ESAT6-CFP10 en Cpg	Fase I	Rusia
	Hybrid 56 + IC31	Prime/Boost Post-infección	Fusión de Ag85B, ESAT-6 y Rv2660	Fase IIb	Dinamarca
	ID93 + GLA-SE	Prime/Boost Post-infección Inmunoterapia	Proteína de fusión recombinante	Fase IIa	Estados Unidos

Vacunas inmunoterapéuticas (bacteria viva o extracto)	RUTI	Boost/Post-infección Inmunoterapia	Celula MBT en liposomas	Fase IIa	España
	<i>M. vaccae</i>	Boost/Post-infección Inmunoterapia	Micobacteria inactivada por calor	Fase III	China
	Mw (<i>M indicus pranii</i>)	Inmunoterapia	Micobacteria no tuberculosa	Fase III	India
	Dar-901 (<i>M. vaccae</i>)	Inmunoterapia	<i>M. vaccae</i> inactiva con más antígenos.	Fase III	Estados Unidos

▪ Conclusiones

A pesar de que el diagnóstico de la tuberculosis se ha mejorado significativamente en las últimas décadas, aún existen desafíos importantes que deben abordarse. Es crucial en el control el diagnóstico temprano de la infección latente, para evitar el desarrollo de la tuberculosis activa y reducir la transmisión.

Dada la incidencia de tuberculosis multirresistentes, la identificación de nuevas terapias es fundamental para mejorar los resultados del tratamiento y reducir la duración del mismo. La investigación en este ámbito ha avanzado en los últimos años, y fármacos como bedaquilina y delamanid, a pesar de sus limitaciones y de la evidencia de su eficacia, pueden resultar ser prometedoras en el tratamiento de TB-MDR.

Por último, es necesario el desarrollo de una vacuna segura y efectiva, a la que puedan acceder los países en vías de desarrollo, que son los más afectados por la enfermedad.

▪ Bibliografía

1. Picazo De La Garza, J. J., & Prieto Prieto, J. (2016). Compendio de Microbiología (2a ed.). Elsevier.
2. CDC. (2021) Tuberculosis (TB) - Historia del Día Mundial de la Tuberculosis. [Internet]. [Consultado 13 Marz 2023]. Disponible en: https://www.cdc.gov/tb/esp/worldtbdays/history_es.htm
3. Daniel, T. M. (2006). The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*, 100(11), 1862–1870. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.08>.
4. Fatima, S., Kumari, A., Das, G., & Dwivedi, V. P. (2020). Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. *Life Sciences*, 252(117594), 117594. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020>.
5. WHO. Informe mundial sobre la tuberculosis. (2022). [Consultado 26 Feb 2023] Disponible en: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022>
6. Murray PR. (2021). *Mycobacterium* y bacterias ácido-alcohol resistentes relacionadas. Microbiología médica. Elsevier
7. Brennan, P. J. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 83(1–3), 91–97. [https://doi.org/10.1016/s1472-9792\(02\)00089-6](https://doi.org/10.1016/s1472-9792(02)00089-6)
8. Jankute, M., Cox, J. A. G., Harrison, J., & Besra, G. S. (2015). Assembly of the Mycobacterial cell wall. *Annual Review of Microbiology*, 69(1), 405–423. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104121>
9. Cirillo, J.D., Kong Y. (2019). Tuberculosis host-pathogen interactions. Springer International Publishing.
10. Vilchèze, C., & Kremer, L. (2017). Acid-Fast Positive and Acid-Fast Negative *Mycobacterium tuberculosis*: The Koch Paradox. *Microbiology Spectrum*, 5(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TB2-0003-2015>
11. Queval, C. J., Brosch, R., & Simeone, R. (2017). The Macrophage: A Disputed Fortress in the Battle against *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02284>
12. Russell, D. G. (2001). *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(8), 569–577. <https://doi.org/10.1038/35085034>

13. Dorhoi, A., & Kaufmann, S. H. E. (2016). Pathology and immune reactivity: understanding multidimensionality in pulmonary tuberculosis. *Seminars in Immunopathology*, 38(2), 153–166. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0531-3>
14. Shim, D., Kim, H., & Shin, S. J. (2020). *Mycobacterium tuberculosis* infection-driven foamy macrophages and their implications in tuberculosis control as targets for host-directed therapy. *Frontiers in Immunology*, 11, 910. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00910>
15. Hunter, R. L., Hwang, S.-A., Jagannath, C., & Actor, J. K. (2016). Cord factor as an invisibility cloak? A hypothesis for asymptomatic TB persistence. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 101, S2–S8. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.09.023>
16. Shankar, E. M., Vignesh, R., Ellegård, R., Barathan, M., Chong, Y. K., Bador, M. K., Rukumani, D. V., Sabet, N. S., Kamarulzaman, A., Velu, V., & Larsson, M. (2014). HIV-*Mycobacterium tuberculosis* co-infection: a “danger-couple model” of disease pathogenesis. *Pathogens and Disease*, 70(2), 110–118. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12108>
17. Schutz, C., Meintjes, G., Almajid, F., Wilkinson, R. J., & Pozniak, A. (2010). Clinical management of tuberculosis and HIV-1 co-infection. *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 36(6), 1460–1481. <https://doi.org/10.1183/09031936.00110210>
18. Ryu, Y. J. (2015). Diagnosis of pulmonary tuberculosis: recent advances and diagnostic algorithms. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 78(2), 64–71. <https://doi.org/10.4046/trd.2015.78.2.64>
19. Cudahy, P., & Sheno, S. V. (2016). Diagnostics for pulmonary tuberculosis. *Postgraduate Medical Journal*, 92(1086), 187–193. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2015-133278>
20. Pérez del Molino, M. L., Tuñez Bastida, V., García Ramos, M. R., & Lado Lado, F. L. (2002). Diagnóstico microbiológico de la tuberculosis. *Medicina Integral*, 39(5), 207–215. <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-diagnostico-microbiologico-tuberculosis-13029946>
21. Lyon, S. M., & Rossman, M. D. (2017). Pulmonary tuberculosis. *Microbiology Spectrum*, 5(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TNMI7-0032-2016>

22. Singhal, R., & Myneedu, V. P. (2015). Microscopy as a diagnostic tool in pulmonary tuberculosis. *International Journal of Mycobacteriology*, 4(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2014.12.006>
23. Fernández de Vega, F. A., Esteban Moreno, J., González Martín, J., Palacios Gutiérrez, J. J. (2005). Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia9a.pdf>
24. Goletti, D., Delogu, G., Matteelli, A., & Migliori, G. B. (2022). The role of IGRA in the diagnosis of tuberculosis infection, differentiating from active tuberculosis, and decision making for initiating treatment or preventive therapy of tuberculosis infection. *International Journal of Infectious Diseases*, 124 Suppl 1, S12–S19. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.02.047>
25. Trajman, A., Steffen, R. E., & Menzies, D. (2013). Interferon-gamma release assays versus tuberculin skin testing for the diagnosis of latent tuberculosis infection: An overview of the evidence. *Pulmonary Medicine*, 601737. <https://doi.org/10.1155/2013/601737>
26. Machado Villarroel, L., Acosta Loya, J. A., Orozco Andrade, I., Bravo Rodríguez, G., & Dimakis Ramírez, D. A. (2015). Determinación del interferón-gamma en tuberculosis: Principios básicos y utilidad. *Neumología y cirugía de torax*, 74(3), 197–206. <https://doi.org/10.35366/62385>
27. Dipiro, J. T., Yee, G. C., & Posey, L.M. (2020). *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*, Eleventh Edition (11a ed.). McGraw-Hill Education/Medical.
28. Horsburgh, C. R., Barry, C. E., 3rd, & Lange, C. (2015). Treatment of tuberculosis. *The New England Journal of Medicine*, 373(22), 2149–2160. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1413919>
29. Peloquin, C. A., & Davies, G. R. (2021). The treatment of tuberculosis. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 110(6), 1455–1466. <https://doi.org/10.1002/cpt.2261>
30. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4: treatment drug resistant tuberculosis, (2022). [Internet]. [Consultado 13 Marz 2023]. [Consultado 20 Abr 2023]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240063129>

31. Tiberi, S., Muñoz-Torrico, M., Duarte, R., Dalcolmo, M., D'Ambrosio, L., & Migliori, G.-B. (2018). New drugs and perspectives for new anti-tuberculosis regimens. *Pulmonology*, 24(2), 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.rppnen.2017.10.009>
32. Li, Y., Sun, F., & Zhang, W. (2019). Bedaquiline and delamanid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: Promising but challenging. *Drug Development Research*, 80(1), 98–105. <https://doi.org/10.1002/ddr.21498>
33. Luca, S., & Mihaescu, T. (2013). History of BCG vaccine. *Maedica*, 8(1), 53–58. [https://www.maedica.ro/articles/2013/1/2013_Vol8\(11\)_No1_pg53-58.pdf](https://www.maedica.ro/articles/2013/1/2013_Vol8(11)_No1_pg53-58.pdf)
34. Li, J., Zhao, A., Tang, J., Wang, G., Shi, Y., Zhan, L., & Qin, C. (2020). Tuberculosis vaccine development: from classic to clinical candidates. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 39(8), 1405–1425. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03843-6>
35. Ahmed, A., Rakshit, S., Adiga, V., Dias, M., Dwarkanath, P., D'Souza, G., & Vyakarnam, A. (2021). A century of BCG: Impact on tuberculosis control and beyond. *Immunological Reviews*, 301(1), 98–121. <https://doi.org/10.1111/imr.12968>
36. WHO. Datos y cifras sobre la tuberculosis. (2021). Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis#:~:text=En%202020%2C%20los%2030%20pa%C3%ADses,%20Nigeria%20Bangladesh%20y%20Sud%C3%A1frica.>
37. Mangtani, P., Abubakar, I., Ariti, C., Beynon, R., Pimpin, L., Fine, P. E. M., Rodrigues, L. C., Smith, P. G., Lipman, M., Whiting, P. F., & Sterne, J. A. (2014). Protection by BCG vaccine against tuberculosis: a systematic review of randomized controlled trials. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 58(4), 470–480. <https://doi.org/10.1093/cid/cit790>
38. Fundación iO. Vacuna tuberculosis (BCG). [Internet]. [Consultado 18 Abr 2023]. Disponible en: <https://fundacionio.com/salud-io/vacunas/tuberculosis-bcg/#:~:text=Pauta%20vacunal%3A%20una%20única%20dosis,entre%2010%20y%2020%20años.>

39. Dockrell, H. M., & McShane, H. (2022). Tuberculosis vaccines in the era of Covid-19 - what is taking us so long? *EBioMedicine*, 79(103993), 103993. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103993>
40. Kaufmann, S. H. E., Weiner, J., & Fordham von Reyn, C. F. (2017). Novel approaches to tuberculosis vaccine development. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 56, 263–267. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.10.018>
41. Chetty, O., & Chetty, C. (2022). Candidate vaccines against tuberculosis and the future of novel TB vaccine research. *Journal of Tuberculosis Research*, 10(04), 230–250. <https://doi.org/10.4236/jtr.2022.104018>
42. Soleimanpour, S., Yaghoubi, A., Sadat Seddighinia, F., & Rezaee, S. A. R. (2022). A century of attempts to develop an effective tuberculosis vaccine: Why they failed? *International Immunopharmacology*, 109(108791),. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108791>