

Efecto de la coinfección por *Helicobacter pylori* sobre la respuesta inmune específica a *Mycobacterium tuberculosis* entre individuos con infección tuberculosa latente

JAVIER ANDRÉS BUSTAMANTE RENGIFO, BSc. MSc.

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
POSTGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
SANTIAGO DE CALI
2019

Efecto de la coinfección por *Helicobacter pylori* sobre la respuesta inmune específica a *Mycobacterium tuberculosis* entre individuos con infección tuberculosa latente

JAVIER ANDRÉS BUSTAMANTE RENGIFO, BSc. MSc.

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar
el título de Doctor en Ciencias Biomédicas

Directora:

MARIA DEL PILAR CRESPO ORTIZ, MSc. PhD

Codirectora:

MIRYAM ASTUDILLO HERNANDEZ, MSc.

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
POSTGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
SANTIAGO DE CALI
2019

NOTA DE ACEPTACIÓN

Los integrantes del jurado, designados por el comité del postgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad del Valle han asignado la revisión y aprobación final del presente trabajo de investigación presentado por el estudiante **JAVIER ANDRÉS BUSTAMANTE RENGIFO** para optar al título de Doctor en Ciencias Biomédicas, al abajo firmante, el día ____ de _____ de 2019.

Jurado 1

Jurado 2

Jurado 3

DEDICATORIA

*A Dios por bendecir e iluminar mí camino,
a mi esposa e hijo Martin por sacrificar su tiempo
y compartir mis triunfos y fracasos,
a mi padre, madre y hermanos que
siempre me han apoyado,
a mis tutores por enseñarme el
verdadero propósito de la ciencia,
a todos ellos mil gracias.*

AGRADECIMIENTOS

Maravillarse es el primer paso para un descubrimiento

Louis Pasteur

Este es un momento particular en toda tesis. Mostrar gratitud hacia todos aquellos que nos han aportado algo para su culminación es un deber. Sin embargo, no es sencillo. En algunos casos la ayuda, apoyo o colaboración son evidentes, pero en otros casos es inaparente, sutil, aunque imprescindible.

Agradezco de todo corazón a mi papá por enseñarme desde pequeño a luchar por mis metas, a mi mamá por estar presente en todo momento dándome ánimo, a mis hermanos por alegrarme los días con sus ocurrencias, a mi esposa Diana Katherine Pérez por estar siempre dispuesta a escuchar, ayudar, por su paciencia durante la realización de esta investigación y a mi hijo Martín por alegrar diariamente mis días con sus travesuras.

Mi agradecimiento a mi tutora la Dra. María del Pilar Crespo-Ortiz, quien gentilmente me acogió y me brindó la oportunidad de formarme tanto científicamente como personalmente, a mi codirectora y mentora la Dra. Miryam Astudillo-Hernández por exigirme constantemente enseñándome que hay que dar más de lo que se pide, sin sus enseñanzas este trabajo no hubiera llegado a su fin, mil gracias.

Un reconocimiento muy especial a la Dra. Beatriz Parra quien siempre estuvo dispuesta a orientarme y me ha enseñado cuán hermosa es la microbiología e inmunología.

En un estudio que ha abarcado un buen período de tiempo, los agradecimientos pudieran parecer interminables, pero es necesario hacer algunas menciones importantes: A mis tesisas de pregrado: Luz Angela Salazar y Nicole Osorio por su apoyo para hacer realidad este proyecto y por creer en mí para orientar sus tesis. A todos los colegas y amigos del Departamento de Microbiología con cuya colaboración siempre conté: Leonor Oviedo, Graciela Barona, Isabel Bombá, Daniel Vásquez y Mónica Guzmán quienes muy amablemente siempre estuvieron dispuestos a colaborar y enseñarme, a todos ellos mil gracias.

Finalmente, a mi Universidad y a Colciencias con su programa Becas para formación doctoral, quienes proporcionaron los fondos necesarios para mi sostenimiento y la investigación en mención.

Tabla de contenido

1	INTRODUCCIÓN	3
2	MARCO TEÓRICO	5
2.1	El género <i>Mycobacterium</i>	5
2.2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> : de la infección a la enfermedad	6
2.3	Diagnóstico de la infección tuberculosa latente	7
2.4	Estado actual de la TB en el mundo	9
2.5	Estado de la TB en Colombia.....	11
2.6	Inmunología de la tuberculosis	12
2.7	La relación antigua entre <i>H. pylori</i> y los humanos	14
2.8	Características microbiológicas de <i>H. pylori</i>	14
2.9	Diagnóstico de la infección por <i>H. pylori</i>	14
2.10	Epidemiología de <i>H. pylori</i>	16
2.11	Prevalencia de la infección por <i>H. pylori</i> en Colombia	17
2.12	Colonización y persistencia de <i>H. pylori</i>	18
2.13	Infección crónica por <i>H. pylori</i>	19
2.14	Cáncer gástrico y su relación con el <i>H. pylori</i>	19
2.15	Variación genómica en <i>H. pylori</i> y riesgo de enfermedad	21
2.16	Factores de virulencia en <i>H. pylori</i> asociados con inflamación	21
2.16.1	El islote de patogenicidad <i>cag</i> (<i>cag</i> PAI)	21
2.16.2	Citotoxina asociada al gen A (<i>cagA</i>).....	23
2.16.2.1	Diversidad de los motivos EPIYA en la proteína CagA.....	24
2.16.3	Citotoxina vacuolizante asociada al gen A (<i>vacA</i>)	25
2.17	El papel de la respuesta inmune frente a la infección por <i>H. pylori</i>	28
2.17.1	Respuesta inmune innata a <i>H. pylori</i>	30
2.17.2	Respuesta inmune celular a <i>H. pylori</i>	31
2.18	El equilibrio dinámico entre <i>H. pylori</i> y su hospedero	32
2.19	Coinfección por <i>H. pylori</i> y <i>M. tuberculosis</i>	33
2.20	Coinfección por <i>H. pylori</i> , helmintos y <i>M. tuberculosis</i>	35
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	Objetivo general	37
3.2	Objetivos específicos	37
4	CAPÍTULO 1. PREVALENCIA Y FACTORES ASOCIADOS CON INFECCIÓN TUBERCULOSA LATENTE EN CALI, COLOMBIA	38

4.1	MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
4.1.1	Diseño del estudio.....	39
4.1.2	Participantes y recolección de datos	39
4.1.3	Prueba cutánea de la tuberculina	41
4.1.4	Determinación de la infección latente por <i>M. tuberculosis</i>	41
4.1.5	Plan de análisis	41
4.2	RESULTADOS	43
4.2.1	Características socio-demográficas y estilos de vida de la población	43
4.2.2	Prevalencia de la infección tuberculosa latente	44
4.2.3	Factores demográficos, socio-económicos, estilos de vida y su asociación con el diámetro en la prueba de la tuberculina.....	46
4.2.4	Factores demográficos, socio-económicos, estilos de vida y su asociación con positividad a la tuberculina (≥ 10 mm)	47
4.2.5	Factores demográficos, socio-económicos, estilos de vida y su asociación con positividad a la tuberculina (≥ 15 mm)	49
4.3	DISCUSIÓN	50
4.3.1	Prevalencia de LTBI en población general	50
4.3.2	Factores asociados con positividad PPD-10.....	52
4.3.3	Factores asociados con positividad PPD-15.....	54
4.3.4	Factores asociados con la induración en la prueba de tuberculina.....	55
4.3.5	Limitaciones y fortalezas del estudio	56
4.3.6	Conclusiones y recomendaciones	57
5	CAPÍTULO 2. PREVALENCIA DE COINFECCIÓN POR <i>H. pylori</i> ENTRE INDIVIDUOS CON INFECCIÓN TUBERCULOSA LATENTE Y FACTORES ASOCIADOS CON ATROFIA GÁSTRICA.....	58
5.1	MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
5.1.1	Población de estudio	59
5.1.2	Procedimiento de endoscopia y toma de biopsia gástrica	59
5.1.3	Evaluación de la infección por <i>H. pylori</i>	60
5.1.3.1	Tratamiento e inclusión de biopsias gástricas	60
5.1.3.2	Análisis histopatológico	60
5.1.3.2.1	Sistema de puntuación histopatológico de Correa.....	61
5.1.3.3	Tratamiento para la infección por <i>H. pylori</i>	62
5.1.3.4	Análisis microbiológicos	62
5.1.3.4.1	Cultivo y aislamiento primario de <i>H. pylori</i> a partir de biopsia.....	62
5.1.3.4.2	Purificación de los aislados de <i>H. pylori</i>	63

5.1.3.4.3	Identificación microscópica y bioquímica de <i>H. pylori</i>	63
5.1.3.4.4	Preservación de los aislados de <i>H. pylori</i>	63
5.1.4	Toma de muestras sanguíneas	64
5.1.5	ELISA cuantitativo para TNF- α	64
5.1.6	Plan de análisis estadístico	65
5.2	RESULTADOS	66
5.2.1	Características socio-demográficas y estilos de vida de la población sometida a endoscopia gástrica	66
5.2.2	Prevalencia de la infección crónica por <i>H. pylori</i>	67
5.2.3	Factores demográficos, socio-económicos, estilos de vida y su asociación con la infección por <i>H. pylori</i> en población con LTBI	68
5.2.4	Diagnóstico y aislamiento de <i>H. pylori</i> por cultivo	69
5.2.5	Factores bacterianos y su asociación con el tipo de gastritis crónica en población tuberculosa latente	70
5.2.6	Factores demográficos, socio-económicos, estilos de vida y su asociación con la gastritis atrófica en población LTBI coinfectada por <i>H. pylori</i>	71
5.2.7	El diámetro de la PPD y su relación con atrofia gástrica asociada a la infección por <i>H. pylori</i>	73
5.2.8	Niveles TNF- α séricos y su relación con atrofia gástrica	74
5.2.9	Concordancia entre la histología y el cultivo para diagnóstico de la infección por <i>H. pylori</i> en población LTBI	75
5.2.10	Cantidad de <i>H. pylori</i> en mucosa gástrica y probabilidad de aislamiento	75
5.2.11	Inflamación en la mucosa gástrica y su relación con la cantidad de <i>H. pylori</i>	76
5.2.12	Escala histopatológica de Correa y su asociación con la cantidad de <i>H. pylori</i> en mucosa gástrica	77
5.2.13	Efecto de la coinfección por <i>H. pylori</i> y su cantidad sobre el diámetro de la induración PPD en población latente	78
5.3	DISCUSIÓN	79
5.3.1	Prevalencia de infección por <i>H. pylori</i> en población tuberculosa latente	79
5.3.2	Factores asociados con la infección por <i>H. pylori</i> en población LTBI	80
5.3.3	Prevalencia de lesiones gástricas en individuos con LTBI	81
5.3.4	Factores asociados con atrofia gástrica en población coinfectada por <i>H. pylori</i>	82
5.3.5	TNF- α y atrofia gástrica en población LTBI	86
5.3.6	Cantidad de <i>H. pylori</i> en mucosa, inflamación y severidad de las lesiones	86
5.3.7	Efecto de la coinfección por <i>H. pylori</i> y su cantidad en mucosa gástrica sobre el diámetro PPD	87
5.3.8	Limitaciones y fortalezas del estudio	87
5.3.9	Conclusiones y recomendaciones	88

6	CAPÍTULO 3. EFECTO DE LA INFECCIÓN SIMULTÁNEA CON <i>H. pylori</i> Y SU VIRULENCIA SOBRE LA RESPUESTA INMUNE A <i>M. tuberculosis</i>	90
6.1	MATERIALES Y MÉTODOS.....	91
6.1.1	Diseño del estudio y población	91
6.1.2	Métodos de biología molecular	91
6.1.2.1	Extracción de ADN a partir de aislados de <i>H. pylori</i>	91
6.1.2.2	Extracción de ADN genómico a partir de biopsias gástricas.....	92
6.1.2.3	Marcadores de virulencia para <i>H. pylori</i>	92
6.1.2.4	Amplificación de la región <i>s</i> del gen <i>vacA</i>	92
6.1.2.5	Amplificación de la región <i>m</i> del gen <i>vacA</i>	92
6.1.2.6	Amplificación del extremo 5' del gen <i>cagA</i>	93
6.1.2.7	Evaluación de la ausencia del <i>cag</i> PAI por PCR sitio-vacío	93
6.1.2.8	Amplificación de la región variable 3' del <i>cagA</i>	94
6.1.2.9	Electroforesis de los amplificados	94
6.1.2.10	Clasificación de la virulencia bacteriana	94
6.1.3	Métodos de inmunología	95
6.1.3.1	Aislamiento y preservación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	95
6.1.3.2	Descongelamiento de PBMCs.....	96
6.1.3.3	Antígenos.....	96
6.1.3.4	Estandarización del tiempo óptimo de incubación para los antígenos y el mitógeno empleado.....	96
6.1.3.4.1	Elisa cuantitativo para IFN-γ.....	97
6.1.3.5	Cultivo y estimulación antigénica de PBMCs.....	98
6.1.3.6	Estudio de perfiles de citocinas	99
6.1.3.7	Análisis sanguíneos	100
6.1.3.8	Diagnóstico de parásitos intestinales.....	100
6.1.3.9	Plan de análisis estadístico	101
6.2	RESULTADOS	102
6.2.1	Caracterización de la virulencia de <i>H. pylori</i> y su distribución según el tipo de gastritis.....	102
6.2.2	Caracterización de las repeticiones EPIYA en el gen <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i> y su distribución según el tipo de gastritis.....	103
6.2.3	Inflamación en mucosa gástrica y su relación con la virulencia de <i>H.pylori</i>	104
6.2.4	Escala histopatológica de Correa y su asociación con virulencia de <i>H. pylori</i> .	105
6.2.5	Análisis del perfil de citocinas y quimiocinas específicas en respuesta frente antígenos de <i>M. tuberculosis</i> en el contexto de la coinfección por <i>H. pylori</i>	106

6.2.6	Efecto de la virulencia de <i>H. pylori</i> sobre la respuesta inmune frente antígenos de <i>M. tuberculosis</i>	108
6.2.7	Correlaciones entre citocinas y quimiocinas en individuos LTBI con y sin coinfección por <i>H. pylori</i>	110
6.2.8	Análisis de componentes principales.....	110
6.3	DISCUSIÓN	113
6.3.1	Genotipificación de <i>H. pylori</i> entre individuos LTBI.....	113
6.3.2	Variabilidad en el extremo 3' del gen <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i> en individuos con tuberculosis latente	114
6.3.3	Inflamación, severidad de la lesión y virulencia de <i>H. pylori</i>	116
6.3.4	Efecto de la coinfección <i>H. pylori</i> en la respuesta inmune a <i>M.tuberculosis</i> ...	117
6.3.5	Limitaciones y fortalezas del estudio	121
6.3.6	Conclusión y recomendaciones.....	122
7	CONCLUSIONES	123
8	PERSPECTIVAS	124
9	BIBLIOGRAFÍA	125
10	ANEXOS	144

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Infección por <i>M. tuberculosis</i> y mecanismos inmunitarios subyacentes -----	7
Figura 2. Tasas de incidencia de TB estimadas, 2017 -----	11
Figura 3. Prevalencia mundial de <i>H. pylori</i> -----	17
Figura 4. Progresión del adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal ----	20
Figura 5. Efectos del T4SS codificado por el <i>cag</i> PAI y su principal proteína efectora, CagA -----	22
Figura 6. Diversidad en los sitios de fosforilación de la tirosina CagA---	25
Figura 7. Estructura del VacA de <i>H. pylori</i> y efectos funcionales -----	26
Figura 8. Persistencia de la infección por <i>H. pylori</i> -----	29
Figura 9. Diagrama de flujo para la captación, valoración y diagnóstico clínico de infecciones en la población de estudio -----	40
Figura 10. Tendencia en la prevalencia de LTBI según la edad empleando umbrales PPD (≥ 10 mm y ≥ 15 mm) en la población de estudio estratificada por sexo -----	45
Figura 11. Topografía de los sitios anatómicos de toma de biopsias gástricas -----	60
Figura 12. Tendencia en la prevalencia de <i>H. pylori</i> según la edad en la población con tuberculosis latente estratificada por sexo -----	68
Figura 13. Reacción a la PPD en individuos con tuberculosis latente coinfectados por <i>H. pylori</i> según el tipo de gastritis -----	74
Figura 14. Niveles séricos de TNF- α en individuos con LTBI según su estado infeccioso para <i>H. pylori</i> y tipo de gastritis -----	74
Figura 15. Proporción de participantes con abundante, moderada y escasa cantidad de <i>H. pylori</i> según diagnóstico histopatológico y probabilidad de aislamiento -----	76
Figura 16. Proporción de participantes con inflamación de la mucosa gástrica severa, moderada y leve, y su relación con la cantidad de <i>H. pylori</i> -----	77
Figura 17. Análisis histopatológico para biopsias gástricas de individuos con tuberculosis latente coinfectados con cepas de <i>H. pylori</i> según cantidad de la bacteria-----	77
Figura 18. Reacción a la PPD en participantes con tuberculosis latente según su estado <i>H. pylori</i> y cantidad de <i>H. pylori</i> -----	78
Figura 19. Proporción de participantes con inflamación de la mucosa gástrica severa, moderada y leve, y su relación con la virulencia bacteriana -----	105
Figura 20. Análisis histopatológico para biopsias gástricas de individuos con tuberculosis latente coinfectados con <i>H. pylori</i> según virulencia bacteriana -----	105

Figura 21.	Respuesta de citocinas frente antígenos de <i>M. tuberculosis</i> en individuos con tuberculosis latente según su estado para <i>H. pylori</i> -----	107
Figura 22.	Efecto de la virulencia de <i>H. pylori</i> sobre la respuesta inmune frente antígenos de <i>M. tuberculosis</i> en individuos con tuberculosis latente coinfectados por <i>H. pylori</i> -----	109
Figura 23.	Diagrama de dispersión para los dos primeros componentes principales, ilustrando la distribución de los puntajes para 31 individuos LTBI con y sin coinfección por <i>H. pylori</i> -----	112
Figura 24.	Modelos hipotéticos para explicar el efecto de la infección por <i>H. pylori</i> en individuos con infección tuberculosa latente -----	121

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Estudios <i>in vivo</i> que no muestran asociación entre la infección por <i>H. pylori</i> y <i>M. tuberculosis</i> -----	34
Tabla 2. Estudios <i>in vivo</i> que muestran una asociación entre la infección por <i>H. pylori</i> y <i>M. tuberculosis</i> -----	36
Tabla 3. Prevalencia de LTBI empleando dos puntos de corte según características socio-demográficas y del comportamiento en población fuente, y su asociación con el diámetro a la PPD---	43
Tabla 4. Diferencias en la prevalencia de LTBI entre hombres y mujeres por grupos de edad, punto de corte (PPD-10) -----	45
Tabla 5. Diferencias en la prevalencia de LTBI entre hombres y mujeres por grupos de edad, punto de corte (PPD-15) -----	46
Tabla 6. Modelo lineal generalizado para los predictores del diámetro de la PPD -----	47
Tabla 7. Características socio-demográficas y del comportamiento en la población de estudio y su asociación con la positividad en la PPD empleando 2 puntos de corte (≥ 10 mm y ≥ 15 mm) ---	48
Tabla 8. Factores asociados con la positividad en PPD-10 utilizando una regresión logística multivariada -----	49
Tabla 9. Factores asociados con la positividad en PPD-15 utilizando una regresión logística multivariada -----	50
Tabla 10. Características socio-demográficas y estilos de vida en población tuberculosa latente sometida a endoscopia -----	66
Tabla 11. Diferencias en la prevalencia de infección por <i>H. pylori</i> entre hombres y mujeres por grupos de edad -----	68
Tabla 12. Factores asociados con la infección por <i>H. pylori</i> en población LTBI utilizando un modelo de regresión logística --	69
Tabla 13. Frecuencia de detección de <i>H. pylori</i> según método diagnóstico y sitio anatómico de obtención de la biopsia de mucosa gástrica -----	69
Tabla 14. Características bacterianas y su asociación con el tipo de gastritis crónica en población tuberculosa latente -----	70
Tabla 15. Características sociodemográficas, estilos de vida y su asociación según el tipo de gastritis crónica en población LTBI coinfectada por <i>H. pylori</i> -----	72
Tabla 16. Factores asociados con gastritis atrófica en población LTBI coinfectada por <i>H. pylori</i> utilizando un modelo de regresión logística -----	73
Tabla 17. Comparación de casos por método diagnóstico para detección de <i>H. pylori</i> y tipo gastritis -----	75
Tabla 18. Sistema de graduación para los factores de virulencia <i>cagA</i> y <i>vacA</i> basada en sus efectos a nivel celular -----	95

Tabla 19.	Prevalencia de genotipos de <i>H. pylori</i> según el tipo de gastritis en individuos LTBI coinfectados por <i>H. pylori</i> -----	103
Tabla 20.	Diversidad de la proteína CagA según el número de motivos EPIYA presentes en aislados de individuos LTBI coinfectados por <i>H. pylori</i> -----	104
Tabla 21.	Detección del islote de patogenicidad <i>cag</i> por dos métodos de PCR en individuos LTBI coinfectados por <i>H. pylori</i> -----	104
Tabla 22.	Análisis de componentes principales para 9 citocinas/quimiocinas medidas en individuos LTBI -----	110

LISTA DE ABREVIACIONES

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ARI: Annual risk infection
BCG: Bacille Calmette-Guérin
CDC: Centers for disease control and prevention
CFP-10: Culture filtrate protein 10
CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad
DC-SING: Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule grabbing non Integrin
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT: Enzyme-linked immunospot assay
ESAT-6: Early secreted antigenic target 6
Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2
HR: Hazard ratio
IC: Intervalo de confianza
IL: Interleucina
IP-10: Interferon gamma-induced protein 10
IGRA: Interferon- γ release assay
K: Valor kappa
LPS: Lipopolysaccharide
LTBI: Latent tuberculosis infection
MALT: Mucosa-associated lymphoid tissue
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases
MFI: Median fluorescent intensity
MINCLE: Macrophage inducible C-type lectin
NFAT: Nuclear factor of activated T cells
NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NO: Nitric oxide
NOD1: nucleotide-binding oligomerization domain-containing 1
NOS2: Nitric oxide synthase 2
NTM: Nontuberculous mycobacteria
OR: Odds ratio
PAMP: Pathogen-associated molecular patterns
PBMC: Peripheral blood mononuclear cell
PCR: Polymerase reaction chain
PPD: Purified protein derivative
PRR: Pattern recognition receptor
QFT: QuantiFERON-TB GOLD interferon- γ release assay
ROS: Reactive oxygen species
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
RPTP: receptor-like protein-tyrosine phosphatase

SFB: Serum fetal bovine
SHP-2: Src homology 2 domain–containing tyrosine phosphatase 2
T4SS: Type IV secretion system
TB: Tuberculosis
TLR: Toll-like receptors
PPD: Tuberculin skin test
Tregs: T regulatory lymphocytes
UBT: Urea breath test
WHO: World health organization
ZO-1: Zonula occludens-1

GLOSARIO

Adenocarcinoma: Tejido maligno transformado completamente que surge del epitelio glandular.

Adipocinas: moléculas bioactivas derivadas del tejido adiposo principalmente del tejido adiposo blanco, y tienen un papel primordial en la homeostasis de varios procesos fisiológicos, entre los que se incluyen: la ingesta de alimentos, la regulación del equilibrio energético, la acción de la insulina, el metabolismo de la glucosa, resistina, leptina y adiponectina, también participan en la remodelación de la vascularización, la regulación de la presión arterial y la coagulación.

Aducto: Se refiere a una entidad química que se produce por la unión de dos moléculas mediante un enlace covalente.

Afluente: Agua u otro líquido que ingresa a un reservorio, planta de tratamiento o proceso de tratamiento.

Analito: Es una sustancia, la cual puede ser un ion, un elemento, o incluso un compuesto determinado de interés.

ARI: Es la probabilidad anual de infección que tiene una persona sin contacto previo con el bacilo tuberculoso.

Autoinducción (Quorum sensing): Mecanismo de control de expresiones genéticas dependiente de la densidad celular. Este fenómeno es el responsable de que un conjunto de células independientes, bajo la influencia de señales extracelulares, desarrolle comportamientos sociales coordinados.

Axénico: Un cultivo axénico consiste en una sola especie microbiana, proveniente de una sola célula.

Carga de enfermedad: indicador para medir el impacto de las pérdidas mortales y no mortales de una enfermedad y los accidentes en las personas, para orientar la toma de decisiones por medio de la priorización e inversión económica en salud.

Caso incidente de TB: Contacto domiciliario que desarrolló TB activa durante el seguimiento del estudio.

Caso prevalente de TB (índice): caso de TB activa sin tratar desde el inicio del estudio.

Catalasa: Enzima perteneciente a la categoría de las oxidoreductasas que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua.

Cepa: Variante fenotípica de una especie o un taxón usualmente propagada de forma clonal, debido al interés en la conservación de sus cualidades específicas.

Disbiosis: Es un "desequilibrio" en la comunidad microbiana intestinal que está asociada con la enfermedad. Este desequilibrio podría deberse a la ganancia o pérdida de miembros de la comunidad o cambios en la abundancia relativa de microorganismos. Esta teoría se centra principalmente en los cambios en la composición taxonómica de la comunidad microbiana y en las funciones asociadas con miembros individuales o subconjuntos de miembros en la comunidad.

Displasia: Trastorno citológico y arquitectónico que involucra un revestimiento de células epiteliales que no está delimitado por la membrana basal (la cual separa las células epiteliales de la lámina propia subyacente), y la capacidad de metástasis está ausente. Se califica como indefinida, bajo grado y alto grado.

Efecto espectador: La fina especificidad de las células y moléculas efectoras para un antígeno estimulante es usualmente considerada la más importante característica de una respuesta inmune. Sin embargo, cada respuesta inmune puede verse de hecho como una respuesta compuesta de dos partes: 1) Directa, interacciones antígeno específicas entre las células, que dan como resultado una respuesta específica frente al antígeno; y 2) Indirecta, fenómeno no específico de antígeno, denominado efecto "espectador", que resulta en respuestas policlonales. Ambos aspectos de la respuesta se producen simultáneamente y dan cuenta de la respuesta general, que comprende eventos tanto específicos como no específicos (1).

Efluente: Es la salida de agua desde un cuerpo natural de agua o desde una estructura fabricada por el ser humano, como una planta de tratamiento de aguas residuales.

Especificidad: Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo.

Estrés oxidativo: Es un proceso de desequilibrio oxidante antioxidante en el que la cantidad de radicales libres generados endógena y exógenamente sobrepasan la capacidad de los sistemas antioxidantes, causando daños estructurales en diferentes macromoléculas, lípidos, proteínas y ADN.

Exotoxina: Es una toxina secretada por un microorganismo que causa daño tisular en el hospedero o perturba su metabolismo celular. Pueden ser secretadas, o al igual que las endotoxinas, pueden ser liberadas durante la lisis celular.

Fuerza de la infección TB: Porcentaje de individuos susceptibles quienes se convierten en infectados latentemente con *M. tuberculosis* anualmente.

Gastritis atrófica: Un paso histológico intermedio en la progresión a adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal, caracterizado por pérdida glandular e invasión de células inflamatorias hacia el interior de las zonas glandulares. Se gradúa como indefinida, leve, moderada o atrofia marcada.

Gastritis: Inflamación dentro de la mucosa gástrica. La gastritis inducida por *H. pylori* involucra células polimorfonucleares, linfocitos T, linfocitos B, macrófagos y células plasmáticas.

Genotipo: Alelo concreto o constitución genética de un organismo; a menudo, la composición alélica de uno o de un número limitado de genes que se está investigando.

Hematocrito: Es el porcentaje que ocupa la fracción sólida de una muestra de sangre anticoagulada, al separarse de su fase líquida (plasma). Está determinado casi enteramente por el volumen que ocupan los glóbulos rojos.

Hipoclorhidria: Disminución de la secreción de ácido por el estómago, a menudo como un resultado de la gastritis atrófica o uso de medicamentos supresores de ácido, tales como inhibidores de bomba de protones.

Incidencia: Número de casos nuevos de una enfermedad en una población determinada y en un periodo determinado.

Linfoma MALT: Es una forma rara del linfoma maligno no Hodgkin, que afecta a las células B y se desarrolla a expensas del tejido linfoide asociado a las membranas mucosas, aunque también ocurre, más raramente en los ganglios linfáticos.

Locus: Posición fija dentro de un cromosoma (en plural, loci)

Metaplasia intestinal: Una lesión histológica premaligna en la progresión a adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal, en la cual la mucosa gástrica normal es reemplazada por células epiteliales de tipo intestinal. Se subclasifica como completa (tipo de intestino delgado), definido por la presencia de enterocitos absorbentes con borde en cepillo, alternando con células caliciformes, o incompleta (tipo colónico), definido por la presencia de células columnares con citoplasma espumoso, sin borde en cepillo.

Metabolismo oxidativo: Proceso químico en que el oxígeno se usa para producir energía a partir de los carbohidratos.

Microaerófilo: Microorganismos que requieren niveles de oxígeno muy inferiores a los que se encuentran normalmente en la atmósfera terrestre para sobrevivir

No progresor: Contacto doméstico de caso de TB que permaneció libre de enfermedad durante el seguimiento del estudio (por lo menos 2 años).

Pangastritis: Gastritis generalizada en todo el estómago.

Peroxidación lipídica: Interacción de los radicales libres con los lípidos séricos y tisulares, un proceso que da lugar a varios metabolitos de degradación, uno de ellos el malondialdehído, único aldehído medible, ampliamente usado como biomarcador de estrés oxidativo.

Prevalencia: Proporción de individuos de un grupo o una población que presentan una característica en un período determinado.

Población fuente: Población donadora de individuos, se sostiene a sí misma y sostiene a otras poblaciones sumidero o subpoblaciones que no sobrevivirán en caso de desaparecer la fuente.

Sensibilidad: Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo.

Terapia intravesical: Administración de un medicamento directamente en la vejiga en lugar de suministrarlo por boca o inyectado en sangre. El medicamento se administra por un catéter blando que se coloca en la vejiga a través de la uretra.

Valor predictivo positivo (VPP): Probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en la prueba diagnóstica.

Vagotomía: Es un procedimiento quirúrgico donde se lleva a cabo la sección del nervio vago con el objetivo de impedir el estímulo nervioso por parte de éste, y de esta forma disminuir la secreción de ácidos gástricos.

CONCEPTOS ESTADÍSTICOS

Ajuste de Bonferroni: Técnica estadística que ajusta el nivel de significancia en relación al número de pruebas estadísticas realizadas simultáneamente sobre el conjunto de datos. Es útil para contrarrestar el aumento en la probabilidad de rechazar la hipótesis nula siendo esta verdadera (error tipo I).

Análisis de componentes principales (APC): Es especialmente adecuado cuando se desea tener en cuenta los patrones de variación de un único conjunto de variables con varios tipos de niveles de escalamiento óptimos. Esta técnica intenta reducir la dimensionalidad de un conjunto de variables al mismo tiempo que tiene en cuenta toda la variación que sea posible. Se asignan valores de escala a cada categoría de cada variable de manera que estos valores sean óptimos respecto a la solución de componentes principales. Los objetos del análisis reciben puntuaciones de componentes en función de los datos cuantificados. Los gráficos de las puntuaciones de componentes revelan los patrones de los objetos del análisis y pueden revelar objetos poco habituales en los datos. En el APC, el primer componente explica la mayor parte de la varianza total, el segundo factor explica la varianza restante, es decir, de la que no explicaba el primero y así sucesivamente.

ANOVA de un factor: Se utiliza para comparar las medias de tres o más grupos con el fin de determinar si difieren entre sí de manera significativa. Otra función importante es la estimación de las diferencias entre grupos específicos. El método más común para detectar diferencias entre grupos en ANOVA de un solo factor es la prueba F, que se basa en el supuesto de que las poblaciones de todas las muestras comparten una desviación estándar común, aunque desconocida.

Autovalor (valores propios): son las varianzas de los componentes principales.

Coeficiente de Correlación lineal simple (r): Mide el grado de asociación lineal entre dos variables. Este estadístico oscila entre 1 (fuerte asociación lineal positiva: a medida que aumenten los valores de una variable aumentarán los de la otra) y -1 (fuerte asociación lineal negativa: a medida que aumenten los valores de una variable disminuyen los de la otra). Cuando los valores de este estadístico se aproximen a 0 indica que entre las dos variables no existe asociación lineal y, en consecuencia, carece de sentido determinar el modelo y/o ecuación de regresión lineal. Para determinar si la asociación es significativa se puede contrastar la H_0 ($r=0$). Si el valor p asociado es menor ≤ 0.05 se rechaza H_0 .

Coeficiente de determinación (R^2): Se define a partir del coeficiente de correlación múltiple (R) y mide la proporción de variabilidad de la variable dependiente explicada por la variable independiente introducida o por la recta de regresión. El valor resultante al multiplicarlo por 100, permite obtener el porcentaje de variabilidad explicada.

Coeficiente R^2 de Cox & Snell: Es un coeficiente de determinación generalizado que se utiliza para estimar la proporción de varianza de la variable dependiente explicada por las variables predictoras (independientes). La R^2 de Cox y Snell se basa en la comparación del log de la verosimilitud para el modelo respecto al log de la verosimilitud para un modelo de línea base. Sus valores oscilan entre 0 y 1.

Coeficiente β : Es un coeficiente estimado asociado con un predictor (factor o covariable) que representa el cambio en la función de enlace por cada cambio de unidad en el predictor, mientras los demás predictores se mantienen constantes. Un cambio de unidad en un factor se refiere a una comparación de un determinado nivel con el nivel de referencia. Un valor negativo de β indica una asociación inversa y un valor positivo de β indica una asociación directa.

Coeficiente κ : Refleja la concordancia inter-observador y puede ser calculado en tablas de cualquier dimensión, siempre y cuando se contrasten dos observadores. El coeficiente kappa puede tomar valores entre 0 y 1. Mientras más cercano a 1, mayor es el grado de concordancia inter-observador, por el contrario, mientras más cercano a 0, mayor es el grado de discordancia inter-observador. Un valor de $\kappa=0$ refleja que la concordancia observada es precisamente la que se espera producto del azar (2). Con frecuencia se emplea la escala propuesta por Landis y Koch 1977 (3), para expresar cualitativamente la fuerza de la concordancia. Desde el punto de vista estadístico, el coeficiente kappa no proporciona indicación de la precisión de dicha estimación, siendo importante conocer su variabilidad, con el fin de plantear pruebas de hipótesis y construir intervalos de confianza kappa. La hipótesis nula (H_0) y alternativa (H_1) son: $H_0: \kappa = 0$ y $H_1: \kappa \neq 0$. Su resultado indica si el valor del coeficiente es estadísticamente significativo, con un determinado nivel de confianza, permitiendo realizar la inferencia estadística.

Coeficiente kappa	Fuerza de la concordancia
0,00	Pobre (<i>Poor</i>)
0,01 - 0,20	Leve (<i>Slight</i>)
0,21 - 0,40	Aceptable (<i>Fair</i>)
0,41 - 0,60	Moderada (<i>Moderate</i>)
0,61 - 0,80	Considerable (<i>Substantial</i>)
0,81 - 1,00	Casi perfecta (<i>Almost perfect</i>)

Tomado de Cerda y Villaroel del P 2008 (2).

Correlación de Pearson: Mide la fuerza o grado de asociación entre dos variables aleatorias cuantitativas que poseen una distribución normal bivariada conjunta. La interpretación de los valores se ha expresado por diversos autores en escalas, siendo una de las más utilizadas la que se presenta a continuación:

RANGO	RELACIÓN
-0.91 a -1.00	Correlación negativa perfecta
-0.76 a -0.90	Correlación negativa muy fuerte
-0.51 a -0.75	Correlación negativa considerable
-0.11 a -0.50	Correlación negativa media
-0.01 a -0.10	Correlación negativa débil
0.00	No existe correlación
+0.01 a +0.10	Correlación positiva débil
+0.11 a +0.50	Correlación positiva media
+0.51 a +0.75	Correlación positiva considerable
+0.76 a +0.90	Correlación positiva muy fuerte
+0.91 a +1.00	Correlación positiva perfecta

Tomado de Mondragón 2014 (4).

Curva logística de 5 parámetros (5PL): El modelo de regresión logística no lineal 5PL se usa comúnmente para el análisis de ajuste de curvas en bioensayos o inmunoensayos como ELISA, RIA, o curvas de dosis-respuesta. La curva de dosis-respuesta estándar a veces se denomina ecuación logística de cinco parámetros. Se caracteriza por su forma clásica en "S" o sigmoidal que se adapta a las mesetas inferiores y superiores de la curva, la EC50 y el factor de la pendiente. Esta curva es simétrica alrededor de su punto de inflexión.

Desviación estándar: Es una medida que se usa para cuantificar la variación o dispersión de un conjunto de datos numéricos. Una desviación estándar baja indica que la mayor parte de los datos de la muestra tienden a estar agrupados cerca de su media aritmética, mientras que una desviación estándar alta indica que los datos se extienden sobre un rango de valores más amplio.

Error estándar de la media: Error debido a la estimación de la media poblacional a partir de las medias muestrales, es la desviación estándar de todas las posibles muestras (de un tamaño dado) escogidas de esa población.

Error tipo I (α): Ocurre cuando se rechaza la hipótesis nula siendo verdadera. La probabilidad de cometer un error de tipo I es α , que es el nivel de significancia que se establece para la prueba de hipótesis. Un α de 0.05 indica que usted está dispuesto a aceptar una probabilidad de 5 % de estar equivocado al rechazar la hipótesis nula.

Error tipo II (β): Ocurre cuando se acepta la hipótesis nula siendo falsa. La probabilidad de cometer un error de tipo II es β , que depende de la potencia de la prueba. Puede reducirse el riesgo de cometer un error de tipo II al asegurarse de que la prueba tiene suficiente potencia. Para ello, el tamaño de la muestra debe ser

lo suficientemente grande para detectar una diferencia práctica cuando está realmente exista.

Estandarización de variables: Se aplica a las variables independientes para poder comparar la magnitud de sus efectos sobre la variable de respuesta (dependiente), sin influencia de la escala de medición. En otras palabras, se re-escala la variable predictora a media = 0, y desviación estándar= 1.

Estudio observacional: Es un estudio de carácter estadístico y demográfico en el que no hay intervención por parte del investigador, y éste se limita a medir las variables que define en el estudio. Un estudio observacional puede ser descriptivo o analítico.

Modelo lineal generalizado: Amplía el modelo lineal general, de manera que la variable dependiente está relacionada linealmente con los factores y las covariables mediante una determinada función de enlace. Además, el modelo permite que la variable dependiente tenga una distribución no normal. Se basa en el supuesto que las observaciones son independientes.

Odds ratio (OR): También llamado razón de ventajas, es una medida de asociación entre variables utilizada en estudios epidemiológicos transversales, y de casos y controles, así como en los meta-análisis. Se define como la posibilidad que una condición de salud o enfermedad se presente en un grupo de la población frente al riesgo que ocurra en otro. Los odds ratio oscilan entre 0 e infinito. Un OR de 1 indica ausencia de asociación entre las variables. Los valores <1 indican una asociación negativa y >1 indican una asociación positiva entre las variables. Cuanto más se aleje el OR de 1, más fuerte es la relación. Aunque su información es descriptiva, si su intervalo de confianza (IC) no incluye al 1, se concluye que la asociación es estadísticamente significativa.

Prueba de Dunnett: Se utiliza en ANOVA para crear intervalos de confianza para las diferencias entre la media de cada nivel de factor y la media de un grupo de control.

Prueba de Kaiser-Meyer-Olkin: Contrasta si las correlaciones parciales entre las variables son suficientemente pequeñas. El estadístico KMO varía entre 0 y 1. Los valores pequeños indican que el análisis de componentes principales puede no ser una buena idea, dado que las correlaciones entre los pares de variables no pueden ser explicadas por otras variables. Los valores menores de 0.5 indican que no debe utilizarse el APC con los datos muestrales que se están analizando.

Ponderación relativa $1/Y^2$: En muchas situaciones experimentales, se espera que la distancia promedio (o más bien el valor absoluto promedio de la distancia) de los puntos de la curva sea mayor cuando Y es mayor. Otra forma de decir esto es que se espera que la desviación estándar de los residuos (distancia de los puntos

de la curva) aumente cuando Y sea mayor, para que la desviación estándar sea proporcional al valor de Y . Si la desviación estándar de los residuos está relacionada con el valor de Y , entonces los puntos con valores más grandes de Y tenderán a estar más alejados de la curva (tienen residuos más grandes). Por lo tanto, estos puntos contribuirán más a la suma de cuadrados, y dominarán los cálculos. La solución no es minimizar la suma de cuadrados, sino minimizar la suma de cuadrados ponderada. De esta forma los puntos en cualquier parte de la curva contribuyen igual a la suma de cuadrados.

Prueba de esfericidad de Bartlett: En el APC contrasta la hipótesis nula de que la matriz de correlaciones es una matriz identidad, en cuyo caso no existirían correlaciones significativas entre las variables y el modelo factorial no sería pertinente. Si H_0 se rechaza se puede continuar con el análisis.

Prueba de Kolmogorov-Smirnov: Esta prueba compara la función de distribución acumulada empírica (ECDF) de los datos de la muestra con la distribución esperada si los datos fueran normales. Si esta diferencia observada es adecuadamente grande, la prueba rechazará la hipótesis nula de normalidad de la población. Si el valor p de esta prueba es menor que el nivel de significancia (α) elegido, se puede rechazar la hipótesis nula y concluir que se trata de una población no normal. Ideal para muestras > 50 .

Prueba de Kruskal-Wallis: Es un método no paramétrico para probar si un grupo de datos proviene de la misma población, siendo una extensión de la prueba de la U de Mann-Whitney para 3 o más grupos. Si bien la prueba permite contrastar la hipótesis general de que todas las medias o medianas de la población son iguales. Con frecuencia, el investigador no está realmente interesado en esta hipótesis sino en las comparaciones entre los grupos individuales. Para este caso, se realizan comparaciones múltiples a posteriori en un escenario no paramétrico empleando el método de Dunn.

Prueba de Shapiro-Wilk: Se usa para contrastar la normalidad de un conjunto de datos, cuando el tamaño de la muestra es máximo 50.

Prueba exacta de Fisher: Prueba utilizada en análisis de tabla de contingencia 2×2 . El valor p de la prueba es exacto para todos los tamaños de muestra, mientras que los resultados de la prueba de chi-cuadrado que examina las mismas hipótesis pueden ser inexactos cuando los conteos de celda son pequeños.

Prueba t student: Es una prueba de hipótesis de la media de una o dos poblaciones distribuidas normalmente. Aunque existen varios tipos de prueba t para situaciones diferentes, en todas se utiliza un estadístico de prueba que sigue una distribución t bajo la hipótesis nula. Una propiedad importante es su robustez con muestras grandes, las pruebas t suelen ser válidas incluso cuando se viola el supuesto de normalidad. Sin embargo, con un tamaño de muestra pequeño y distribuciones no

normales y muy asimétricas, podría ser más conveniente usar pruebas no paramétricas.

Prueba *U* de Mann-Whitney: Prueba no paramétrica aplicada a dos muestras independientes. Es la versión no paramétrica de la habitual prueba *t* de Student.

Regresión logística multivariada: Resulta útil para los casos en los que se desea predecir la presencia o ausencia de una característica o resultado según los valores de un conjunto de predictores (variables independientes). Es similar a un modelo de regresión lineal, pero está adaptado para modelos en los que la variable dependiente es dicotómica. Los coeficientes de regresión logística pueden utilizarse para estimar la odds ratio (OR) de cada variable independiente del modelo. Este procedimiento no se basa en supuestos de distribución normal. Al igual que con otras formas de regresión, la multicolinealidad entre los predictores puede llevar a estimaciones sesgadas y a errores estándar inflados.

Regresión lineal simple: Examina la relación lineal entre dos variables continuas: una respuesta (Y) y un predictor (X). Cuando las dos variables están relacionadas, es posible predecir un valor de respuesta a partir de un valor predictor con una exactitud mayor que la asociada únicamente a las probabilidades.

Rotación ortogonal: Es un método que se utiliza para facilitar la interpretación de soluciones factoriales. El método varimax, minimiza el número de variables que tiene saturaciones altas en cada factor.

Simulación de muestreo (Bootstrapping): Es un método para derivar estimaciones robustas de errores estándar e intervalos de confianza para estimaciones como la media, mediana, proporción, razón de las ventajas, coeficientes de correlación o coeficientes de regresión. También se puede utilizar para crear contrastes de hipótesis. La simulación de muestreo es más útil como alternativa a estimaciones paramétricas en caso de que los supuestos de esos métodos sean dudosos (como en el caso de modelos de regresión con residuos sin homogeneidad de varianza y que se ajusten a muestras pequeñas).

Transformación de variables: La tipificación de variables resulta muy útil para eliminar su dependencia respecto a las unidades de medida empleadas. En realidad, una tipificación equivale a una transformación lineal. Comúnmente se emplea cuando el modelo no se ajusta a los datos o los residuos no cumplen con los supuestos del modelo. Si se tienen distribuciones de frecuencias con asimetría negativa (frecuencias altas hacia el lado derecho de la distribución), es conveniente aplicar la transformación $y = x^2$. Esta transformación comprime la escala para valores pequeños y la expande para valores altos. Para distribuciones asimétricas positivas se usan las transformaciones $\sqrt{x}$, $\ln(x)$, $\log_{10}(x)$ y $1/x$, que comprimen los valores altos y expanden los pequeños.

Variabilidad: Se refiere a las diferencias observadas que pueden atribuirse a la verdadera heterogeneidad o diversidad de una población. La variabilidad deriva de procesos que, o bien son intrínsecamente aleatorios, o bien tienen una naturaleza y efectos influyentes pero desconocidos. Generalmente, no se reduce mediante nuevas mediciones o estudios, pero se puede caracterizar utilizando cantidades como la varianza de la muestra (σ^2).

Varianza (σ^2): Mide qué tan dispersos están los datos alrededor de la media. La varianza es igual a la desviación estándar elevada al cuadrado.

RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. Se estima que el 23 % de la población está infectada latentemente por *Mycobacterium tuberculosis* (LTBI) constituyendo un importante reservorio para la TB. Muchos de los individuos infectados progresan a enfermedad activa en ausencia de condiciones inmunosupresoras subyacentes. En este contexto, la infección crónica de mucosas por *Helicobacter pylori* podría jugar un papel importante, dado que ambas infecciones frecuentemente coexisten en el hospedero a lo largo de su vida. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la coinfección por *H. pylori* sobre la respuesta inmune a *M. tuberculosis* entre individuos con infección latente. Se realizó un estudio de corte transversal, se suministró la PPD y un cuestionario a 589 participantes entre 14-70 años sin enfermedades crónicas de base. Los individuos con induración ≥ 10 mm, y Rx-tórax normal se clasificaron con LTBI, y se invitaron a practicarse una endoscopia; las biopsias obtenidas fueron usadas para histopatología y cultivo de *H. pylori*. Adicionalmente, se tomaron muestras de sangre para la obtención de PBMCs. Las células se cultivaron en presencia de antígenos de *M. tuberculosis* (CFP 20 $\mu\text{g/mL}$) por 72 h, y a partir de los sobrenadantes se realizó la medición de múltiples citocinas. 149 (25.3 %) individuos fueron LTBI, 80 % fueron mujeres, y 66 % eran mayores de 40 años. De los individuos con LTBI sometidos a endoscopia, 83 % (78/94) presentaron coinfección por *H. pylori* y la prevalencia de atrofia gástrica fue de 9.6 %. La coinfección por *H. pylori* no se asoció con la positividad en la PPD. Se evidenció una alta prevalencia de genotipos de alta virulencia entre individuos con gastritis atrófica ($p=0.041$). El alelo *m1* del gen *vacA* fue el único marcador que se asoció con la presencia de atrofia ($p=0.038$). En los 31 individuos seleccionados para estudios de perfil inmune, la coinfección con *H. pylori* específicamente con genotipos de alta virulencia, se asoció con una reducción en los niveles de IP-10 ($p=0.043$), y una tendencia hacia la reducción en los niveles de IFN- γ e IL-2 componentes claves en la inmunidad a TB. Pese a la alta incidencia de TB en Cali (41 nuevos casos por 100.000 habitantes/año), la prevalencia de LTBI fue moderada. Por el contrario, hay una elevada prevalencia de *H. pylori* (con cepas de alta virulencia) en la población de estudio. Los genotipos de alta virulencia se asociaron con una reducción en la respuesta inmune frente antígenos micobacterianos que podría incrementar el riesgo de desarrollar TB activa.

Palabras clave: Coinfección, Infección tuberculosa latente, PPD, *M. tuberculosis*, *H. pylori*

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is one of the main causes of morbidity and mortality in the world. It is estimated that 23 % of the global population is latently infected with *M. tuberculosis* (LTBI), representing an important reservoir for TB. Many infected individuals progress to active disease in the absence of underlying immunosuppressive conditions. Chronic mucosal infection by *H. pylori* could play an important role, given that both infections frequently coexist in the host throughout life. The aim of this study was to evaluate the effect of *H. pylori* coinfection on immune response to *M. tuberculosis* in individuals with latent infection. A cross-sectional study was conducted. A total of 589 individuals between 14-70 years without chronic underlying diseases were subjected to a tuberculin skin test (protein purified derivate, PPD) and a survey. Individuals with induration ≥ 10 mm and normal chest-X-ray were considered to have a LTBI, and they were further examined by endoscopy. Gastric biopsies were subjected to histopathology and culture to detect *H. pylori*. Blood samples were also taken to obtain PBMCs. The cells were cultured in the presence of *M. tuberculosis* antigens (CFP 20 $\mu\text{g/mL}$) for 72 h, and multiplex cytokine measurement was performed from the supernatants. From 149 (25.3 %) individuals having LTBI, 80 % were women, and 66 % were older than 40 years. Those individuals with LTBI and endoscopy, 83 % (78/94) presented coinfection with *H. pylori* and the prevalence of gastric atrophy was 9.6 %. No association was found between coinfection with *H. pylori* and PPD positivity. There was a high prevalence of high-virulence strains in individuals with atrophic gastritis ($p=0.041$). The *m1* allele of *vacA* gene was the only marker that was associated with the presence of atrophy ($p=0.038$). Of 31 individuals selected for studies of immune profile, *H. pylori* coinfection with high-virulence strains was associated with a reduction in IP-10 levels ($p=0.043$), and a trend towards reduction in the levels of IFN- γ and IL-2 key components in TB immunity. Despite the high TB incidence in Cali (40 new cases per 100.000 population per year), the prevalence of LTBI was moderate. By contrast, there was a high prevalence of *H. pylori* (high-virulence strains) in the study population. High virulence genotypes were associated with downregulation of immune response against mycobacterial antigens that could lead to an increased risk of developing TB.

Key words: Coinfection, latent tuberculosis infection, PPD, *M. tuberculosis*, *H. pylori*

1 INTRODUCCIÓN

Muchos patógenos humanos, incluyendo virus, bacterias, helmintos, protozoos y hongos, a menudo coexisten dentro del hospedero (5-7). Las coinfecciones involucran agentes patógenos causantes de enfermedades de importancia mundial, como el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (8), tuberculosis (9), malaria (10), leishmaniasis (11) y dengue (12). Se estima que la prevalencia de la coinfección excede un sexto de la población mundial (13). Los patógenos coinfectantes interactúan de forma directa con otros o indirectamente a través de la competencia por los recursos del hospedero y la modulación del sistema inmune (7). En comparación con las infecciones por un único patógeno, las coinfecciones pueden alterar la transmisión, la progresión clínica y control de múltiples enfermedades infecciosas de importancia en salud pública (14, 15).

El interés en las coinfecciones ha aumentado en los últimos años, sin embargo, los estudios realizados han utilizado diferentes enfoques metodológicos que generan controversia (13). El estudio en coinfección requiere más investigación, especialmente entre humanos (7, 16-18). Las publicaciones recientes han mostrado que los efectos negativos de la coinfección en la salud humana son más frecuentes que los efectos positivos o neutros (sin efecto en la salud del hospedero). Sin embargo, los patógenos coinfectantes frecuentemente notificados difieren de aquellas infecciones que causan mayor mortalidad a nivel global (13). Se requiere más investigación para evaluar el impacto de relevantes patógenos coinfectantes sobre el control de las enfermedades infecciosas más prevalentes, y para comprender cómo la erradicación de un patógeno coinfectante puede afectar el curso de la enfermedad.

La tuberculosis persiste como un importante problema de salud pública en los países en desarrollo. Se estima que un tercio de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis* sin manifestaciones clínicas (infección latente). En esta población, la respuesta inmune del hospedero inhibe la replicación bacteriana y previene la progresión a enfermedad a lo largo de la vida, aunque la infección persiste (19). La reactivación de la infección y la progresión a la enfermedad puede ser causada por una inmunosupresión generalizada, como en el caso del VIH. No obstante, el 50 % de las personas con tuberculosis activa no muestran compromiso inmunológico (20).

La respuesta inmune es esencial para el control de la infección por *M. tuberculosis* (21). La producción de algunas citocinas juega un papel importante en la generación de una respuesta inmune protectora. Dos potentes citocinas inflamatorias IFN- γ e IL-17, inducen la expresión de quimiocinas que promueven el reclutamiento de células y la formación de granulomas. Por el contrario, una respuesta Th2 asociada con altos niveles de IL-4 e IL-13, así como la liberación de citocinas reguladoras, incluidas IL-10 y TGF- β , promueven la progresión a una enfermedad activa (22, 23). Estudios recientes han explorado el impacto de la variación geográfica en la

inmunidad a la tuberculosis (24, 25). En comparación con sus homólogos en países industrializados, los individuos de países en desarrollo muestran diferencias significativas en los perfiles inmunológicos que pueden afectar la respuesta a los antígenos de *M. tuberculosis*. Estos perfiles inmunes parecen ser el resultado de la exposición continua a micobacterias ambientales, helmintos y bacterias gastro-intestinales (19, 26).

En muchas poblaciones principalmente de países en desarrollo, *H. pylori* frecuentemente coexiste en el hospedero con infección de tuberculosis latente (19). *H. pylori* es típicamente adquirido en la infancia después del primer año de vida favorecido por condiciones de hacinamiento y falta de higiene. Se estima infecta alrededor del 80 % de las personas que viven en estos países (27). La colonización por *H. pylori* estimula una fuerte respuesta inmune humoral y adaptativa, local y sistémica (28). En particular, la respuesta inmune adaptativa juega un papel importante en la patogénesis. Se ha descrito que la infección por *H. pylori* también induce una respuesta de células T reguladoras que expresan altos niveles de IL-10 y TGF- β que juegan un papel importante en el control de la inflamación local y la homeostasis inmunitaria (29, 30). Esto contribuye a la persistencia de la infección a lo largo de la vida. Los efectos fisiológicos e inmunológicos inducidos por este microorganismo son lo suficientemente fuertes tal que su erradicación en países desarrollados se ha asociado con un desequilibrio en las respuestas Th1/Th2, y una disminución de los linfocitos T reguladores predisponiendo a condiciones como asma, alergias (27, 31) y enfermedades autoinmunes (32). Poco se conoce acerca del entrecruzamiento de estas infecciones y si una afecta las manifestaciones clínicas de la otra. Los pocos estudios realizados buscando un vínculo epidemiológico entre *H. pylori* y *M. tuberculosis* han mostrado resultados contradictorios (20, 33-37).

En Colombia, un país donde la tuberculosis cada día recupera protagonismo, y la infección por *H. pylori* es altamente prevalente, este tipo de investigaciones no se han realizado. Con el fin de contribuir al conocimiento del impacto de las infecciones concurrentes sobre la historia natural de la tuberculosis, en este trabajo se estudió el efecto de la coinfección por *H. pylori* sobre la respuesta inmune específica a *M. tuberculosis* en individuos con infección tuberculosa latente. Esta investigación puede ayudar a dilucidar la compleja interacción entre estas dos infecciones crónicas orientada a entender por qué una gran proporción de las personas infectadas pueden controlar la infección por *M. tuberculosis*, mientras otras progresarán a tuberculosis, facilitando la construcción de estrategias adecuadas para el control y prevención de la tuberculosis en zonas endémicas.

2 MARCO TEÓRICO

Las coinfecciones (infección simultánea de un hospedero con 2 o más patógenos) son ubicuas en la naturaleza, pero la mayoría de las investigaciones sobre enfermedades de alta carga se basa en gran parte en la perspectiva "una enfermedad - un patógeno". Desde el punto de vista de la ecología de las comunidades, un hospedero puede ser considerado como un ecosistema complejo compuesto por microorganismos que directa o indirectamente interactúan entre sí y con su entorno, el hospedero. Esta perspectiva integral considera las coinfecciones como casos específicos de competencia que regulan las poblaciones de microorganismos dentro del hospedero, bien sea protegiendo o favoreciendo el curso de la infección. Estas interacciones son posibles entre microparásitos (virus, bacterias, hongos o protozoos) y macroparásitos (helmintos) que habitan diferentes órganos, y por tanto, predecir el resultado de la coinfección es una tarea compleja, pero necesaria (38). Dentro de este contexto, evaluar el efecto de la coinfección por *H. pylori* en individuos infectados latentemente por *M. tuberculosis* de países endémicos para tuberculosis, constituye un campo de gran interés para entender las interacciones patógeno-hospedero y sus potenciales efectos para el control de la tuberculosis.

2.1 El género *Mycobacterium*

Por la implicación clínica y social, *M. tuberculosis* y *M. leprae* han sido las especies más estudiadas y conocidas de este género. Los primeros estudios se remontan a 1882, época en que Robert Koch descubrió *M. tuberculosis*, tiempo después, fueron identificadas otras micobacterias no comprendidas dentro del complejo tuberculoso ni *M. leprae*, constituyendo el grupo de las "Micobacterias atípicas". El hallazgo de estas últimas estuvo vinculado por años a colonización transitoria o contaminación de la muestra clínica, pero a partir de la primera mitad del siglo XX se les ha asignado un rol en determinadas enfermedades. El género *Mycobacterium* comprende un grupo muy diverso, en el que actualmente se conocen más de 90 especies distintas de las cuales 25 han sido identificadas como agentes infecciosos para el hombre (39, 40). Dependiendo de la especie, pueden ser parásitos obligados, patógenos primarios, oportunistas o saprófitas. La utilización de métodos de biología molecular en su caracterización y tipificación, ha permitido la descripción de nuevas especies. Una proporción considerable de estas se han descrito como bacterias asociadas a casos y condiciones patológicas concretas (39).

La identificación de *Mycobacterium* spp por técnicas de laboratorio convencionales (fenotípicas) es lenta. Clásicamente, el diagnóstico se ha basado en el examen directo y el cultivo (41). La sensibilidad del examen directo varía entre 30 y 80 %, y depende tanto del aislamiento en cultivo como de los métodos de recuperación utilizados y de la población evaluada (42). Por otra parte, debido al prolongado tiempo de reproducción de las micobacterias, las técnicas de aislamiento basadas en el cultivo en medio sólido requieren de 3 a 12 semanas y su sensibilidad es muy

baja en muestras biológicas que contienen un pequeño número de microorganismos (43). Sin embargo, el cultivo es el método de referencia más recomendado, pese a ser ambiguo y poco reproducible (41). Por esta misma razón, en los últimos diez años se han desarrollado diversos métodos para su detección genética directa en las muestras clínicas, la mayoría de ellos basados en la amplificación mediante la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) (39), ideales para casos clínicos en donde la carga bacilar es pequeña (44).

2.2 *Mycobacterium tuberculosis*: de la infección a la enfermedad

La tuberculosis es una enfermedad causada por el bacilo *M. tuberculosis* que ha afectado los humanos desde la antigüedad y ha evolucionado con los homínidos durante varios millones de años. Las cepas de *M. tuberculosis* aparentemente surgieron al mismo tiempo que los seres humanos se extendieron por África, hace unos 50.000 años. Una larga coevolución ha permitido a este microorganismo desarrollar mecanismos para coexistir dentro de su hospedero durante décadas (45). En la actualidad, se estima que un cuarto de la población mundial está infectada latentemente con *M. tuberculosis* (46, 47), aproximadamente 1.7 billones de personas, con una sustancial variación geográfica y etaria. De los cuales 56 millones de personas están en alto riesgo de progresar a TB activa, mientras los restantes permanecerán asintomáticos (19, 46).

La ruta usual de infección es a través de aerosoles que contienen micobacterias, estos aerosoles se liberan en el medio ambiente a través de la tos de individuos con tuberculosis cavitaria. Los bacilos son inhalados por individuos susceptibles a través del tracto respiratorio, alcanzando el espacio alveolar del pulmón. La entrada del bacilo causa una reacción inflamatoria aguda e inespecífica. Los bacilos son fagocitados por macrófagos alveolares en un intento de eliminar el patógeno (48, 49). Sin embargo, este microorganismo con un crecimiento extremadamente lento (tiempo de generación de 15-20 horas), ha desarrollado estrategias para eludir la respuesta antimicrobiana innata que opera dentro de los macrófagos, dando lugar a una colonización a largo plazo dentro de las células hospederas. Una vez dentro, *M. tuberculosis* puede sufrir varios destinos: 1) la bacteria puede ser destruida, 2) pueden sobrevivir y proliferar, lo que resulta en enfermedad (tuberculosis), o 3) los bacilos detienen su crecimiento, pero residen en el hospedero en un estado de latencia (**Figura 1**), como consecuencia de este último, muchas personas albergan la infección a lo largo de su vida (aproximadamente el 90 % de los individuos expuestos) sin síntomas clínicos, creciendo lentamente o aún latentes, los bacilos tienen el potencial de reactivarse. Se estima que un 5 % de los infectados progresarán a enfermedad activa dentro de los 2 primeros años (19, 50). El riesgo de desarrollar enfermedad clínica incrementa en aquellos pacientes con compromiso inmune hereditario o adquirido (infección por VIH), desnutrición, diabetes o bajo algunas intervenciones médicas (por ejemplo trasplante de órganos y diálisis) (45), no obstante, en muchos individuos la reactivación se da en ausencia de un inmunocompromiso conocido (20). Sí la tuberculosis activa resulta de la

reactivación o de infecciones secundarias de *ново* permanece sin aclarar (51, 52). Aproximadamente, el 50 % de las personas con enfermedad activa van a sobrevivir sin tratamiento (53), aunque cada uno podría infectar a otros 10 a 20 contactos durante el periodo de la enfermedad activa (19).

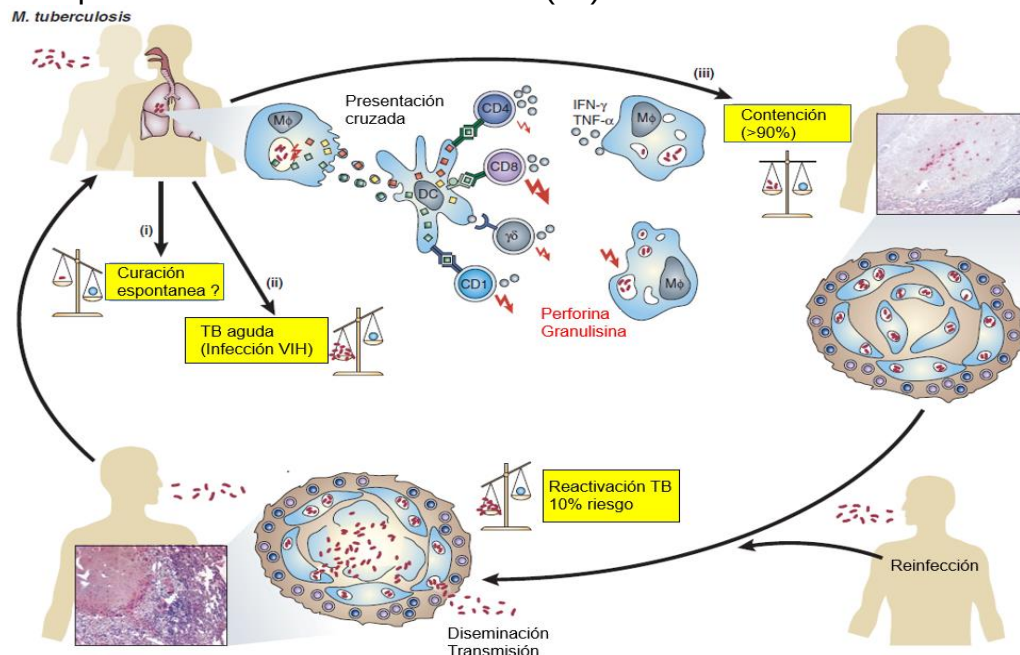


Figura 1. Infección por *M. tuberculosis* y mecanismos inmunitarios subyacentes. Tomado y modificado de Kaufmann SH, McMichael AJ. Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. Nat Med 2005; 11: S33-44. (54)

M. tuberculosis elude los mecanismos antimicrobianos de los macrófagos e interfiere en diferentes niveles con la generación de una respuesta inmune adquirida eficaz, en gran parte a través de la modulación e interferencia de los mecanismos de activación inmune mediados por citocinas (55). Sin embargo, aparte de la carga micobacteriana, la activación inmune resultante que tiene como objetivo controlar la infección, puede contribuir a la lesión resultando en el desarrollo de la enfermedad activa en el sitio de la infección a nivel pulmonar, y también dentro de otros órganos seguido de la diseminación micobacteriana (56, 57). De esta forma, la respuesta inmune del hospedero crea el microambiente propicio en personas infectadas que permite la persistencia a largo plazo de las micobacterias. Este delicado equilibrio requiere la interacción del microorganismo junto con la inmunidad innata y adaptativa (45).

2.3 Diagnóstico de la infección tuberculosa latente

La estrategia global contra la tuberculosis de la Organización Mundial de la Salud (OMS) después del 2015 reconoce que para su erradicación requiere enfocarse en reducir el grupo de personas con infección latente, que representan el 23 % de la población mundial, y constituyen un importante reservorio de la infección a partir de

la cual se generarán nuevos casos de tuberculosis (46). La lucha contra la infección tuberculosa latente (LTBI) requiere la identificación y el tratamiento profiláctico de individuos asintomáticos para reducir el riesgo de progresión a la enfermedad activa. Actualmente no existe ningún diagnóstico directo de LTBI, dado que *M. tuberculosis* no se puede recuperar del hospedero a menos que esté presente la infección activa. En su lugar, se realiza una evaluación indirecta de la respuesta inmune determinando la reactividad de los linfocitos T del hospedero frente a antígenos de *M. tuberculosis*, ya sea evaluando la respuesta *in vivo* por la prueba cutánea de la tuberculina (PPD) o *in vitro* mediante ensayos de liberación de IFN- γ (IGRA) (58).

La tuberculina consiste en una inyección intradérmica de un derivado proteico purificado a partir de *M. tuberculosis*. Aunque se han utilizado una variedad de métodos, la técnica de Mantoux que se administra en la superficie interna del antebrazo, es una de las más utilizadas a nivel mundial. El material de la tuberculina puede ser el derivado proteico purificado (PPD) S o RT-23. Las dosis estándar son 5 unidades PPD-S (0.1 mL) o 2 unidades PPD-RT-23 (0.1 mL), que son equivalentes. Ambos tipos de tuberculinas contienen una mezcla compleja de antígenos, incluidos los de las cepas de *M. bovis* derivado de Bacillus Calmette-Guérin (BCG) y varios antígenos de micobacterias no tuberculosas (NTM), así como antígenos de *M. tuberculosis*. La tuberculina estimula una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado mediada por linfocitos T. Una reacción positiva a la tuberculina puede detectarse por una induración en el sitio de la inyección después de 48–72 h. El resultado es el diámetro transversal de la induración que se registra en milímetros. La interpretación del resultado debe tener en cuenta tanto la inmunosupresión como la prevalencia de TB de la población (58). De acuerdo con lo anterior: 5 mm se considera positivo si el paciente se encuentra inmunodeprimido, pero se considerará negativo en pacientes sanos que viven en áreas de alta prevalencia en quienes se recomienda emplear un corte ≥ 15 mm. No obstante, un corte ≥ 10 mm es recomendado por los centros para el control y prevención de enfermedades (CDC) (59).

Estas diferencias para clasificar la positividad frente a la prueba de la tuberculina dificultan la comparación de las propiedades de la tuberculina entre estudios en diferentes países y poblaciones. La principal limitación de la prueba cutánea de la tuberculina es su baja especificidad debido a la reacción cruzada con la vacunación BCG y las infecciones por micobacterias no tuberculosas. También hay otros inconvenientes con esta prueba aparentemente simple. En sujetos con enfermedades crónicas debilitantes o inmunosupresión, la prueba de la tuberculina puede tener una sensibilidad menor que en personas sanas. Debe ser administrada, y leída por profesionales capacitados para evitar la variabilidad de los resultados. También requiere dos visitas clínicas, y una reacción positiva puede afectar la confidencialidad del participante dada la evidencia de una induración en su antebrazo (58).

Los IGRAs, utilizan una muestra de sangre del paciente para medir *in vitro* la liberación de IFN- γ por las células T después de la estimulación con antígenos específicos de *M. tuberculosis*. Se han desarrollado dos IGRA: el Quanti-FERON-TB Gold In-Tube (QFT) y el T-SPOT.TB. Ambas pruebas emplean como antígenos el blanco antigénico de secreción temprana 6 (ESAT-6) y la proteína filtrada a partir del cultivo 10 (CFP-10). Estas proteínas están codificadas por genes ubicados en la región diferencial 1 (RD-1) del genoma de *M. tuberculosis*. El QFT adicionalmente, incluye un tercer antígeno, TB7.7 (RD-11). El QFT es un ensayo inmunoenzimático (ELISA) que mide los niveles de IFN- γ en el sobrenadante de una suspensión celular. El resultado se procesa fácilmente mediante software, y se informa en UI/mL. El T-SPOT.TB es un ensayo enzimático (ELISPOT) realizado en linfocitos T separados, y el resultado se informa como el número de células T productoras de IFN- γ . La principal ventaja de los IGRAs es su especificidad, dado que ESAT-6, CFP-10 y TB7.7 se encuentran en el genoma de *M. tuberculosis*, pero no en *M. bovis*-BCG, o en la mayoría de las micobacterias ambientales. Además, los IGRA pueden diferenciar un resultado negativo de la anergia mediante el uso de un control positivo, que utiliza fitohemaglutinina para estimular la producción de IFN- γ (58).

Ni el PPD ni los IGRA pueden detectar la infección por *M. tuberculosis* en sus etapas iniciales. Debido a que ambos miden la respuesta inmune adaptativa frente al bacilo, por lo que, se requiere un período de aproximadamente 8 semanas después de la infección para obtener un resultado confiable. En cualquier caso, un resultado positivo para cualquiera de las dos pruebas debe orientarse en el contexto de la presencia o ausencia de síntomas clínicos y los hallazgos radiológicos de tórax. Finalmente, tres desventajas notables son compartidas por ambas pruebas: a) un pobre valor predictivo positivo (VPP) para la progresión a TB. Varios estudios han tratado de correlacionar el riesgo de progresión con la respuesta cuantitativa de las pruebas *in vivo* (medición del diámetro de la prueba de la tuberculina) e *in vitro* (concentración de IFN- γ en tubos QFT), pero no se han encontrado resultados concluyentes, b) no pueden distinguir entre LTBI y enfermedad activa, y c) no discriminan entre una infección reciente y una pasada (58).

2.4 Estado actual de la TB en el mundo

M. tuberculosis se caracteriza por una alta tasa de infectividad, y largos periodos de persistencia (45). A pesar de los esfuerzos en los últimos años para su erradicación, la TB continúa siendo un importante problema de salud pública, y una de las 10 principales causas de muerte, causando más muertes que el VIH/SIDA en el 2017; mueren más personas de tuberculosis que de cualquier otra enfermedad infecciosa curable (60). En cifras, se estima que diariamente cerca de 20.000 personas desarrollan tuberculosis activa y 5.000 mueren de ella. En el 2017, se estimó que 10.4 millones de personas desarrollaron tuberculosis lo que equivale a 142 casos por 100.000 habitantes, y 1.3 millones murieron a causa de la enfermedad, adicionalmente, se registraron 300.000 muertes por TB en personas con infección

por el VIH. La gran mayoría de casos de tuberculosis y muertes se registraron en hombres (61).

Después de 25 años de la declaración de la TB como una situación de emergencia para la salud pública a nivel mundial por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS), este gran número de casos y muertes por TB es inaceptablemente alto. Dado que la mayoría de las muertes por tuberculosis son prevenibles si las personas acceden a servicios de salud para su diagnóstico y se proporciona el tratamiento antibiótico adecuado. Regímenes de corta duración con fármacos de primera línea que pueden curar alrededor del 90 % de los casos han estado disponibles desde hace décadas. Si bien, se han logrado importantes avances a nivel global, como una reducción en la tasa de mortalidad por tuberculosis de un 16 % para el 2017 en comparación con el 23 % registrado para el 2000, y la tasa de incidencia de TB ha caído alrededor de 2 % anual. Esta reducción en la carga de la tuberculosis no ha sido lo suficientemente rápida para lograr alcanzar los objetivos previstos en la estrategia fin de la TB para el 2020, que requiere que la proporción de personas que mueren por TB disminuya al 10 %, y la incidencia de TB se reduzca un 5 % anual (60). Los países en desarrollo contribuyen con una proporción significativa de casos de TB, y el espectro de la enfermedad se ha complicado con la emergencia de cepas resistentes a los antibióticos (57), la coinfección por VIH (50), acentuado por la pobreza, la falta de acceso a servicios de salud de calidad, el debilitamiento de los programas de control y estructuras sanitarias poco coordinadas en zonas endémicas.

Dos tercios de los casos en el 2017, tuvieron lugar en 8 países: India (27 %), China (9 %), Indonesia (8 %), Filipinas (6 %), Pakistán (5 %), Nigeria (4 %), Bangladesh (4 %) y Sudáfrica (3 %). Estos juntos con otros 22 países representan el 87 % de los casos de TB a nivel global. Por lo tanto, la mayoría de los casos de TB se concentran en 3 regiones: WHO Sur Este Asiático (44 %) y WHO África (25 %) y WHO Mediterráneo oriental (7.7 %). Solo 6 % de los casos de TB se presentaron en la región WHO Europa (3 %) y WHO Américas (3 %) (**Figura 2**). En el caso particular de las Américas, la mayoría de los países de la región tienen tasas de incidencia por debajo de 50 casos por cada 100.000 habitantes por año, y junto con Europa son las regiones con menor carga de tuberculosis en promedio (60).

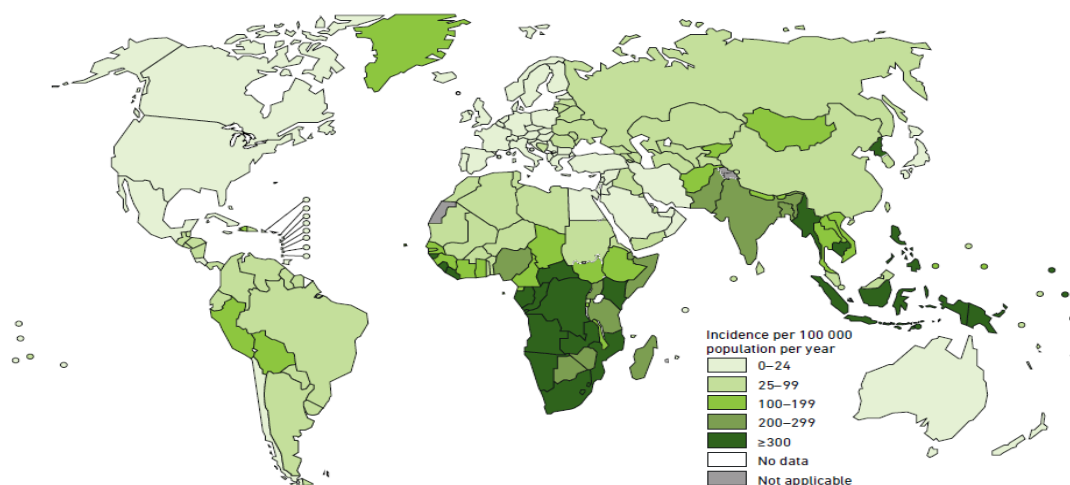


Figura 2. Tasas de incidencia de TB estimadas, 2017. Tomado de WHO. Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. (60)

No obstante, en las Américas, la tuberculosis persiste como un importante problema de salud pública. Cada año se notifican en promedio cerca de 282.000 casos nuevos y fallecen alrededor de 18.000 personas (60), la inequidad social, la debilidad en las acciones de control y la ineficiencia en los servicios de salud, conllevan a que existan zonas dentro de la región donde la problemática es similar a la que presentan regiones de alta carga de TB. Las cifras más elevadas de enfermos y fallecidos se registran en Brasil, Perú, México, Haití y Colombia, representando el 68 % de los casos de TB en la región (62) con el consecuente daño personal, familiar y económico para estas naciones.

Por tal motivo, cuatro años después de terminada la estrategia alto a la TB, continúa siendo necesario reducir las tasas de incidencia, prevalencia y mortalidad por TB en el mundo, si se pretende alcanzar la nueva meta propuesta por la OMS. La estrategia denominada “Fin a la TB” que propone una reducción del 35 % en el número de muertes y 20 % de reducción en la tasa de incidencia para el 2020. Solo de alcanzarse en el tiempo esta meta, e intensificando los esfuerzos, es probable pensar en el fin de la epidemia por TB para el 2035, entendiéndose esto como una reducción del 95 % en el número de muertes por TB y del 90 % en la incidencia de la misma (<10 casos por 100.000 habitantes) comparado con los registros 2015 (60).

2.5 Estado de la TB en Colombia

Colombia es el tercer país más poblado de América Latina. Un país con una población de 49 millones de habitantes que ha pasado de ser principalmente una población rural a principios del siglo 20 a convertirse en una población mayoritariamente urbana en el siglo 21. El aumento de la población urbana, junto con el hacinamiento y la pobreza en las grandes ciudades, mantiene condiciones

favorables para la transmisión de la tuberculosis. La incidencia estimada de TB es de 33 casos por cada 100.000 personas, lo que corresponde a aproximadamente 16.000 nuevos casos por año (60), lo que plantea una importante tarea para el control de la enfermedad. Analizando el período 1970 al 2008, se observa una clara tendencia en la disminución de la incidencia de TB desde 1970 (58.6 casos por 100.000 habitantes), hasta 1997 (21.5 casos por 100.000 habitantes), disminución que correspondió entre otras causas, a la progresiva reducción en la búsqueda de pacientes sintomáticos respiratorios, pero este comportamiento descendente varió a partir del año de 1998, cuando se comenzó a evidenciar una tendencia incremental sostenida con incidencias que oscilan entre 22 a 26.5 casos por 100.000 habitantes para el periodo 1998-2017. Para el 2018 con corte en la semana epidemiológica número 36, se habían notificado al Sivigila 9706 casos de tuberculosis de todas las formas lo que corresponde a una incidencia de 17.7 casos por 100.000 habitantes (63, 64). Al interior del país, las tasas de incidencia de la tuberculosis difieren notablemente entre departamentos, a continuación se reportan las tasas de incidencia más altas por entidad territorial para el año 2017: 59 Amazonas, 50.4 Risaralda, 47.7 Meta, 45.5 Casanare, 41.6 Barranquilla, 41.2 Chocó, 40.3 Guaviare, 39.2 Valle del Cauca 35.1 Antioquia, y los departamentos con la menor incidencia de tuberculosis son Sucre con 9.9. y Boyacá con 8.5. La incidencia acumulada global fue 26.5 casos por 100.000 habitantes (65).

Santiago de Cali, es la capital del departamento del Valle del Cauca y una de las principales ciudades del suroccidente Colombiano, posee una alta carga de TB con una incidencia de 41 casos por 100.000 habitantes superior al promedio nacional (66) y un riesgo anual de infección tuberculosa (ARTI) de 1.3 % (67) superior al riesgo de 0.1 % reportado para la población mundial (68). Cada año en la ciudad mueren por esta afección aproximadamente entre 90 a 100 personas, y se diagnostican entre 15 a 20 casos de TB fármaco-resistente. El porcentaje de abandono del tratamiento antituberculoso es del 15 %, y los casos de coinfección TB/VIH oscilan entre el 11-13 %, condiciones que representan un complejo panorama para el control de tuberculosis en la ciudad (69).

La incidencia global de la TB en Colombia oculta las diferencias entre sus regiones, reflejando que las medidas de control y la naturaleza de la transmisión no son uniformes (70).

2.6 Inmunología de la tuberculosis

La inmunidad protectora contra la tuberculosis está mediada predominantemente por la respuesta inmune celular (19). Sin embargo, la resistencia del hospedero contra la infección micobacteriana comienza con la inmunidad innata que implica la interacción de las micobacterias con macrófagos y células dendríticas residentes en los alvéolos (71). Un gran repertorio de receptores para el reconocimiento de patrones (PRRs) en estas células está involucrado en el reconocimiento y la fagocitosis de los bacilos, incluidos los receptores tipo *toll* (TLR), receptores del

complemento, receptores depuradores, y receptores lectinas de tipo C (receptores de manosa, receptor de lectina del tipo C asociado a macrófagos (Mincle), receptor de células dendríticas DC-SIGN (CD209), Dectina-1 y -2, y receptores de proteínas surfactantes) (57, 72, 73). Los macrófagos y las células dendríticas infectadas con *M. tuberculosis* inducen reacciones inflamatorias y promueven la afluencia de monocitos y otros macrófagos que pueden infectarse. Estas células migran a los ganglios linfáticos regionales, iniciando una respuesta inmune y propagando la infección. Con el establecimiento de la inmunidad adaptativa, la replicación bacteriana disminuye drásticamente. Viables y aparentemente de forma extracelular, los bacilos pueden persistir dentro de los granulomas formados como consecuencia del reclutamiento celular y la activación inmune (45). Estas bacterias aún viables pueden promover la producción de TNF- α e IFN- γ por las células T cooperadoras (20, 74). Aunque el IFN- γ es esencial para controlar la infección, otros factores parecen ser necesarios para mantener el equilibrio entre la inmunidad y la susceptibilidad (75). Las células T de memoria que expresan IL-2 también parecen ser importantes en la resolución de la infección y fibrosis (76).

Los estudios de biomarcadores han demostrado que la progresión temprana a TB se asocia con la expresión alterada de citocinas reguladoras tipo Th2, como la IL-4 e IL-10 (77). También se ha demostrado que los pacientes con TB tienen una disminución en los niveles de citocinas del tipo Th1 con un aumento en los niveles de IL-10 en comparación con los individuos con infección tuberculosa latente (LTBI) y población no infectada. Curiosamente, los sujetos con infección latente mostraron un aumento selectivo en los niveles de ARNm de IL-4 δ 2 (antagonista de IL-4), en comparación con los pacientes con tuberculosis o individuos no infectados (75). La citocina proinflamatoria TNF- α también juega un papel importante en la respuesta del hospedero contra la TB, incluyendo la formación del granuloma y la contención de la enfermedad (78, 79). De hecho, el tratamiento con anticuerpos neutralizantes de TNF- α se asocia con la reactivación de *M. tuberculosis* entre individuos con infección latente, como se ha observado en tratamientos de enfermedades autoinmunes (80). Lo anterior sugiere que el control a largo plazo de la infección por *M. tuberculosis* puede estar mediado por una fuerte respuesta Th1 y una inhibición de la respuesta Th2. El equilibrio en la respuesta inmune efectora y supresora parece ser clave para el control a largo plazo de la infección por *M. tuberculosis*. Algunos estudios han demostrado que las condiciones crónicas subyacentes (coinfección VIH, desnutrición, deficiencia de vitamina D, diabetes y terapia con el anti-TNF- α) pueden alterar el sistema inmunológico y aumentar el riesgo de progresión a tuberculosis activa (81-85). Esto muestra el espectro dinámico de la infección tuberculosa (71, 86).

La única vacuna disponible, y actualmente aprobada contra la tuberculosis (organismos vivos atenuados de *M. bovis* derivado de Bacillus Calmette-Guérin (BCG)), estimula un amplio espectro de la respuesta inmune celular y ha logrado proteger a los recién nacidos contra la enfermedad tuberculosa (50). Sin embargo, la BCG ha demostrado una gran variabilidad en la eficacia y puede no proteger

contra la enfermedad pulmonar en adultos (87), en particular en las regiones periecuatoriales de países en desarrollo (50). Este fenómeno se atribuye con frecuencia a la exposición previa a micobacterias ambientales, aunque su distribución no representa completamente la variabilidad en la respuesta a la BCG (19). Se ha sugerido que la presencia de patógenos coinfectantes (por ejemplo, helmintos) y el deterioro de la respuesta inmune para reconocer antígenos de *M. tuberculosis* probablemente desempeñan un papel importante en la eficacia protectora de la BCG (50, 88).

2.7 La relación antigua entre *H. pylori* y los humanos

El género *Helicobacter* habita el tracto gastrointestinal de muchos mamíferos y aves, los cuales a menudo poseen sus propias y únicas especies de *Helicobacter*. Estas especies son hospedero-específicas, implicando coevolución de la bacteria con sus hospederos. Por comparación de secuencias nucleotídicas de diferentes cepas y medición de sus tasas de mutación, es posible calcular el tiempo mínimo que *H. pylori* y su hospedero han compartido un ancestro común. La diversidad genética entre las cepas de *H. pylori* disminuye con la distancia desde el Este de África, así como la diversidad genética disminuye entre humanos. Estos hallazgos sugieren que *H. pylori* ha coevolucionado con los humanos, al menos desde su último éxodo juntos desde África 50.000 años atrás y probablemente a lo largo de su evolución (28).

2.8 Características microbiológicas de *H. pylori*

H. pylori es un bacilo Gram negativo, en forma de S o de bastón curvo que habita crónicamente en la mucosa gástrica, su tamaño es de 2 a 10 μm de longitud y 0.3 a 1 μm de ancho, y posee entre cinco y seis flagelos polares (89). En los cultivos se caracteriza por crecer en agar sangre de cordero a 37°C y necesita de bajas tensiones de oxígeno (microaerófilico), las colonias son pequeñas, circulares, con apariencia convexa y translúcida con forma de gotas de rocío. Su identificación preliminar se soporta en su capacidad de producir enzimas como catalasa, ureasa, y oxidasa.

2.9 Diagnóstico de la infección por *H. pylori*

La infección por *H. pylori* se puede diagnosticar por una variedad de pruebas invasivas y no invasivas (90). Los métodos convencionales para el diagnóstico de *H. pylori* incluyen: el análisis histopatológico, el cultivo, el examen microscópico, y la prueba rápida de la ureasa (90, 91). Todos estos métodos involucran la toma de biopsia gástrica mediante una endoscopia de tracto gastrointestinal superior. Este procedimiento está sujeto a errores de muestreo, y condicionado por la distribución irregular de *H. pylori* en el estómago, lo que conlleva a la posibilidad de falsos negativos. Adicionalmente, la histopatología, y el cultivo de *H. pylori* requiere experiencia y destreza para obtener resultados confiables (91).

Los métodos no invasivos como la detección de anticuerpos IgG para *H. pylori* en sangre, la prueba en aliento de la urea (UBT), y la detección de antígenos en heces constituyen una buena opción en el diagnóstico de la infección por *H. pylori*, por su rapidez, menor costo en comparación con la endoscopia, y mayor aceptación por los pacientes (90, 91). Sin embargo, también presentan desventajas. Los resultados positivos por serología en sangre no necesariamente reflejan una infección activa. La prueba en aliento requiere un equipo especializado de alto costo e involucra exposición a radioactividad (91, 92), y la detección de antígenos fecales presenta una menor especificidad comparada con la prueba de aliento, atribuida a una reactividad cruzada entre especies de *Helicobacter* presentes en tracto gastrointestinal, que también son eliminadas por heces (93). Basado en las limitaciones de los métodos anteriormente mencionados, y la necesidad de nuevos métodos diagnósticos, el interés ha crecido hacia el uso de técnicas moleculares para el diagnóstico de *H. pylori* (91).

Métodos moleculares como la PCR tienen el potencial para determinar con precisión la presencia de la infección y caracterizar el genotipo de la bacteria con una buena sensibilidad (~80 %) y especificidad (100 %) (94). Estas técnicas han sido usadas exitosamente para detectar ADN de *H. pylori* en tejidos gástricos por amplificación de regiones genómicas específicas que codifican para adhesinas, ureasa y ARNr 16S. Este último gen, es un blanco altamente específico para la amplificación y ha sido usado previamente para ayudar en la clasificación taxonómica del organismo. La amplificación de ADN de *H. pylori* puede ser considerado evidencia directa de su presencia (91).

La elección de una prueba específica depende de varios factores, incluyendo molestias gástricas, edad, disponibilidad local, costos, y la información clínica buscada. Los pacientes con hemorragia gastrointestinal, pérdida de peso inexplicable, o anemia, así como los pacientes de edad avanzada (> 50 años) con dispepsia recientemente desarrollada deben someterse a un examen endoscópico. Si las muestras de biopsia se pueden obtener fácilmente, la prueba rápida de la ureasa es una prueba de elección. Sin embargo, en los pacientes con hemorragia activa o reciente, o en pacientes que estén tomando antibióticos o compuestos antisecretores, la histología es la prueba más recomendable. Adicionalmente, es el único método que permite detectar lesiones malignas en la mucosa gástrica (95). Aunque el cultivo de *H. pylori* acompañado por pruebas de sensibilidad antibiótica es el único método diagnóstico que proporciona valores de resistencia a antibióticos para todos los agentes usados en la terapia anti-*H. pylori*, esta técnica no se realiza rutinariamente en el diagnóstico inicial de la infección por *H. pylori* (90).

En la ausencia de síntomas de alarma, el examen endoscópico no suele estar indicado, y el diagnóstico de *H. pylori* se debe limitar a métodos no invasivos, de los cuales los más ampliamente usados son la prueba en aliento y la serología. La prueba de aliento se puede utilizar para el diagnóstico inicial de *H. pylori*, así como

para el seguimiento del tratamiento. La serología, sin embargo, es más limitada, no es adecuado usarla para confirmar el éxito de la terapia ya que una disminución en el título de anticuerpos anti-*H. pylori* en suero puede solo ser fiable si se observan varios meses después del tratamiento. En los niños menores de 6 años, las muestras de aliento no se pueden obtener fácilmente, y la serología no siempre es fiable, por lo que las pruebas de detección de antígeno en heces para *H. pylori* podría proporcionar una alternativa (90). En cualquier caso clínico es conveniente utilizar una combinación de resultados de al menos dos técnicas para definir la positividad de la infección (con la excepción del cultivo como única prueba positiva)(96) .

2.10 Epidemiología de *H. pylori*

H. pylori está presente en el epitelio gástrico de aproximadamente el 50 % de la población mundial (97-99) y es por tanto, una de las infecciones bacterianas más comunes en humanos después de la caries dental (100). La infección se asocia con bajo estrato socioeconómico, tener padres (especialmente madres) portadoras de *H. pylori*, hermanos mayores *H. pylori*-positivos, condiciones de hacinamiento, consumo de alimentos contaminados y pobre higiene personal (27, 100, 101), y es adquirida en la infancia usualmente después del primer año de vida. La transmisión puede ser fecal-oral, oral-oral o vomito-oral (27). Una vez adquirida en ausencia de tratamiento antibacteriano persiste por décadas, y a menudo a lo largo de la vida del hospedero, sin manifestaciones clínicas evidentes (27, 100). Alrededor del 20 % de las personas infectadas están en riesgo de desarrollar úlceras pépticas, y 1 % desarrollará adenocarcinoma gástrico o linfoma de tejido linfoides asociado a mucosa (MALT) (97, 102).

La prevalencia de la infección por *H. pylori* varía ampliamente por región geográfica, edad, raza y etnia (100). Así, aunque muchas personas en todas las zonas geográficas portan la bacteria, la prevalencia de *H. pylori* es mayor en países en desarrollo que en países desarrollados (101). La prevalencia en Asia y África varía de 70-90 %, mientras en el Norte de América y Europa la prevalencia es típicamente 30-70 % (Figura 3). La prevalencia aumenta con la edad. En países en desarrollo 30-50 % de los niños menores de 5 años de edad están infectados por *H. pylori* (100). En contraste, en muchos países desarrollados desde principios del siglo XX hubo una disminución progresiva en la prevalencia de *H. pylori*, este efecto cohorte se aceleró después de la Segunda Guerra Mundial y su efecto ha sido tan profundo que menos del 10 % de los niños menores de 10 años en los Estados Unidos y en otros países desarrollados están infectados, comparado con los niveles históricos de 70-90 %. Este cambio es producto del mejoramiento en las condiciones de vida (saneamiento y nutrición) y otro fenómeno que pudo contribuir fue el amplio uso de antibióticos para otras infecciones a los cuales *H. pylori* es sensible (27).



Figura 3. Prevalencia mundial de *H. pylori*. Tomado de Azevedo NF, Guimaraes N, Figueiredo C, Keevil CW, Vieira MJ. A new model for the transmission of *Helicobacter pylori*: role of environmental reservoirs as gene pools to increase strain diversity. Crit Rev Microbiol. 2007; 33(3):157-69.(103)

2.11 Prevalencia de la infección por *H. pylori* en Colombia

En casi todos los estudios es evidente que en los grupos socioeconómicos bajos y en los países en desarrollo, la prevalencia global de la infección por *H. pylori* aumenta hasta cerca del 80 %. En el caso de Colombia, un estudio de seroprevalencia realizado por Bravo *et al.* (104) reportó una prevalencia de 96.3 %, especialmente desde temprana edad (96 %, en el grupo de 18-24 años). Es común que la seroprevalencia aumente a medida que se avanza en edad, lo cual indica un alto índice y riesgo de adquirir la infección por *H. pylori* en edad temprana en todas las regiones geográficas del país y parece no estar influida por la variedad étnica. Otro estudio comparativo realizado en 16 ciudades colombianas reportó una prevalencia global de 69.1 % a partir de biopsias gástricas, sin encontrar diferencias significativas según el género y la edad. La mayor prevalencia de la infección por *H. pylori* se encontró en Manizales (85.5 %) y Tunja (99.1 %). Una prevalencia relativamente alta se encontró para Cali (63.1 %). Otras ciudades como Pasto con alta tasa de cáncer gástrico presentaron una baja prevalencia (41.7 %) evidenciando un subdiagnóstico de la infección en esta región (105), confirmado por estudios recientes que han encontrado una alta prevalencia de la infección en esta área geográfica (>90 %) (106). En la Costa Atlántica la prevalencia de la infección fue de 65.4 %, significativamente más baja cuando se comparó con la región andina 69.5 % ($p=0.022$) (105). Estas investigaciones permiten evidenciar la alta prevalencia de la infección por *H. pylori* dentro del país.

2.12 Colonización y persistencia de *H. pylori*

H. pylori es una bacteria que coloniza exitosamente el estómago humano, y persiste a lo largo de la vida del hospedero, lo que implica un alto grado de adaptación (28) y una habilidad extraordinaria para evadir la constante y vigorosa respuesta inmune innata y adaptativa a la cual es enfrentado (102). Su forma espiral y flagelos permiten a esta bacteria atravesar el moco gástrico y numerosas adhesinas permiten la adherencia selectiva al epitelio. *H. pylori* tiene mecanismos para su protección contra la acidez gástrica. El 15 % de su contenido proteico comprende una ureasa citoplasmática preformada. Cuando el pH externo es menor a 6.5, un canal específico se abre en la membrana citoplasmática, permitiendo el ingreso de la urea. El amonio producido por la hidrólisis de la urea neutraliza el periplasma permitiendo el mantenimiento del potencial de membrana citoplasmático (28).

Como muchas bacterias comensales humanas, *H. pylori* ha evolucionado desarrollando mecanismos específicos para evitar la estimulación de la respuesta inflamatoria e inmune (28, 97). Por ejemplo, en la inmunidad innata el reconocimiento por varios TLR es atenuado por *H. pylori*. No obstante, la colonización es asociada con infiltración de células inflamatorias dentro de la mucosa gástrica (denominada gastritis). Diferentes cepas de *H. pylori* inducen variedad de grados de gastritis, reflejando sus habilidades individuales para interactuar con el hospedero mediante sus factores de virulencia (28). La mayoría de las investigaciones en el campo de *H. pylori* se han enfocado en el estudio de estos factores, particularmente en el contexto de su asociación con severas secuelas gastrointestinales producto de la infección (101). De ahí que es bien comprendido como estos factores resultan en enfermedad, aunque el beneficio para *H. pylori* de poseer estos factores permanece menos claro. Una posibilidad es que los cambios epiteliales que *H. pylori* causa (directamente y quizás también a través de inflamación) permite el incremento de la liberación de nutrientes a la bacteria. Alternativamente, estos factores de virulencia pueden inducir modificaciones del nicho que resultan en mejores condiciones para la supervivencia de *H. pylori* o empeoramiento de las condiciones para la supervivencia de bacterias competidoras (28).

Aunque el enfoque experimental en la asociación de *H. pylori* con enfermedad es comprensible, es importante señalar que el nicho ecológico para *H. pylori* es progresivamente perdido con el desarrollo de la gastritis atrófica, y la bacteria rara vez se obtiene a partir del cultivo de pacientes seropositivos con adenocarcinoma. Por lo tanto, desde el punto de vista microbiano, la progresión de una gastritis asintomática a seria destrucción de tejidos, interfiere con la proliferación bacteriana (102).

2.13 Infección crónica por *H. pylori*

La inflamación local gástrica es el sello de la infección crónica por *H. pylori* y se piensa subyace a la enfermedad. Esta comprende un amplio rango de células inflamatorias, pero es predominantemente linfocítico. Sin embargo, poco común en las infecciones crónicas, suele haber un persistente componente neutrofílico, y esto se cree contribuye a la patogénesis debido a la liberación de mediadores inflamatorios tales como especies reactivas del oxígeno (ROS). La severidad de la inflamación gástrica está influenciada por los efectos locales proinflamatorios de *H. pylori*, y por la respuesta inmune local y sistémica. La relativa contribución de estos es materia de controversia. Aunque el nivel de inflamación incrementa el riesgo de enfermedad, no parece influenciar el tipo de enfermedad a desarrollar. Esto se piensa está determinado por el patrón topográfico de inflamación dentro del estómago: la inflamación predominantemente antral es asociada con un incremento en la producción de ácido y predispone a úlcera duodenal mientras que la inflamación predominantemente a nivel del cuerpo gástrico o pan-gastritis está asociada con hipoclorhidria y predispone a úlcera gástrica y adenocarcinoma gástrico. La distribución intragástrica de la gastritis se piensa depende de factores genéticos del hospedero, posiblemente algunos factores de virulencia bacterianos y factores ambientales incluyendo la edad de la infección (107).

2.14 Cáncer gástrico y su relación con el *H. pylori*

Dos variantes distintas histológicamente de adenocarcinoma gástrico han sido descritas, cada uno tiene características epidemiológicas y pato-fisiológicas diferentes. El adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal usualmente ocurre en edades tardías, predomina en hombres y progresa a través de una serie relativamente bien definida de pasos histológicos. El adenocarcinoma gástrico de tipo difuso más comúnmente afecta personas jóvenes, afectando hombres y mujeres por igual y consta de una infiltración individual de células neoplásicas que no forman estructuras glandulares y no está asociado con metaplasia intestinal. Aunque *H. pylori* incrementa significativamente el riesgo de desarrollar ambos subtipos de adenocarcinoma gástrico, los mecanismos que sustentan el desarrollo de cáncer gástrico de tipo intestinal están mejor caracterizados (101).

La cadena de eventos que ocurre durante el desarrollo del cáncer gástrico de tipo intestinal involucra una transición desde una mucosa gástrica normal a una gastritis superficial crónica, la cual luego lleva a gastritis atrófica y metaplasia intestinal, y finalmente a displasia y adenocarcinoma gástrico (**Figura 4**). El riesgo de desarrollar cáncer gástrico se incrementa exponencialmente como la gastritis atrófica se extiende, y la metaplasia intestinal incrementa. Pacientes con gastritis atrófica multifocal severa tienen 90 veces más riesgo de desarrollar adenocarcinoma gástrico que aquellos con mucosa normal (101).

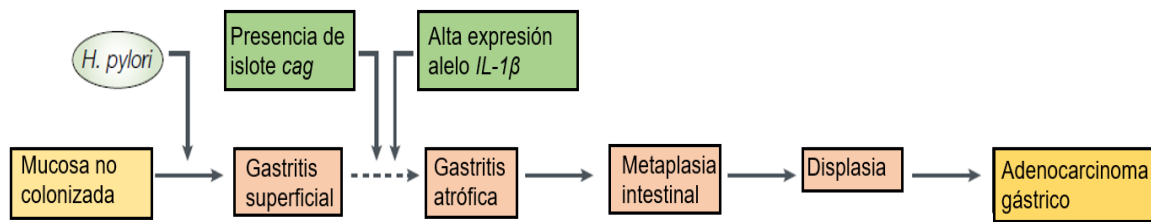


Figura 4. Progresión del adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal. Tomado y adaptado de Peek RM, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. Nat Rev Cancer. 2002; 2(1):28-37.(101)

La habilidad de *H. pylori* para colonizar el epitelio gástrico e inducir gastritis superficial, de cierta forma indica que este microorganismo o la respuesta inflamatoria del hospedero frente a la infección, podría ser importante en el inicio y promoción de la neoplasia gástrica. El descenso progresivo en la adquisición de *H. pylori* durante el último siglo en las personas que viven en países desarrollados ha conllevado una disminución en la incidencia de cáncer gástrico. Varios estudios de casos y controles han mostrado que la seropositividad está asociada con un incremento significativo en el riesgo de cáncer gástrico (2.1 a 16.7 veces mayor que en personas seronegativas) (101).

Resultados de múltiples estudios, reportan que el tratamiento anti-*H. pylori* modifica la progresión de la carcinogénesis gástrica. Un ensayo de quimioprevención controlado y aleatorizado mostró que la terapia antibiótica dirigida contra *H. pylori* incrementó la tasa de regresión de la atrofia gástrica y metaplasia intestinal, comparado con los pacientes que recibieron placebo (108). En pacientes japoneses con cáncer gástrico temprano, la terapia para eliminar el *H. pylori* resultó en una disminución significativa de la tasa de recurrencia de cáncer gástrico y redujo la progresión de la gastritis atrófica. En otro estudio prospectivo a largo plazo, la erradicación de *H. pylori* retrasó, el desarrollo de adenocarcinoma gástrico durante un periodo de seguimiento con una media de 4.8 años (101).

H. pylori induce cáncer gástrico en modelos con roedores. Después del desafío experimental con *H. pylori*, los jerbillos mongoles consistentemente desarrollaron pangastritis, y en el curso de 1-2 años progresaron a: atrofia gástrica, metaplasia intestinal y adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal en cerca de 1/3 de los animales. El patrón de desarrollo de cáncer gástrico en estos animales es paralelo al de los humanos, siendo este un buen modelo para el estudio de la carcinogénesis gástrica. Estos hallazgos demuestran que la malignidad puede ser inducida por la sola colonización de *H. pylori*, sin la administración exógena de co-carcinógenos. Por consiguiente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado a *H. pylori* como un agente carcinógeno tipo I (101).

2.15 Variación genómica en *H. pylori* y riesgo de enfermedad

Las poblaciones de *H. pylori* son extremadamente diversas, debido a mutaciones puntuales, reordenamientos genéticos, sustituciones, inserciones, y/o deleciones en sus genomas. Un único hospedero puede portar varias cepas de *H. pylori*, y los aislados dentro de un individuo pueden cambiar en el tiempo por mutaciones endógenas, rearrreglos cromosómicos o recombinación entre las bacterias. Esta variación genómica permite a *H. pylori* escapar de la respuesta inmune del hospedero eliminando o modificando moléculas potencialmente inmunoestimuladoras (97). Aunque esta extraordinaria diversidad ha dificultado la búsqueda de factores bacterianos asociados con malignidad, varios loci genéticos han sido identificados, incluyendo el islote de patogenicidad *cag*, el gen *vacA* y *babA2*. Estos marcadores parecen ser interdependientes, y no son absolutos, pero reflejan el grado de enfermedad (101).

2.16 Factores de virulencia en *H. pylori* asociados con inflamación

Varios factores de virulencia bien reconocidos están comúnmente presentes en cepas de *H. pylori* asociadas con enfermedad. La mayoría, pero no todos ellos, incrementan el riesgo de enfermedad principalmente causando un incremento en la liberación de citocinas proinflamatorias por parte de las células epiteliales, incrementando así la infiltración local de células inflamatorias en la mucosa gástrica. Esta inflamación local puede propiciar el inicio de una compleja respuesta inflamatoria e inmune frente a la infección. En la infección crónica, la expresión de citocinas proinflamatorias continúa, y esta se piensa es un determinante importante de úlcera péptica y malignidad gástrica. Aunque todas las infecciones por *H. pylori* están asociadas con algún grado de inflamación gástrica, aquellas asociadas con enfermedad se asocian con los niveles más altos de inflamación (107).

2.16.1 El islote de patogenicidad *cag* (*cag* PAI)

Probablemente el más importante y distintivo factor de virulencia de *H. pylori* (101, 107), un locus adquirido por transferencia horizontal de aproximadamente 40 Kb (101, 109). El *cag* PAI puede estar presente, ausente, o alterado y así no funcional. Comúnmente está presente y funcional (28). Las cepas que poseen el *cag* PAI con mayor probabilidad están asociadas con gastritis severa, gastritis atrófica, úlcera péptica y adenocarcinoma gástrico distal que las cepas que carecen de él (99, 101, 107). El *cag* PAI es un grupo de cerca de 30 genes, muchos de los cuales codifican un sistema de secreción tipo IV (T4SS) que conecta el citoplasma de la bacteria y la célula epitelial del hospedero (28, 102, 107), el cual exporta proteínas bacterianas. Está perfectamente diseñada para el estómago humano: antigénicamente variable, cubierto por la proteína CagY estructuralmente ácido estable que le confiere estabilidad y permite la evasión de la respuesta inmune del hospedero (**Figura 5**) (28). El gen terminal en el islote, *cagA*, es comúnmente usado como un marcador del locus *cag* completo (101, 109). Seguido de la adhesión de

H. pylori a las células epiteliales, el sistema de secreción tipo IV transloca una proteína codificada en el *cag* PAI, CagA, junto con péptidoglicano y probablemente otras proteínas bacterianas desconocidas dentro del citosol de la célula epitelial (109). Los efectos y el papel de CagA son importantes en la patogénesis, pero es la presencia del sistema de secreción tipo IV (T4SS) el principal estímulo en la expresión de citocinas proinflamatorias por parte de las células epiteliales e inflamación gástrica (107).

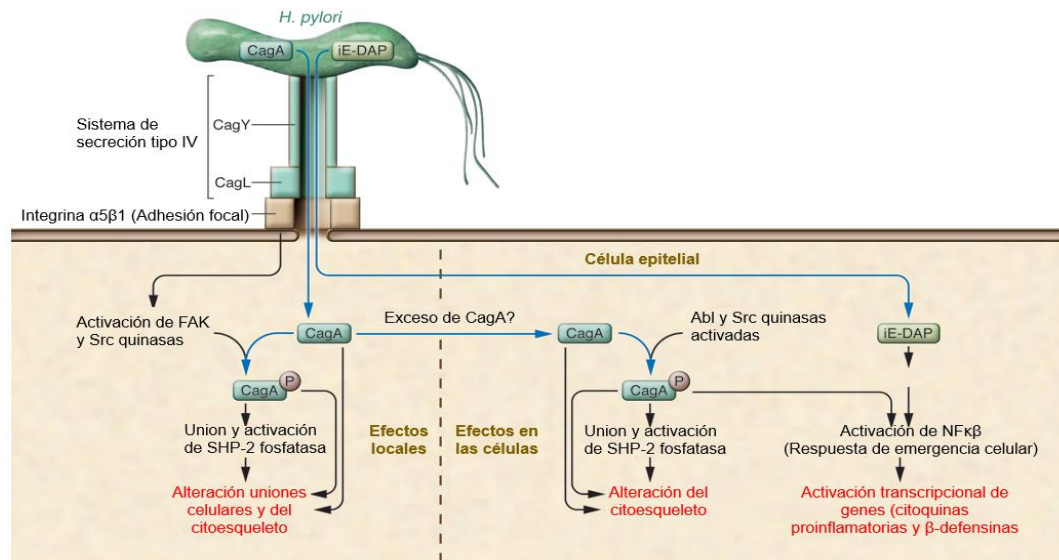


Figura 5. Efectos del T4SS codificado por el islote de patogenicidad *cagA* y su principal proteína efectora, CagA. Tomado y adaptado de Atherton JC, Blaser MJ. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. J Clin Invest. 2009;119(9):2475-87. (28)

Estudios *in vitro* han mostrado que varios genes dentro del islote *cag* (*cagE* (*picB*), *cagG*, *cagH*, *cagI*, *cagL*, *cagM*) son requeridos para liberar grandes cantidades de citocinas proinflamatorias, tales como la IL-8, desde las células epiteliales gástricas. Esta citocina participa en el reclutamiento de neutrófilos, resultando en inflamación (102). La inactivación de estos genes también resulta en una disminución de la activación del NF- κ B, y la cascada de transducción de señales de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), que regulan la producción de citocinas proinflamatorias. Estas observaciones *in vitro* reflejan eventos *in vivo*, como las cepas *cagA*-positivas están asociadas con una alta expresión en la mucosa de IL-8 e inflamación en tejido gástrico. Además, la pérdida de *cagE* o el locus *cag* completo atenúa profundamente la severidad de la gastritis y desarrollo de atrofia en jerbillos mongoles infectados con *H. pylori* (101). Se reconoce ahora que el paso inicial en este proceso es el reconocimiento por el receptor para el reconocimiento de patrones Nod1. Nod1 es un sistema de detección innato epitelial para bacterias Gram negativas, y está involucrado específicamente en la detección de infecciones intracelulares. Este censa la presencia de un muro-péptido único del péptidoglicano

de las bacterias Gram negativas y es expresado por muchos tipos celulares incluyendo células epiteliales. Experimentos *in vitro* han demostrado que la detección por Nod1 de *H. pylori* es dependiente de la translocación de componentes de péptidoglicano soluble (iE-DAP) hacia la célula epitelial por el T4SS (110). Cómo se logra esto permanece desconocido, pero la interacción con Nod1 lleva a la activación del NF- κ B y la expresión de genes que codifican citocinas proinflamatorias, incluyendo IL-8 (107).

Un estudio previo que investigó el vínculo entre el *cag* PAI y la inducción de la respuesta proinflamatoria, mostró que los aislados clínicos de *H. pylori* tenían más probabilidad de colonizar ratones si ellos no albergaban el *cag* PAI y fueron por lo tanto incapaces de inducir tal respuesta en células cultivadas. Variantes adaptadas para ratones que carecían del *cag* PAI infectaron ratones en gran densidad y tuvieron una reducida capacidad para inducir una respuesta inflamatoria *in vitro* comparado con las respectivas cepas parentales (111). Estos hallazgos implican que puede haber una profunda selección *in vivo* contra cepas de *H. pylori* y variantes que induzcan una fuerte respuesta inflamatoria en el hospedero, al menos en los modelos murinos (102).

Hasta el momento, la ventaja relativa *in vivo* de las cepas de *H. pylori* que poseen el *cag* PAI versus los genotipos que carecen del *cag* PAI, en hospederos humanos no son claras. Un estudio de un individuo infectado con múltiples cepas mostró recombinación entre las cepas resultando en la escisión del *cag* PAI y la subsecuente selección positiva de las cepas *cagA*-negativas. Por lo tanto, no es claro como el *cag* PAI beneficia la bacteria durante la infección persistente, este puede que sea importante para un estadio específico de la colonización, pero no es indispensable en otros estadios (102).

2.16.2 Citotoxina asociada al gen A (*cagA*)

Este gen codifica para una proteína altamente inmunogénica de 120 a 145 kDa denominada CagA, que es traslocada por el T4SS dentro del citosol de la célula epitelial (109, 112), lo que resulta en profundos cambios celulares, presumiblemente beneficiando a la bacteria (101, 107). Dentro del citosol, la proteína se localiza dentro de la superficie de la membrana plasmática y es reconocida por la célula como una molécula de señalización, y es activada por fosforilación, la cual es mediada por quinasas de la familia Src y Ab1 (107, 112) en residuos de tirosina específicos dentro de los motivos de repetición Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) (**Figura 5**) (99). Ésta luego interactúa con la SHP-2, una de las moléculas blanco mejor estudiadas, e induce señalización de la MAP quinasa resultando en una proliferación anormal y movimiento de las células epiteliales gástricas (107). Mutaciones en la SHP-2 han sido encontradas en varios tumores malignos humanos, y la alteración en la señalización de SHP-2 se ha asociado con el desarrollo de adenocarcinoma gástrico en ratones genéticamente modificados, indicando que SHP-2 juega un papel importante en el cáncer gástrico (109). La

proteína CagA fosforilada puede también unirse a las proteínas Crk llevando a la ruptura de las uniones de las células epiteliales y daño tisular, mientras que la CagA no fosforilada puede interactuar con otros receptores celulares tales como Grb2 y ZO-1 para inducir otros cambios morfológicos celulares y proliferación (107). De ahí, que la sola presencia del CagA no es suficiente para predecir los resultados de la enfermedad en la infección por *H. pylori*. Los individuos infectados con un CagA fosforilado presentan una enfermedad más grave que los pacientes infectados con un CagA no fosforilado, pero cuál de estas formas de CagA fue la progenitora en la evolución de *H.pylori* está sin aclarar (97). La alteración de la barrera epitelial por CagA puede llevar a la pérdida de nutrientes en la capa mucosa, y facilitar la entrada del VacA bacteriano en la submucosa (102).

La proteína CagA también puede inhibir la proliferación de células B al suprimir la vía de señalización JAK-STAT, y adicionalmente, suprimir la apoptosis de células B, lo que puede contribuir a la formación de linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT) (113).

2.16.2.1 Diversidad de los motivos EPIYA en la proteína CagA

La proteína CagA de *H. pylori* presenta varios tipos de alelos, lo cual es debido a un número variable de regiones repetidas conteniendo los motivos EPIYA presentes en el extremo carboxilo de la proteína (114, 115). El número de repeticiones EPIYA presentes en la proteína CagA está asociado con diferentes efectos sobre la vías señalización celular y riesgo de enfermedad (116). Estos polimorfismos alrededor de la región EPIYA típicamente involucran cambios en la secuencia de los aminoácidos que flanquean el motivo. Los principales motivos designados son EPIYA-A, -B, -C y -D y se encuentran en dos combinaciones distintas según la localización geográfica, CagA tipo occidental que consiste en la combinación de un motivo EPIYA-A, -B y -C (uno a 5 motivos EPIYA-C han sido identificados) este último motivo es característico de la proteínas CagA de cepas aisladas en países europeos, Sur y Centro de Asia, África, las Américas y Australia (109, 112), mientras la CagA tipo Este-Asiático contiene una combinación de motivos EPIYA-A, -B y -D y es prácticamente solo observada en poblaciones del Este de Asia (109) (**Figura 6**). El motivo EPIYA-C y -D sirve como sitio de fosforilación primaria del CagA y son requeridos para la unión a la SHP-2, una proteína clave que participa en la transducción de señales intracelulares procedentes de receptores para factores de crecimiento y citocinas regulando así las actividades celulares incluyendo la proliferación, la morfogénesis y la motilidad celular (117)

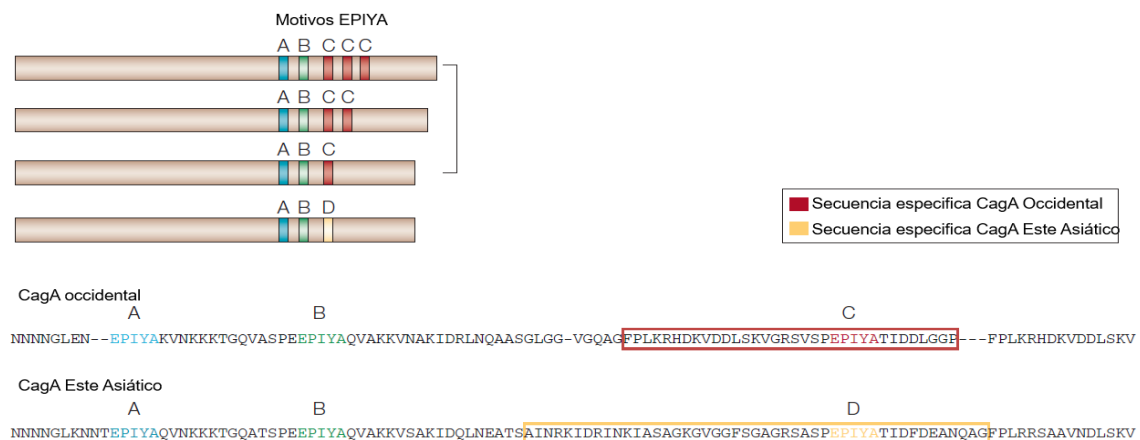


Figura 6. Diversidad en los sitios de fosforilación de la tirosina de CagA. Tomada y adaptada de Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. Nat Rev Cancer. 2004;4(9):688-94.(117)

Entre los aislados occidentales, varios estudios epidemiológicos moleculares han indicado una correlación entre la severidad de la enfermedad y un incremento en el número de motivos EPIYA-C. De hecho, en casos donde las cepas occidentales están asociadas con cáncer gástrico, primordialmente tienen múltiples motivos EPIYA-C (118). Esto concuerda con las observaciones de Yamaoka *et al* (119) quien encontró una asociación significativa entre los motivos EPIYA-C triplicados y la gastritis atrófica y metaplasia intestinal en aislados de *H. pylori* de pacientes colombianos. Un estudio realizado en pacientes colombianos con enfermedad gastroduodenal encontró un riesgo para cáncer gástrico significativamente mayor para individuos infectados con cepas de *H. pylori* con tres repeticiones EPIYA-C (120). Este incremento en el número de repeticiones EPIYA-C puede llevar a una alta secreción de IL-8 (121) y una pronunciada transformación morfológica conocida como “fenotipo colibrí” (112), resultado del incremento en los niveles de fosforilación del CagA y la unión al SHP-2 (122) confiriendo un mayor riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico (120). Por otra parte, las cepas de *H. pylori* CagA tipo Este-Asiático conteniendo los motivos EPIYA-D han mostrado mayor afinidad por la SHP-2 en comparación con el motivo EPIYA-C en las cepas CagA tipo Occidental (107, 109, 123). Esto permite grandes cambios morfológicos en las células infectadas (109) como también un incremento en los niveles de inflamación y atrofia (123), explicando en parte la alta tasa de enfermedades gástricas asociadas a *H. pylori* en Japón y partes de China (116). Estudios *in vivo* en Tailandia (124) y Japón (125) han confirmado que la proteína CagA tipo Este-Asiático es más virulenta que la CagA tipo Western en relación a los resultados clínicos.

2.16.3 Citotoxina vacuolizante asociada al gen A (*vacA*)

Un gen que también está asociado con carcinogénesis inducida por *H. pylori* es *vacA* (101). A diferencia del gen *cagA*, prácticamente todas las cepas de *H. pylori* poseen el gen *vacA*, pero solo el 50-65 % producen una proteína VacA (109, 126).

Aproximadamente el 40 % de ellas hacen la forma de alta actividad. VacA es una exotoxina de 88-kDa que comprende dos subunidades, p33 y p55, es específicamente adaptada al estómago, siendo activada por el ácido y luego convirtiéndose en resistente a la degradación por la acidez y la pepsina (28). Esta puede inducir múltiples efectos celulares, incluyendo formación de poros en la membrana de la célula epitelial, explicando muchos de sus efectos, incluyendo vacuolización, inducción de la liberación de citocromo c mitocondrial llevando apoptosis que puede contribuir a la ruptura de la barrera epitelial (**Figura 7**) (102), y por otra parte, unión a receptores de membrana como el RPTP β y RPTP α (28, 109). Estudios en ratones transgénicos mostraron que estos receptores son requeridos para la úlcera gástrica inducida por VacA (28).

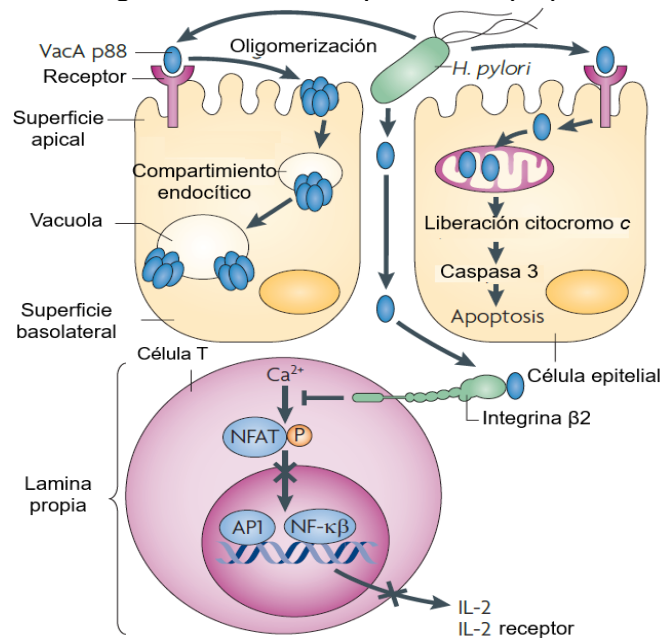


Figura 7. Estructura del VacA de *H. pylori* y efectos funcionales. Tomado y adaptado de Polk DB, Peek RM, Jr. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. Nat Rev Cancer. 2010;10(6):403-14. (127)

Recientemente, efectos específicos de VacA han sido demostrados en células T *in vitro*. VacA actúa como un inmuno-modulador interfiriendo con la vía de señalización de IL-2. Específicamente VacA se une a la $\beta 2$ integrina en células T, bloqueando el flujo de calcio, y la actividad de la fosfatasa calcineurina dependiente de Ca²⁺/calmodulina (128). Por lo tanto, inhibe la activación del factor de transcripción NFAT el cual normalmente se transloca al núcleo y activa la transcripción de varios genes que están involucrados en la respuesta inmune, entre estos los genes que codifican IL-2 y su receptor IL-2R α , que juegan un papel clave en la proliferación de las células T (102) (**Figura 7**). VacA también interfiere con la presentación de antígenos mediada por el CMH de clase II (**Figura 8**). Después de insertarse en la membrana plasmática e internalizarse por endocitosis, llega al compartimento endosomal tardío. Este compartimento es convertido en una gran vacuola ácida por la actividad de VacA como canal selectivo de aniones (129), lo que compromete el

procesamiento de proteínas en epítomos en células presentadoras de antígenos (130).

La especificidad de estos efectos implica importancia fisiológica, pero hasta ahora ninguno ha sido demostrado *in vivo* (28). Por otra parte, evidencias epidemiológicas y experimentales han demostrado una asociación entre la producción VacA y la ocurrencia de daño tisular *in vivo* (109), en lugar de liberación de citocinas proinflamatorias. Demostrando que no todos los factores de virulencia de *H. pylori* incrementan el riesgo de enfermedad por aumento de los niveles de inflamación inducidos por *H. pylori* (107).

Hay una variación considerable en la actividad vacuolizante entre las cepas, principalmente debido a diferencias en la estructura del gen *vacA*. Regiones de mayor diversidad de secuencia están localizadas en la región 5' que codifica el péptido señal y el extremo amino de la proteína madura (*s1* y *s2*) y la región media que codifica parte de la subunidad de unión a la célula epitelial p55 (*m1* y *m2*) (28, 109). El gen *vacA* puede comprender cualquier combinación de los tipos de región señal y media, aunque la combinación *s2m1* es muy rara. Entre los genotipos *s1*, *s1m1* es tóxico para un amplio rango de células epiteliales que *s1m2*. Aunque ambas cepas VacA *s1m1* y *s1m2* pueden estar asociadas a enfermedad, los pacientes con cáncer gástrico usualmente tienen el tipo *s1m1*. De forma interesante, el genotipo *vacA s1*, pero no el *s2* está correlacionado con la presencia del gen *cagA* (109). Sin embargo, *vacA* y *cagA* son loci separados en el cromosoma de *H. pylori*, y una inactivación por mutación en el *cagA* no afecta la producción de VacA (101). Las cepas *vacA s2m2* son prácticamente no tóxicas y están raramente asociadas con enfermedad (109).

Todas las cepas de *H. pylori* del Este Asiático son *vacA s1*. Dentro de los países del Este de Asia, el tipo *m1* es predominante en Japón y Corea, mientras la prevalencia del tipo *m2* gradualmente incrementa en las partes del Sur de Asia del Este (Vietnam y Hong Kong). La incidencia de cáncer gástrico es mucho mayor en Japón y Corea comparado con Vietnam y Hong Kong, apoyando la hipótesis que el tipo *s1m1* es más virulento que el tipo *s1m2*. Como se describió anteriormente, la mayoría de las cepas del Este de Asia son *cagA*-positivas, y poseen el CagA tipo East-Asian. Por lo tanto, es difícil explicar las diferencias en la incidencia de cáncer gástrico entre las poblaciones del Norte y Sur del Este de Asia por los genotipos *cagA*, pero es posible por los genotipos *vacA m*. La prevalencia del tipo *vacA s1m2* es también predominante en el Sur de Asia, donde la incidencia de cáncer gástrico es baja, indicando que la región *s* no está directamente involucrada en la prevalencia de cáncer gástrico (109). El tipo *vacA s1* se puede subdividir en *s1a*, *s1b* y *s1c* y el tipo *m1* en *m1a*, *m1b*, y *m1c*, aunque las relaciones entre los subtipos y resultados clínicos están sin aclarar. El tipo *vacA s1c* y *m1b* son frecuentes en aislados de *H. pylori* del Este de Asia, el tipo *s1a* y *m1c* son comunes en el Sur de Asia, el tipo *m1a* es típico en Europa y África. Los subtipos *s1a* y *s1b* son comunes en cepas

occidentales, y especialmente el subtipo *s1b* es común en cepas de la Península Ibérica e Hispanoamérica (109).

Recientemente, un tercer determinante polimórfico de actividad de vacuolización fue localizado entre la región señal y la región media, denominado región intermedia *i* que codifica parte de la subunidad p33 (28, 109). Dos tipos de región *i* fueron identificados, *i1* y *i2*. Entre las cepas occidentales estudiadas, solo las cepas *s1m2* variaron en el tipo *i*. Aproximadamente la mitad de las cepas *s1m2* occidentales fueron genotipo *i2*, las cepas *s1m1* y *s2m2* fueron exclusivamente *i1* y *i2*, respectivamente. En general las cepas tipo *i1* fueron fuertemente asociadas con adenocarcinoma gástrico en pacientes iraníes (131). En contraste, cuando la región *i* de 314 aislados de pacientes con dispepsia no ulcerosa, úlcera gástrica, úlcera duodenal o cáncer gástrico de países del Este de Asia y Sur de Asia fueron examinados, solo 8 % (4/52) de las cepas *s1m2* fueron identificadas como *i2*. Dado que la mayoría de las cepas asiáticas fueron *i1* y la prevalencia de cáncer gástrico es alta en el Este de Asia, pero baja en el Sudeste asiático, no hay asociación entre el genotipo región *i* y la evolución clínica (109).

Cómo las formas activas de VacA (por ejemplo: *s1/i1/m1* y *s1/i1/m2*) predisponen a enfermedad aún permanece sin aclarar. En modelos murinos, VacA ayuda a la colonización, y el VacA purificado causa úlcera péptica. En modelos *in vivo* infectados con *H. pylori*, las cepas toxigénicas incrementan el riesgo de úlcera y cáncer, pero VacA no es un prerrequisito. Estos efectos parecen independientes de la inflamación en roedores. En humanos, los tipos activos de VacA han sido fuertemente asociados con atrofia gástrica precancerosa e hipoclorhidria, aun cuando se ha controlado el estado *cag*. Además, en pacientes con hipoclorhidria, las cepas de *H. pylori* toxigénicas han demostrado que han sido adquiridas en la infancia, implicando que ellas preceden y así pueden causar atrofia. *In vitro*, VacA inhibe la función de las células parietales, y la pérdida de células parietales es el sello de la gastritis atrófica. Sí VacA inhibe la producción de ácido directamente *in vivo* y, sí puede llevar a la pérdida de células epiteliales, permanece desconocido (28).

Una posible explicación para la distribución de los genotipos *vacA* en diferentes poblaciones y áreas geográficas, es que a través del tiempo cepas con un único genotipo hayan dado origen a diversos genotipos, como resultado de adaptaciones a un hospedero con características y medio ambiente particulares (28).

2.17 El papel de la respuesta inmune frente a la infección por *H. pylori*

La respuesta inmune a un microorganismo específico es multifactorial y está determinada por la genética del hospedero, factores ambientales (incluyendo otros microorganismos) y el blanco de acción del propio microorganismo (28). *H. pylori* es un estimulador activo de la respuesta inmune innata y adaptativa. El reconocimiento local innato de *H. pylori* por las células epiteliales, se cree es un determinante

importante de enfermedad. Hay también una fuerte respuesta inmune celular y humoral, local y sistémica. Sin embargo, la respuesta inmune humoral no está involucrada en protección (132). *H. pylori* ha coevolucionado con los humanos durante al menos miles de años, y la condición humana "normal" en tiempos premodernos probablemente fue la infección crónica por *H. pylori* (107). Así, *H. pylori* parece haberse adaptado al menos parcialmente para: 1) evadir la respuesta inmune (97), y quizás incluso manipularla por subregulación (107), 2) evitar una fuerte respuesta proinflamatoria, 3) generar una amplia diversidad genética intraespecie e interespecie, y 4) un estilo de vida parcialmente intracelular (102). Estas características y estrategias únicas presumiblemente ayudan a la supervivencia y contribuyen a su extraordinaria persistencia a lo largo de la vida del hospedero (**Figura 8**). Sin embargo, a pesar de esto, el componente inflamatorio de la respuesta frente a *H. pylori* es importante en la enfermedad (107), se ha propuesto que altos niveles de inflamación puede llevar a la pérdida de la estructura y función de las glándulas gástricas, y que *H. pylori* desaparece de los estómagos que han desarrollado gastritis atrófica (102), además, otros aspectos de la respuesta inmune local y sistémica son fundamentales para la patogénesis (28, 107), por lo tanto, representa un enorme desafío médico.

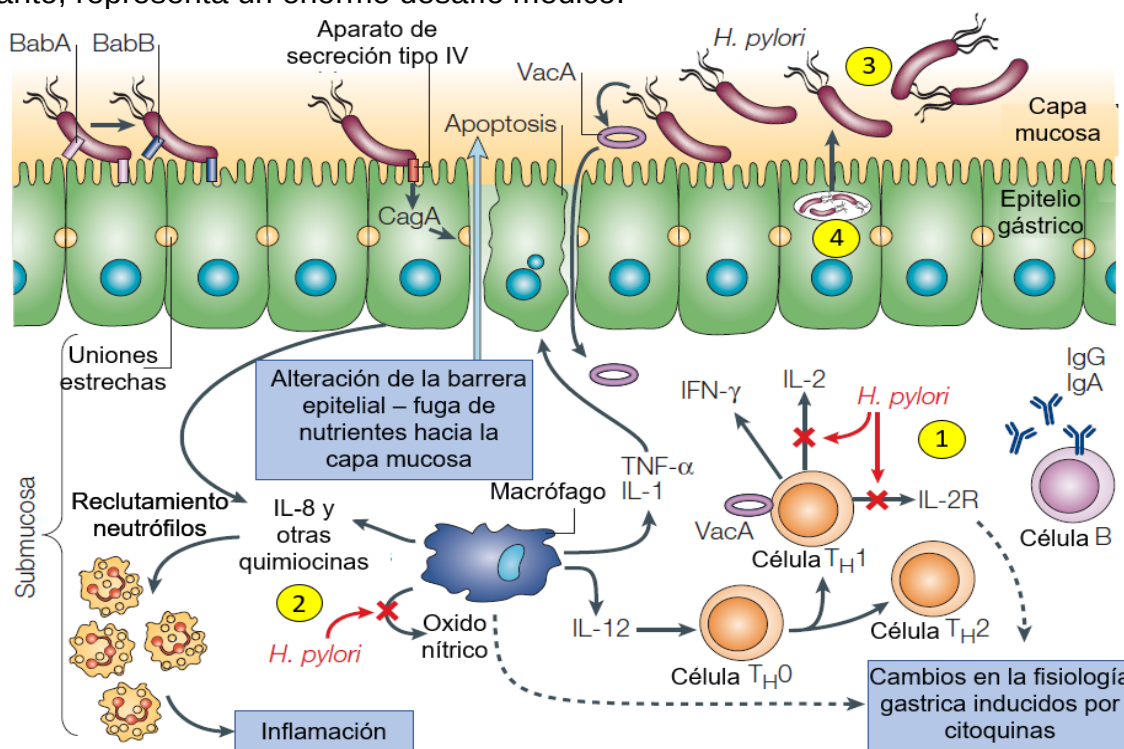


Figura 8. Persistencia de la infección por *H. pylori*. Tomado y adaptado de Monack DM, Mueller A, Falkow S. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. Nat Rev Microbiol. 2004;2(9):747-65. (102)

2.17.1 Respuesta inmune innata a *H. pylori*

La colonización por *H. pylori* en la mucosa gástrica desencadena mecanismos innatos de defensa del hospedero, incluido Nod1, estimulando así la expresión de factores proinflamatorios y antibacterianos por parte de las células epiteliales gástricas (133). Esta primera línea de defensa produce gastritis y *H. pylori* también estimula respuesta inmune innata de las células infiltrantes, que pueden influir posteriormente en la densidad de colonización bacteriana, el nivel de inflamación y también la generación de la respuesta inmune adaptativa (134). La respuesta innata es, por lo tanto, un determinante central de la gravedad de la enfermedad y un mediador importante en la carcinogénesis gástrica (107).

Los mecanismos innatos frente a la infección por *H. pylori* dependen en gran medida del reconocimiento de patrones moleculares asociados patógenos (PAMP) por parte de los receptores para reconocimiento de patrones presentes en las células epiteliales. Nod1, es un receptor intracelular clave que reconoce un componente del peptidoglicano principalmente en cepas de *H. pylori* *cagA*-positivas. Otro importante receptor de reconocimiento innato de *H. pylori* son los receptores tipo *toll* (TLR2, TLR4, TLR5 y TLR9) (135). El lipopolisacárido bacteriano (LPS), generalmente es reconocido por TLR4 y esto desencadena una respuesta proinflamatoria robusta. Sin embargo, se ha observado que las células epiteliales del estómago, y las líneas de células epiteliales gástricas no reaccionan al LPS de *H. pylori* (136). Las diferencias en los perfiles de expresión de TLRs en líneas celulares de epitelio gástrico han complicado aún más la investigación en esta área, y los patrones de expresión de TLRs en el epitelio gástrico humano *in vivo* suelen variar según el estado de la enfermedad (137). Adicionalmente, se ha informado que el reconocimiento de *H. pylori* por TLR5 es diferente del observado con otros patógenos Gram-negativos, la flagelina de *H. pylori* no estimula la señalización a través de TLR5 (138).

Las citocinas y quimiocinas secretadas por las células del epitelio gástrico tras el reconocimiento de la bacteria y otros componentes bacterianos estimulan la migración de granulocitos, monocitos y linfocitos hacia la mucosa inflamada. Altas densidades de células infiltrantes se han asociado con una mayor severidad de la inflamación (139). Diferentes aislados clínicos de *H. pylori* *cagA*-positivo varían en su capacidad para inducir la expresión de citocinas proinflamatorias, por lo que otros factores bacterianos deben estar involucrados. Meyer *et al* (140) demostró que la ureasa fue un potente estimulador de la secreción innata de IL-12, IL-10 e IFN- γ en células mononucleares de sangre periférica (por sus siglas en inglés PBMCs).

La fagocitosis es un importante mecanismo inmunitario innato, pero *H. pylori* puede evadirla parcialmente. Una gran proporción de bacterias fagocitadas parecen sobrevivir dentro de fagosomas que se fusionan para convertirse en megasomas y pueden proporcionar un nicho intracelular que contribuye a la persistencia de la infección (141). La ureasa y posiblemente el *cag* PAI, pero no VacA están

involucrados en la formación de megasomas y supervivencia de *H. pylori* (142). La bacteria también evade la muerte mediada por fagocitos alterando la actividad de la NADPH oxidasa que cataliza la conversión de oxígeno molecular en aniones superóxido, resultado en la liberación extracelular de ROS en lugar de su acumulación dentro de los fagosomas. Sin embargo, se produce una considerable liberación de ROS, pero las bacterias sobreviven al neutralizarlo, a través de su actividad de catalasa (143). *H. pylori* también inhibe la producción de óxido nítrico (NO) en los macrófagos activados a través de su enzima arginasa, la cual está asociada con el desarrollo de la envoltura bacteriana, y compite con NOS2 por el sustrato L-arginina, y lo convierte en urea y L-ornitina en lugar de NO (**Figura 8**) (144).

2.17.2 Respuesta inmune celular a *H. pylori*

La respuesta celular desempeña un papel importante en la eliminación de *H. pylori* como en la patogénesis en modelos animales (145), y es probable que desempeñe un papel en la patogénesis en humanos. En los humanos, la respuesta de las células T a *H. pylori* está dominada por linfocitos T cooperadores tipo Th1 y una profunda activación de macrófagos en la mucosa gástrica (**Figura 8**) (146). Las células Th1 producen IFN- γ , y este tipo de respuesta se asocia con la expresión de citocinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-12 e IL-18. Los macrófagos activados en presencia de citocinas tipo 1, secretan factores proinflamatorios y tienen una actividad bactericida mejorada en comparación con los macrófagos activados en presencia de citocinas Th2. El número de células secretoras de IFN- γ en la mucosa gástrica humana infectada se ha correlacionado con la gravedad de la gastritis (147). El propio IFN- γ parece ser un mediador clave, en ratones, incluso en ausencia de infección por *H. pylori*, induce lesiones preneoplásicas como atrofia, metaplasia y displasia, aunque la infección potencia este efecto. En los seres humanos, las respuestas Th son menos polarizadas que en los ratones, y los pacientes con úlceras pépticas tienen respuestas gástricas Th1 y Th2 más fuertes frente antígenos de *H. pylori* en comparación con los pacientes colonizados sin úlceras (148). A nivel poblacional, la respuesta de la subclase IgG a *H. pylori* sugiere una polarización hacia un perfil Th2 en algunas regiones de África en contraste al predominante perfil Th1 observado en Japón y Reino Unido, lo que posiblemente contribuye a la menor prevalencia de la enfermedad en África (149).

Para persistir, *H. pylori* debe evadir la respuesta inmune, y la persistencia es esencial para la patogénesis. *H. pylori* coloniza de forma superficial a la capa de células epiteliales, y los efectores inmunes pueden no acceder fácilmente y funcionar en el nicho de moco gástrico. El propio *H. pylori* produce factores de virulencia claves como VacA que disminuyen la activación de las células T (150). Sin embargo, el principal mecanismo fisiológico en humanos para controlar las respuestas Th es a través de los linfocitos T reguladores (Tregs) (28). Múltiples investigaciones demuestran que *H. pylori* puede inducir una respuesta de linfocitos Treg para suprimir la respuesta inmune e inflamatoria, y así mantener una

colonización crónica. Células T CD4⁺CD25^{hi} expresando FOXP3 y altos niveles de IL-10 y TGF- β se han encontrado en la mucosa gástrica de individuos infectados por *H. pylori* (150). Además, los Treg suprimen la producción de IL-8 por parte de las células epiteliales y la respuesta de células T de memoria frente a antígenos de *H. pylori* (30). Los ratones deficientes de IL10 desarrollan una gastritis local intensa después de la infección con especies de *Helicobacter* y luego eliminan la infección, mostrando la importancia de esta citocina para controlar la inflamación y promover la persistencia (28). Es importante destacar que los pacientes con úlcera péptica tienen menos Tregs en mucosa gástrica en comparación con los pacientes infectados por *H. pylori* sin úlceras (148). En general existe un amplio acuerdo que los Treg modulan la respuesta humoral y celular. De hecho, se ha demostrado que *H. pylori* inhibe la respuesta inmune a infecciones virales concurrentes (151, 152). También se ha informado una incidencia reducida de afecciones alérgicas en individuos infectados con *H. pylori* (153). Por lo tanto, es posible que los linfocitos Treg inducidos por *H. pylori* jueguen un papel inmuno-regulador sistémico.

2.18 El equilibrio dinámico entre *H. pylori* y su hospedero

H. pylori es capaz de enviar y recibir señales desde el epitelio gástrico, permitiendo al hospedero y la bacteria estar ligados en un equilibrio dinámico. El equilibrio es diferente para cada individuo colonizado, basado en las características bacterianas y del hospedero, lo cual puede explicar porque ciertas cepas de *H. pylori* aumentan el riesgo de carcinogénesis. Por ejemplo, las cepas *cagA*-positivo inducen una intensa respuesta inflamatoria que involucra la producción de IL-8. Esto conduce a una mayor producción de IL-1 β y TNF- α que reduce la producción de ácido por las células parietales, especialmente en hospederos con polimorfismos que promueven altos niveles de expresión de estas citocinas (101).

Esta combinación de cepas y factores del hospedero resulta en una menor acidez gástrica (aumento de pH gástrico) en comparación con las personas infectadas con cepas *cagA*-negativo o con polimorfismos que no permiten alta expresión de IL-1 β y TNF- α . Sin embargo, la transcripción de *cagA* se reduce cuando el pH se incrementa, y el estímulo bacteriano al hospedero disminuye, creando un bucle de retroalimentación negativa que conduce hacia el equilibrio. Como las cepas *cagA*-positivo y *cagA*-negativo pueden coexistir y recombinarse dentro del mismo hospedero, el porcentaje de cepas *cagA*-positivo probablemente varíe con el tiempo, afectando este equilibrio (101).

Los niveles de proliferación celular en mucosa están directamente relacionados a la intensidad de la inflamación, esta es aumentada por las cepas *cagA*-positivo. La habilidad de *H. pylori* en conjunto con los mediadores inflamatorios para inducir o atenuar la apoptosis puede también contribuir a la alteración de la renovación celular. Una respuesta inflamatoria aumentada inducida por cepas *cagA*-positivo en el cuerpo gástrico, conduce a la disminución en la producción de ácido (hipoclorhidria), permitiendo el sobrecrecimiento de bacterias sensibles a pH,

conversión de *N*-nitrosaminas ingeridas a nitratos, y un incremento en el riesgo de cáncer gástrico distal. Así, el riesgo de cáncer gástrico es la suma de la naturaleza polimórfica de la población bacteriana en el hospedero, el genotipo del hospedero y la exposición ambiental (ingesta de nitratos), cada uno afecta el nivel del equilibrio (101).

2.19 Coinfección por *H. pylori* y *M. tuberculosis*

Dada la alta prevalencia de infección por *H. pylori* y *M. tuberculosis*, se han realizado varios estudios para determinar cualquier asociación entre estas infecciones. Sin embargo, los resultados encontrados son contradictorios. Mientras en algunos estudios no se observa asociación, otros sugieren que *H. pylori* podría ser un factor de riesgo o un factor protector para el desarrollo de TB. La **Tabla 1** resume los resultados de un estudio transversal y dos estudios de casos y controles, donde se examinó la relación entre las infecciones por *H. pylori* y *M. tuberculosis*. En general, no se encontró ninguna asociación probablemente debido al tamaño limitado de la muestra. Otros factores limitantes en estos estudios son los siguientes: 1) El enfoque principal está en la tuberculosis activa cuando solo representa una pequeña proporción (20 %) de la infección por *M. tuberculosis*, 2) El uso únicamente de la serología para clasificar la infección por *H. pylori* no permite distinguir entre una infección activa y pasada, y tiene una sensibilidad y especificidad menor en comparación con la histopatología, y 3) la falta de genotipificación de *H. pylori* para determinar la virulencia, lo cual es importante, dado que las cepas *cagA*+/*vacA* *s1m1* inducen una mayor respuesta inmune e inflamatoria en comparación con las cepas *cagA*-/*vacA* *s2m2*. Por lo tanto, una posible asociación entre estas infecciones podría estar enmascarada.

Tabla 1. Estudios *in vivo* que no muestran asociación entre la infección por *H. pylori* y *M. tuberculosis*

Autor, año (referencia)	Ubicación	Tipo de estudio	Población de estudio	Media Edad	Exposición <i>Mtb</i>	Principales hallazgos en relación a <i>H. pylori</i>
Sanaka, 1998 (154)	Japan	Casos y controles	Grupo I: 40 tratamiento TB <3 m Grupo II: 43 Tratamiento TB >3 m Controles: 60 sin TB	52 57 56	Baciloscopia Cultivo Radiografía de tórax	No se observaron diferencias en la seroprevalencia de <i>H. pylori</i> entre los sujetos control (73.3 %), el grupo I (65 %) y el grupo II (69.8 %) ($p > 0.05$). Mientras una diferencia en los niveles IgG específicos para <i>H. pylori</i> se observó entre los sujetos control y el grupo I ($p=0.002$), pero no se encontraron diferencias entre los sujetos control y el grupo II ($p=0.03$).
Tsang, 1998 (155)	Hong Kong	Casos y controles	87 TB 94 Controles	57 54	Baciloscopia Radiografía de tórax	No se observaron diferencias en la seroprevalencia de <i>H. pylori</i> y los niveles de IgG específicos para <i>H. pylori</i> entre los sujetos control y los pacientes con TB (54.3 % vs 52.9 %; $p=0.852$ y 29.1 U/ml vs 24.7 U/ml, $p=0.452$, respectivamente).
Torres, 2003 (35)	Lima, Perú	Corte transversal	78 PPD+ 50 PPD-	35	PPD+ ≥10 mm	La tasa de reactividad a la tuberculina fue del 61 %. No se observó diferencia en la seroprevalencia de <i>H. pylori</i> entre los sujetos tuberculina-negativos y tuberculina-positivos (80 % vs 86 %, respectivamente, $p=0.379$). Después de ajustar la edad, el hacinamiento en el hogar, la presencia de agua corriente a los 5 años, consumo de cigarrillo y el uso de antibióticos, tampoco se encontró asociación entre la seroprevalencia de <i>H. pylori</i> y la reactividad a la tuberculina ($p=0.7$).

En contraste, en la **Tabla 2** se presentan los datos de seis estudios en los que se encontró una asociación entre la infección por *M. tuberculosis* y *H. pylori*. Para los tres primeros estudios, se evidencia una asociación entre *H. pylori* y el desarrollo de TB. Algunos autores han sugerido que el ácido gástrico actúa como una barrera que previene que las micobacterias ingeridas prosperen, dado que el crecimiento de las micobacterias disminuye significativamente por debajo del pH 5 (156). Limitando la posibilidad de regurgitación y aspiración desde el estómago a los pulmones (35). Desde este punto de vista, la inflamación inducida por *H. pylori* que conduce a hipoclorhidria y atrofia podría aumentar el riesgo de infección por *M. tuberculosis*. No obstante, esto es una hipótesis. Otros estudios han observado un aumento en el riesgo de desarrollar tuberculosis debido a una gastrectomía parcial o vagotomía como tratamiento para la úlcera péptica (36, 157), mediada por la alteración en los niveles de ácido clorhídrico. En cualquier caso, dado que la principal vía de adquisición de los bacilos tuberculosos es por inhalación de aerosoles sería poco probable que las micobacterias ingeridas asciendan del estómago al pulmón e induzcan tuberculosis activa (57).

En tres estudios realizados por Perry *et al* (20, 33), se encontró que la coinfección con *H. pylori* incrementó la respuesta inmune protectora contra la infección por *M. tuberculosis* (**Tabla 2**). Sin embargo, todavía no se han superado algunas limitaciones en estos estudios, como una mejor discriminación de los casos de TB (latente o activa) y *H. pylori* (infección pasada o activa).

2.20 Coinfección por *H. pylori*, helmintos y *M. tuberculosis*

Hasta la fecha, solo un estudio epidemiológico ha evaluado el efecto de la coinfección por *H. pylori* y helmintos sobre la respuesta inmune a *M. tuberculosis* (33). En este estudio, se incluyeron 176 adultos refugiados en los EEUU procedentes de países endémicos para TB (**Tabla 2**), y se encontró que los individuos coinfectados con *H. pylori* tenían niveles significativamente altos de IFN- γ , mientras los individuos coinfectados con *H. pylori* y helmintos tenían niveles elevados de IFN- γ , IL-2, IL-13, e IL-5. Como se ha evidenciado previamente, la coinfección por *H. pylori* o helmintos en individuos infectados con *M. tuberculosis* se ha asociado con una respuesta inflamatoria (20) o inmunosupresora (158), respectivamente. Sin embargo, en una infección mixta, los individuos presentan una respuesta inmunitaria Th1 + Th2 típica frente antígenos de *M. tuberculosis*, donde la respuesta Th1 parece ser más pronunciada. Estos efectos han sido reportados previamente en poblaciones de países en desarrollo (24). Sin embargo, estos hallazgos pueden estar condicionados por 1) la heterogeneidad genética de los participantes que provienen de diferentes poblaciones, 2) factores ambientales no específicos que pueden afectar la regulación de la respuesta inmune a infecciones crónicas específicas de cada área geográfica, 3) el tipo de helminto coinfectante, y 4) el genotipo de *H. pylori* (cepas de alta o baja virulencia). En conjunto, se requieren más estudios para evaluar estos efectos en poblaciones endémicas de países en desarrollo.

Tabla 2. Estudios *in vivo* que muestran una asociación entre la infección por *H. pylori* y *M. tuberculosis*.

Autor, año (referencia)	Ubicación	Tipo de estudio	Población de estudio	Media Edad	Exposición <i>Mtb</i>	Principales hallazgos en relación a <i>H. pylori</i>
Mitchell 1992 (37)	China	Corte transversal	1727 individuos	1-50	Cuestionario	La prevalencia de infección por <i>H. pylori</i> fue de 44.2 %. La seroprevalencia de <i>H. pylori</i> en el área urbana fue significativamente diferente del área rural (52.4 % vs 38.6 %, $p<0.05$ respectivamente). La prevalencia de <i>H. pylori</i> se asoció con un antecedente de tuberculosis pulmonar ($p= 0.087$).
Woeltje 1997(34)	Missouri, EEUU	Cohorte no cegada	279 pacientes	17-91	PPD+ ≥ 10 mm Radiografía de tórax	La tasa de reactividad a la PPD fue del 6.8 %. Se encontró que un antecedente de úlcera péptica por <i>H. pylori</i> se asoció con la positividad en la prueba de tuberculina ($p= 0.017$).
Philippou, 2003 (36)	Atenas, Grecia	Casos y controles	80 TB 70 Controles sanos	Media 55 57	Baciloscopia, Cultivo y Biopsia de pulmón	La seropositividad para <i>H. pylori</i> y los niveles IgG específicos para <i>H. pylori</i> en el grupo TB fueron más altos que en los sujetos control (87.5 % vs a 61.4 %; $p=0.02$ y 39.0 U/ml vs a 26.1 U/ml, $p=0.001$, respectivamente).
Perry, 2010 (20)	California EEUU	Corte transversal	97 LTBI+ 242 LTBI-	3-80	PPD+ ≥ 10 mm y QFT ≥ 0.35 IU/ml	La tasa de reactividad a la PPD y QFT fue del 24 % (82/339) y 14 % (48/339), respectivamente. La seropositividad para <i>H. pylori</i> fue mayor en los individuos LTBI positivos en comparación con los individuos sin LTBI (46 % frente a 22 %; $p=0.001$). Además, los sujetos con LTBI/ <i>H. pylori</i> -positivo presentaron respuestas IFN- γ frente antígenos de <i>Mtb</i> 1.5 veces más altas ($p=0.04$) y un mayor perfil de citocinas Th1 (IFN- γ , IL-2, TNF- α , IP -10) comparado con aquellos que fueron LTBI/ <i>H. pylori</i> -negativo.
Perry, 2010 (20)	Gambia y Karachi	Casos y contacto	120 caso Índice 37 caso Incidente 513 no progresor	6-70	Baciloscopia, Cultivo, Radiografía de tórax PPD+ ≥ 10 mm	Los casos Índice de TB fueron significativamente menos propensos a infectarse por <i>H. pylori</i> en comparación con los contactos domésticos que permanecieron libres de enfermedad (49 % vs 66 %, $p=0.005$). La seroprevalencia de <i>H. pylori</i> no vario entre los casos de incidentes y los no progresores (73 % vs 66 %, $p=0.44$).
Perry, 2013 (33)	California EEUU	Corte transversal	176 adultos refugiados en EEUU de los cuales 38 fueron LTBI+ (10 Hp-/Hel- 16 Hp+/Hel- 3 Hp-/Hel+ 9 Hp+/Hel+)	18-55	QTF-GOLD ≥ 0.35 IU/ml	La tasa de reactividad al QFT fue del 22 %. La seropositividad para <i>H. pylori</i> en sujetos LTBI positivo fue mayor que en sujetos LTBI negativo (66 % vs 46 %; $p=0.03$). La coinfección por <i>H. pylori</i> se asoció con niveles más elevados de IFN- γ ($p=0.03$) en comparación con los sujetos con LTBI solamente, mientras que la infección concurrente con <i>H. pylori</i> y helmintos se asoció con niveles más altos de IFN- γ , IL-2, IL-5, IL-13 y TNF- α frente antígenos de <i>M. tuberculosis</i> ($p<0.05$).

Hp: *Helicobacter pylori*; Hel: Helmintos; QFT-GOLD: QuantiFERON-TB GOLD

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

1. Estudiar el efecto de la coinfección por *H. pylori* sobre la respuesta inmune específica a *M. tuberculosis* entre individuos con infección tuberculosa latente en la ciudad de Cali (Valle del Cauca).

3.2 Objetivos específicos

1. Estimar la prevalencia de la infección tuberculosa latente en una población de la ciudad de Cali e identificar los factores asociados con un resultado positivo en la prueba de la tuberculina empleando dos puntos de corte ≥ 10 mm y ≥ 15 mm.

Hipótesis 1: Si hay una alta incidencia de TB activa en Cali, se espera encontrar una alta prevalencia de TB latente y factores asociados.

2. Determinar la frecuencia de la coinfección por *H. pylori* e identificar los factores asociados con la atrofia gástrica en individuos con infección tuberculosa latente.

Hipótesis 2: Si la prevalencia estimada de infección por *H. pylori* es superior al 70 % en países en desarrollo, y cerca del 20 % de los individuos desarrolla manifestaciones clínicas severas, en el contexto de una infección concurrente con *M. tuberculosis* donde hay una producción de TNF- α e IFN- γ necesaria para contener la infección, se espera encontrar una alta frecuencia de infección por *H. pylori* y de lesiones precursoras de cáncer gástrico (atrofia) producto de la sobreproducción de TNF- α e IFN- γ que exacerba la inflamación.

3. Evaluar el efecto de la infección simultánea con *H. pylori* y su virulencia sobre la respuesta inmune frente antígenos específicos de *M. tuberculosis* en individuos con infección tuberculosa latente.

Hipótesis 3: Si la infección por *H. pylori* induce una fuerte respuesta celular Th1/Th17 a nivel local y sistémico que puede actuar indirectamente (efecto espectador) contra otras infecciones en el hospedero, y esta respuesta es más pronunciada en infecciones con cepas de alta virulencia (*caqA*+/*vacA* *s1m1*). Se espera que los PBMCs obtenidos de individuos LTBI coinfectados por *H. pylori* produzcan altos niveles de citocinas proinflamatorias (IFN- γ , IL-12, TNF- α , IL-1 β , e IL-17) en respuesta antígenos de *M. tuberculosis*, con una respuesta más marcada en aislados de alta virulencia.

4 CAPÍTULO 1. PREVALENCIA Y FACTORES ASOCIADOS CON INFECCIÓN TUBERCULOSA LATENTE EN CALI, COLOMBIA

La tuberculosis representa un importante problema de salud en Colombia, su control está enfocado en la búsqueda de contactos y tratamiento de casos confirmados sobrestimando el papel de la infección tuberculosa latente (LTBI) como reservorio de *M. tuberculosis*. La verdadera carga de LTBI en Colombia se desconoce. Con el objetivo de estimar la prevalencia de LTBI, y conocer los factores asociados. Se realizó un estudio de corte transversal en individuos que asistieron al servicio de consulta externa en cuatro centros de atención en salud de la ciudad de Cali. La población de estudio incluyó individuos entre 14-70 años quienes respondieron un cuestionario evaluando su historial médico, datos sociodemográficos y estilos de vida. Se excluyeron los participantes que presentaban enfermedades crónicas y condiciones inmunosupresoras. El estado LTBI se basó en la positividad a la PPD empleando dos umbrales: ≥ 10 mm (PPD-10) y ≥ 15 mm (PPD-15). La magnitud de las asociaciones fue evaluada mediante regresión logística y un modelo lineal generalizado. 589 individuos fueron incluidos con una positividad PPD de 25.3 % (PPD-10) y 13.2 % (PPD-15). La regresión logística mostró que la edad en un rango de 40-69 años, el género masculino, la situación laboral, y un bajo consumo de alcohol incrementaron la oportunidad de presentar un resultado positivo en la PPD, mientras residir en la zona (norte y ladera) junto con estudios de secundaria disminuyeron esta oportunidad. En apoyo a estas observaciones, el modelo lineal generalizado mostró que las anteriores variables incluido un bajo índice de masa corporal (IMC) tuvieron un efecto sobre el diámetro de la induración en la PPD. Estos datos sugieren que la prevalencia de LTBI en nuestra población es moderada en comparación con la prevalencia del 11 % estimada para la región de las Américas, reflejando indirectamente la transmisión continua de *M. tuberculosis*. Los factores sociales parecen jugar un papel determinante en la oportunidad de adquirir la infección tuberculosa latente en la ciudad. Siendo los hombres mayores de 40 años, laboralmente activos, con bajo nivel académico, bajo consumo de alcohol y con exceso de peso, un grupo de riesgo a priorizar para el tratamiento profiláctico de LTBI como estrategia para el control y la erradicación de la TB en Cali.

4.1 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.1 Diseño del estudio

Este estudio de corte transversal basado en la comunidad, fue realizado entre el 27 septiembre del 2016 al 1 de diciembre del 2017 en Cali, Colombia. Un centro industrial y comercial en el suroccidente colombiano con una población de 2.394.925 habitantes. La incidencia de tuberculosis para Cali en el 2016 fue 41 casos por 100.000 habitantes con una mortalidad anual de 90 a 100 personas (66). Los participantes del estudio fueron reclutados en tres hospitales de primer nivel de complejidad (Hospital Joaquín Paz Borrero, Hospital Cañaveralejo, Hospital Primitivo Iglesias) y un hospital de segundo nivel (Hospital San Juan de Dios con capacidad de 176 camas) distribuidos estratégicamente en 3 diferentes zonas de la ciudad (norte, ladera y centro).

4.1.2 Participantes y recolección de datos

Los participantes fueron reclutados en el servicio de consulta de cada hospital. 1079 voluntarios con edades comprendidas entre los 14-70 años completaron un cuestionario en papel que incluyó preguntas demográficas, socioeconómicas, estilos de vida e historial clínico (**Anexo 1**) proporcionado por enfermeras capacitadas con el fin de conocer si cumplían con los criterios de participación en el estudio, y verificar la coherencia de la información suministrada. Asumiendo una prevalencia de LTBI del 42.7 % estimada en población fuente de Medellín (159), otra ciudad de Colombia con una incidencia de TB (50 casos por 100.000 habitantes) similar a Cali (160), un nivel de confianza del 95 %, una precisión del 4 %, y 10 % de tasa de no respuesta, el tamaño de la muestra calculado fue de 647 individuos. Se excluyeron los participantes que presentaron enfermedades crónicas (hipertensión, diabetes y cáncer), antecedentes de tuberculosis, tos recurrente acompañada de pérdida de peso sin explicación, cardiopatías, enfermedad avanzada del hígado, y condiciones inmunosupresoras (infección por VIH/SIDA, antecedentes de trasplantes y lupus), mujeres en embarazo y lactando. Bajo estos criterios, se seleccionaron 629 (58.3 %) participantes pertenecientes al régimen subsidiado de salud y residentes (mínimo 1 año) en la ciudad, quienes se sometieron a la prueba cutánea de la tuberculina. Pasadas 48 a 72 horas de la aplicación, 606 (96.3 %) participantes retornaron para la medición e interpretación de la induración. Posteriormente, se excluyeron 5 individuos por pertenecer a un estrato socioeconómico alto, y otros 12 individuos por estar adscritos a centros de salud pertenecientes a otras zonas de la ciudad. De esta forma 589 participantes fueron seleccionados para continuar en el estudio (**Figura 9**). El consentimiento informado (**Anexo 2**) y asentimiento fue obtenido para todos los adultos y adolescentes participantes, respectivamente. Este estudio contó con aval del comité de ética de la Universidad del Valle (CIREH) (**Anexo 3**).

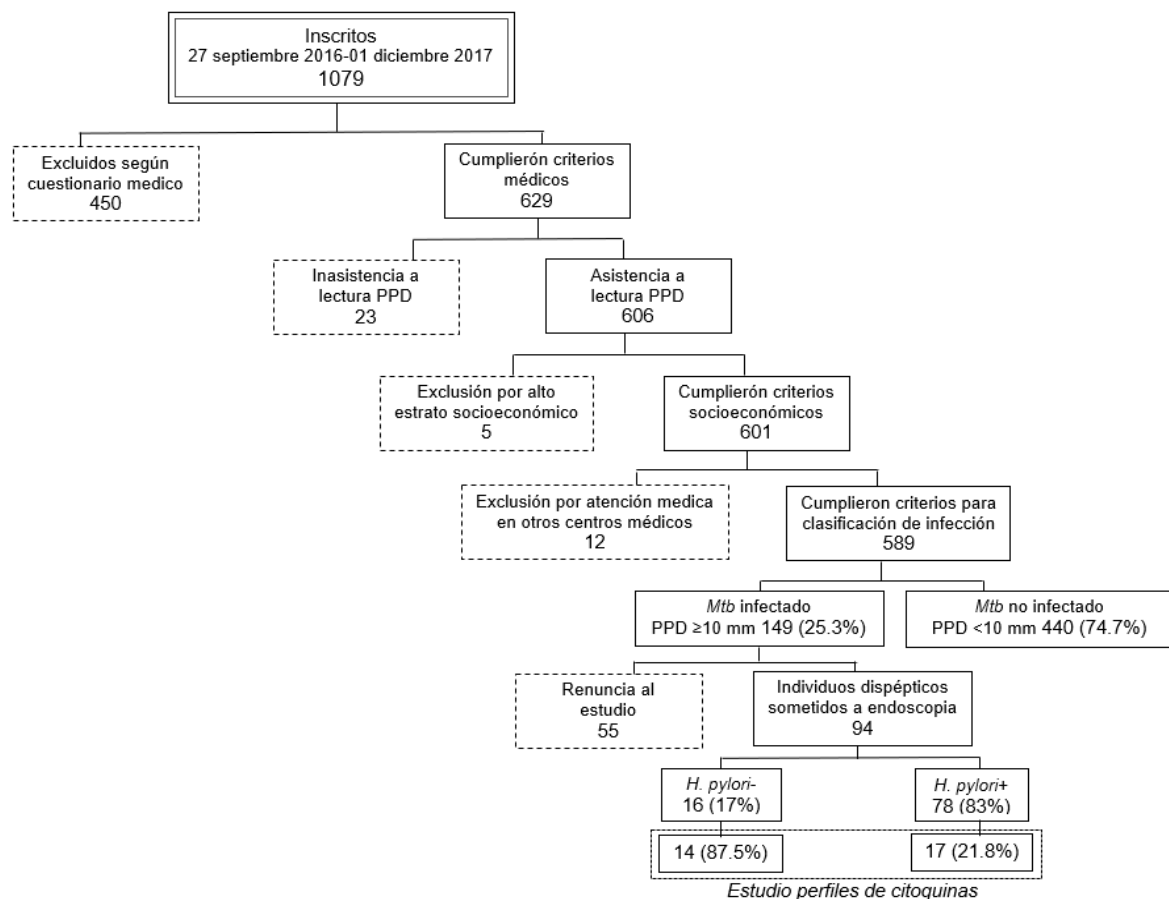


Figura 9. Diagrama de flujo para la captación, valoración y diagnóstico clínico de infecciones en la población de estudio.

Las variables empleadas en la presente investigación son descritas en el **Anexo 4**. El hacinamiento fue definido como mitigable según el DANE (161), considerando los hogares que habitan en viviendas con más de tres a menos de cinco personas por cuarto. El antecedente de vacunación con el *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) se evaluó mediante inspección visual de la cicatriz. Nivel social (estrato) se refiere a una clasificación basada en las características de los inmuebles residenciales, la disponibilidad o no de servicios públicos y el entorno urbano, definido en 3 niveles: 1 bajo-bajo, 2 bajo y 3 medio-bajo dado que se trabajó con población subsidiada. Historia de tabaquismo fue definido como consumo de tabaco en los últimos 6 meses consecutivamente. Consumo de alcohol fue estratificado en 4 niveles: alto (consumo entre 350-750 mL $\geq$ 4 veces/semana), moderado (consumo entre 250-750 mL 2-3 veces/semana), bajo (consumo entre 50-100 mL 1 vez/semana) y no consumidor. Ejercicio fue definido como SI (realiza actividad física siempre o $\geq$ 3 veces /semana), NO (nunca realiza actividad física o $\leq$ 2 veces/semana). El índice de masa corporal (IMC) fue clasificado como delgadez (<18.5 kg/m²), peso normal (≥ 18.5 a 24.9 kg/m²), sobrepeso (≥ 25 a 30 kg/m²) y obesidad (≥ 30 kg/m²) de acuerdo a la clasificación propuesta por la OMS (162). La situación laboral se categorizó

como trabajador activo (empleado e independiente) y desempleado (ama de casa, estudiante y pensionado).

4.1.3 Prueba cutánea de la tuberculina

Cinco unidades de tuberculina PPD Mammalian® (BB-NCIPD Ltd., Sofia, Bulgaria) en 0.1 mL fueron inyectadas intradérmicamente en la cara anterior del antebrazo izquierdo de cada participante por una enfermera. El diámetro transversal de la induración fue medido 48-72 horas después, usando la técnica estándar de Mantoux (163).

4.1.4 Determinación de la infección latente por *M. tuberculosis*

Dos diferentes umbrales fueron considerados para un resultado PPD positivo. Una induración de 10 mm o más (PPD-10) y una induración dependiente del estado BCG que para los participantes vacunados fue positiva a 15 mm o más (PPD-15) conforme a las guías actuales del CDC (59). Dado que las acciones de vacunación en Colombia tienen sus inicios en la década de los 60, y la aplicación regular de la BCG se intensificó a partir de la década de los 70 como parte de las estrategias de salud pública contra las enfermedades prevenibles definidas por la OPS/OMS (164). En el análisis primario, si se desconocía el estado BCG, se asumió que los participantes habían sido vacunados (consistente con las recomendaciones internacionales) (165).

Todos los participantes con un resultado positivo en la prueba cutánea de la tuberculina se les practicó una radiografía torácica antero-posterior y lateral estándar de acuerdo al algoritmo diagnóstico para TB latente en Colombia (166). La LTBI fue definida como un resultado PPD+ en ausencia de síntomas respiratorios de TB y hallazgos radiológicos normales. Se sospechó TB activa si los individuos presentaban anomalías radiológicas, tos crónica (más de 3 semanas), pérdida de peso, sudoración nocturna y fiebre. Todos los casos con sospecha de TB fueron excluidos y remitidos al programa de tuberculosis de cada institución para el inicio de tratamiento antibiótico. Los individuos con tuberculosis latente no recibieron tratamiento profiláctico. Actualmente, el programa de control de la tuberculosis en Colombia no tiene una política para ofrecer terapia preventiva con isoniazida (IPT), excepto en individuos VIH+ y niños menores de 5 años contacto de personas tuberculosas (167).

4.1.5 Plan de análisis

Inicialmente se realizó un análisis univariado, y se comprobó la normalidad de los datos cuantitativos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, encontrándose que no se distribuían en forma normal, por lo que se recurrió a la estadística no paramétrica. Durante el análisis bivariado para datos independientes, las variables continuas se describieron como promedios con su respectiva desviación estándar,

y las variables categóricas como proporciones. Para estudiar las asociaciones entre las variables independientes y el diámetro de la induración, se empleó la prueba *U* de Mann-Whitney o una ANOVA de Kruskal-Wallis. Adicionalmente, se realizaron comparaciones múltiples para las variables con más de dos categorías empleando la prueba de Dunn con un ajuste de los valores de significancia mediante la corrección de Bonferroni.

Para estudiar las diferencias entre cada una de las variables independientes y la presencia de infección tuberculosa latente, se empleó una prueba de X^2 o prueba exacta de Fisher con su correspondiente razón de ventajas (OR) y los intervalos de confianza al 95 %. Modelos de regresión logística multivariada y lineales generalizados se emplearon para evaluar el efecto de las variables independientes sobre la variable de respuesta: positividad a la PPD y diámetro de la induración en la PPD, respectivamente. Basado en la evidencia descrita en la literatura publicada, todas las variables del análisis bivariado fueron introducidas en los análisis multivariados. Para la introducción de variables en el modelo de regresión logística se empleó el método Backward: Wald controlando cada uno de los factores para encontrar los predictores que mejor explicaran la variable dependiente. La selección de predictores dentro del modelo, se realizó utilizando los criterios de probabilidad (entrada $p \leq 0.05$, salida $p \geq 0.10$).

Para el modelo lineal generalizado se empleó un modelo personalizado con una distribución normal y una función de vínculo de identidad. El modelo se construyó mediante el método efectos principales, y las estimaciones de parámetros para seleccionar el mejor modelo se calcularon empleando el método de máxima verosimilitud acompañado de un estimador robusto de la varianza. Los coeficientes β reportados fueron estandarizados. Para todos los modelos, se realizó un análisis de remuestreo con reemplazo para 5000 muestras que permitió comparar las medidas de efecto obtenidas en el modelo original con el modelo remuestreado. Los análisis fueron desarrollados con el paquete estadístico SPSS 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos) y GraphPad Prism 7 (GraphPad software Inc., San Diego, CA, Estados Unidos).

4.2 RESULTADOS

4.2.1 Características socio-demográficas y estilos de vida de la población participante

589 individuos cumplieron estrictamente los criterios de inclusión y exclusión para una tasa de respuesta de 54.6 % (**Figura 9**). Como se observa en la **Tabla 3**, la edad se clasificó en 6 grupos a partir de 19 hasta 70 años. El 55.2 % de los participantes se encontraban en el rango de 40-59 años y la edad promedio fue de 43.8 ± 13.2 años. Las mujeres constituyeron el 80 % de la población total. La distribución de los individuos en los 3 niveles sociales evaluados fue homogénea (~30 %). Solo 5.4 % de los participantes reportaron condiciones de hacinamiento. El 63.5 % de los participantes habían cursado estudios de secundaria, y 56 % se encontraban en situación de desempleo. Más de la mitad (56.7 %) de los participantes habitaban en la zona norte de la ciudad. El 69.9 % no realiza actividad física regular y más de la mitad de la población evaluada presenta sobrepeso y obesidad (54.5 %). El 84.9 % de los participantes manifiesta no tener antecedentes de tabaquismo o consumo actual de cigarrillo, y el 87.1 % no consume alcohol. Como antecedentes clínicos se observó que una baja proporción (9 %) de los individuos no presentaba cicatriz BCG visible.

Tabla 3. Prevalencia de LTBI empleando dos puntos de corte (≥ 10 mm y ≥ 15 mm) según características socio-demográficas y del comportamiento en la población de estudio, y su asociación con el diámetro en la prueba de tuberculina ($n= 589$).

Característica	n (%)	PPD-10 %	PPD-15 %	PPD milímetros		
				Media	DS	p
Edad						
14-19	31 (5.3)	6.5	6.5	3.42	4.20	0.000
20-29	74 (12.6)	13.5	5.4	4.15	4.76	
30-39	96 (16.3)	22.9	11.5	5.32	5.63	
40-49	145 (24.6)	31.0	13.8	6.95	6.73	
50-59	180 (30.6)	26.7	16.7	6.87	7.01	
60-69	63 (10.7)	34.9	17.5	8.05	7.82	
Género						
Masculino	118 (20.0)	33.9	17.8	7.03	6.81	0.267
Femenino	471 (80.0)	23.1	12.1	6.04	6.49	
Estrato						
1	212 (36.0)	22.6	9.4	5.83	5.59	0.251
2	198 (33.6)	23.2	15.2	5.97	6.63	
3	179 (30.4)	30.7	15.6	7.03	7.46	
Hacinamiento						
> 3 persona/cuarto	32 (5.4)	25.0	15.6	6.06	6.04	0.766
≤ 3 persona/cuarto	557 (94.6)	25.3	13.1	6.25	6.60	
Educación						
Primaria	215 (36.5)	32.1	18.6	7.58	7.32	0.001
Secundaria	321 (54.5)	21.5	10.6	5.52	6.07	

Post-secundaria	53 (9.0)	20.8	7.5	5.15	5.25	
Situación Laboral						
Trabajador	259 (44.0)	32.0	16.2	7.08	7.21	0.034
Desempleado	330 (56.0)	20.0	10.9	5.58	5.93	
Residencia						
Zona Norte	334 (56.7)	22.2	10.8	5.63	6.13	
Zona Ladera	183 (31.1)	21.3	9.3	5.71	5.37	0.001
Zona Centro	72 (12.2)	50	34.7	10.44	9.26	
Ejercicio						
No	412 (69.9)	23.1	12.6	5.95	6.27	0.414
Si	177 (30.1)	30.5	22.2	6.92	7.17	
Historia de tabaquismo						
Si	89 (15.1)	29.2	14.6	6.90	6.95	0.311
No	500 (84.9)	24.6	13.0	6.12	6.50	
Consumo cigarrillo						
Si	68 (11.5)	29.4	16.2	7.00	7.37	0.641
No	521 (88.5)	24.8	12.9	6.14	6.45	
Consumo alcohol						
Alto	6 (1.0)	16.7	0.0	5.33	4.23	
Moderado	35 (5.9)	17.1	8.6	4.46	5.77	
Bajo	35 (5.9)	42.8	25.7	6.46	8.47	0.012
No consumo	513 (87.1)	24.8	12.9	6.16	6.44	
IMC (kg/estatura m²)						
Delgadez <18.5	20 (3.4)	5.0	5.0	3.35	3.63	
Normal ≥18.5 a 24.9	248 (42.1)	22.6	12.9	5.81	6.57	0.025
Sobrepeso ≥25 a 30	229 (38.9)	28.4	14.0	6.70	6.53	
Obesidad ≥30	92 (15.6)	29.3	14.1	6.89	6.94	
Cicatriz BCG						
No	53 (9.0)	24.5	15.1	6.13	7.03	0.670
Si	536 (91.0)	25.4	13.1	6.25	6.52	

4.2.2 Prevalencia de la infección tuberculosa latente

La prevalencia global de tuberculosis latente en población estudiada empleando como punto de corte ≥ 10 mm (PPD-10) fue 25.3 % (149/589) y con un punto de corte ≥ 15 mm (PPD-15) fue 13.2 % (78/589). Se observó un incremento gradual en la prevalencia de LTBI con la edad, alcanzándose la mayor prevalencia en la categoría de 60-69 años. La prevalencia de LTBI fue mayor en hombres (33.9 %) PPD-10, y (17.8 %) PPD-15 (**Tabla 3**). Específicamente, como se muestra en la **Figura 10**, para ambos puntos de corte PPD-10 y PPD-15, la tasa de LTBI incrementó en hombres y mujeres junto con el incremento de la edad, pero la prevalencia de LTBI en hombres fue significativamente mayor que en mujeres para la categoría 40-49 años [OR: 3.72, IC 95 % 1.38-10.03] PPD-10 (**Tabla 4**) y [OR= 5.07, IC 95 % 1.69-15.1] PPD-15 (**Tabla 5**).

La prevalencia de la infección estimada por PPD-10 fue mayor en individuos pertenecientes al estrato 3 (30.7 %) mientras para PPD-15 la prevalencia entre el estrato 2 y 3 fue igual (15 %). La población con un nivel educativo de primaria presentó una mayor prevalencia de tuberculosis latente (32.1 %) PPD-10 y (18.6 %) PPD-15 en comparación con los individuos con estudios superiores. Así mismo, los trabajadores presentaron una mayor prevalencia de tuberculosis latente (32.0 %) PPD-10 y (15.6 %) PPD-15. Al evaluar la prevalencia de LTBI por zonas, se evidenció que para ambos puntos de corte PPD, la zona centro presentó elevada prevalencia. La prevalencia de tuberculosis latente determinada por PPD-10 y PPD-15 también fue mayor en individuos con antecedentes de tabaquismo, fumadores activos, consumo bajo de alcohol, quienes realizan actividad física regular, e individuos con sobrepeso y obesidad. En contraste, no se observaron diferencias en la prevalencia de LTBI con respecto al hacinamiento dentro de los hogares, y el estado de vacunación con la BCG (**Tabla 3**).

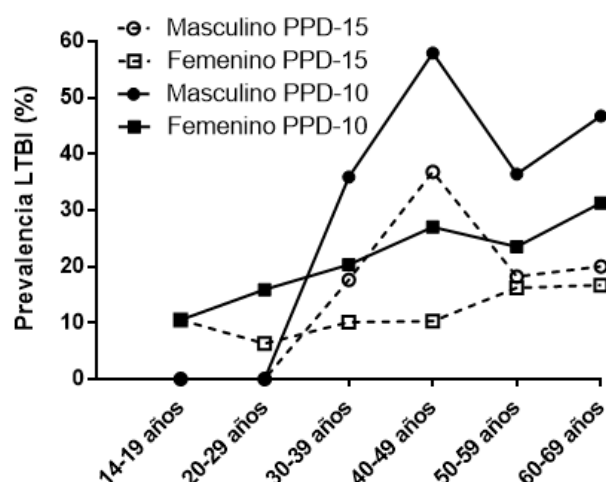


Figura 10. Tendencia en la prevalencia de LTBI según la edad empleando dos umbrales PPD (≥ 10 mm y ≥ 15 mm) en la población de estudio estratificada por sexo.

Tabla 4. Diferencias en la prevalencia de infección tuberculosa latente (LTBI) entre hombres y mujeres por grupos de edad, punto de corte (PPD-10).

Edad	Masculino			Femenino			OR (IC 95 %)	p
	N	PPD-positivo n	%	N	PPD-positivo n	%		
14-19	12	0	--	19	2	10.5	-----	*0.510
20-29	11	0	--	63	10	15.9	-----	0.155
30-39	72	6	35.9	79	16	20.3	2.15 (0.69-6.69)	0.181
40-49	19	11	57.9	126	34	27.0	3.72 (1.38-10.03)	0.007
50-59	44	16	36.4	136	32	23.5	1.86 (0.89-3.86)	0.094
60-69	15	7	46.7	48	15	31.3	1.93 (0.59-6.23)	0.274

*Valor *p* fue calculado a partir de una prueba exacta de Fisher.

Tabla 5. Diferencias en la prevalencia de infección tuberculosa latente (LTBI) entre hombres y mujeres por grupos de edad, punto de corte (PPD-15).

Edad	Masculino			Femenino			OR (95 % CI)	p
	N	PPD-positivo n	%	N	PPD-positivo n	%		
14-19	12	0	--	19	2	10.5	-----	*0.510
20-29	11	0	--	63	4	6.3	-----	*1.000
30-39	17	3	17.6	79	8	10.1	1.90 (0.45-8.07)	0.377
40-49	19	7	36.8	126	13	10.3	5.07 (1.69-15.1)	0.002
50-59	44	8	18.2	136	22	16.2	1.15 (0.47-2.81)	0.756
60-69	15	3	20.0	48	8	16.7	1.25 (0.29-5.47)	0.767

*Valor *p* fue calculado a partir de una prueba exacta de Fisher.

4.2.3 Factores demográficos, socio-económicos, estilos de vida y su asociación con el diámetro en la prueba de la tuberculina

El diámetro promedio de la induración entre individuos PPD+ y PPD- utilizando el umbral ≥ 10 mm (16 mm vs 2.9 mm) o ≥ 15 mm (19.7 mm vs 4.2 mm) en ambos casos fue significativo ($p=0.000$), y se ubicó por encima del punto de corte establecido para cada caso. El diámetro de la induración en la prueba de tuberculina (PPD) independiente del umbral mostró asociación con múltiples variables, entre ellas edad, nivel educativo, situación laboral, zona de residencia, consumo de alcohol e IMC (**Tabla 3**).

En el análisis de comparaciones múltiples, se observaron diferencias al comparar el promedio de la induración de los individuos en las categorías 14-19 años y 20-29 años con los grupos de edad de 40-49 años, 50-59 años y 60-69 años ($p<0.05$). Los individuos con un nivel de educación de primaria presentaron un promedio mayor en el diámetro de la PPD comparado con los individuos con estudios superiores, secundaria ($p=0.000$) y postsecundaria ($p=0.025$). También se observó que los individuos que residen en el centro de la ciudad presentaron un promedio mayor en la induración PPD en comparación con los individuos que residen en la zona norte ($p=0.000$), y de ladera ($p=0.040$). Los individuos con un consumo de alcohol bajo presentaron una mayor induración en la PPD comparado con los individuos con un consumo moderado ($p=0.006$). En cuanto al IMC, inicialmente se observó que los individuos delgados en comparación con los individuos en sobrepeso y obesidad presentaron un promedio menor en diámetro de la PPD ($p<0.05$). No obstante, con el ajuste de los valores de significancia no se observaron diferencias estadísticas.

El modelo lineal generalizado mostró que la edad a partir de los 30 años, residir en la zona norte o de ladera, tener estudios superiores (secundaria y postsecundaria), y una bajo IMC (delgadez) tienen un efecto conjunto sobre el diámetro de la induración en PPD. El coeficiente de determinación (R^2) encontrado fue de 0.141 (14.1 %). Los resultados del remuestreo confirmaron las estimaciones obtenidas con el modelo de regresión lineal generalizado. En la **Tabla 6** se presentan los respectivos coeficientes estandarizados de β y sus valores de probabilidad.

Tabla 6. Modelo lineal generalizado para los predictores del diámetro de la PPD

Variables	*β	DE β	IC 95 %	p	B β	B DE β	B IC 95 %	B p
Intercepto	9.057	1.603	5.91; 12.2	0.000	9.057	1.638	5.96; 12.3	0.000
Educación (Secundaria)	-1.414	0.653	-2.70; -0.13	0.030	-1.414	0.675	-2.73; -0.07	0.042
Educación (Post-secundaria)	-1.890	0.882	-3.62; -0.16	0.032	-1.890	0.915	-3.66; -0.15	0.040
IMC (Delgadez)	-2.295	0.779	-3.82; -0.77	0.003	-2.295	0.873	-4.09; -0.63	0.005
Residencia (Norte)	-3.923	1.155	-6.18; -1.66	0.001	-3.923	1.179	-6.34; -1.73	0.002
Residencia (Ladera)	-4.154	1.175	-6.46; -1.85	0.000	-4.154	1.201	-6.59; -1.91	0.001
Consumo alcohol (Bajo)	3.126	1.408	0.37; 5.88	0.026	3.126	1.484	0.42; 6.17	0.044
Edad (40-49 años)	2.583	1.003	0.62; 4.55	0.010	2.583	1.045	0.44; 4.57	0.015
Edad (50-59 años)	1.734	0.999	-0.22; 3.69	0.082	1.734	1.027	0.09; -0.35	0.097
Edad (60-69 años)	3.366	1.271	0.87; 5.86	0.008	3.366	1.300	0.85; 5.99	0.008

*Coeficientes estandarizados, DE: Desviación estándar; B Remuestreado para 5000 muestras.

4.2.4 Factores demográficos, socio-económicos, estilos de vida y su asociación con positividad a la tuberculina (≥ 10 mm)

Como se muestra en la **Tabla 7**, cuando se tomó el grupo de participantes con 14-19 años como referencia, se encontró que, a partir de los 30 años, la oportunidad de presentar LTBI incrementó significativamente con ORs de 4.31 a 7.78. En este estudio de corte transversal los hombres presentaron una ventaja 1.70 veces mayor de presentar LTBI en comparación con las mujeres [OR= 1.70, IC 95 % 1.10-2.64]. Adicionalmente, se encontró que un nivel de educación superior disminuyó la oportunidad de presentar infección tuberculosa latente cuando se comparó con un nivel de primaria o inferior [OR= 0.59, IC 95 % 0.39-0.86 para secundaria]. Ser trabajador incrementó significativamente la oportunidad de presentar tuberculosis latente [OR= 1.89, IC 95 % 1.30-2.75]. Cuando se evaluó la oportunidad de presentar tuberculosis latente por zonas teniendo como referencia la zona centro de alta prevalencia (50 %), se observó que residir en la zona norte o de ladera se asoció con una reducción de esa oportunidad [OR= 0.29, IC 95 % 0.17-0.48] y [OR= 0.27, IC 95 % 0.15-0.49], respectivamente. Mientras el consumo bajo de alcohol incrementó significativamente la oportunidad de presentar tuberculosis latente [OR= 2.28, IC 95 % 1.13-4.59]. No se observó asociación entre la cicatriz BCG y la positividad a la PPD.

En el análisis de regresión logística multivariada (**Tabla 8**), se encontró que la edad a partir de los 30 años con ORs de 4.29 a 8.30, pertenecer al género masculino [OR= 1.71, IC 95 1.04-2.84], estar laboralmente activo [OR= 1.56, IC 95 % 1.02-2.38] y un consumo bajo de alcohol [OR= 2.40, IC 95 % 1.13-5.11] incrementaron la oportunidad de presentar tuberculosis latente, mientras residir en la zona norte o de ladera de la ciudad redujeron la oportunidad de presentar LTBI [OR= 0.32, IC 95 % 0.18-0.55] y [OR= 0.28, IC 95 % 0.15-0.52], respectivamente. El modelo presentó una sensibilidad de 12.8 % y una especificidad de 97.3 %, con un coeficiente R^2 de Cox & Snell de 0.098 (9.8 %). Los resultados del remuestreo confirmaron las

estimaciones obtenidas con el modelo inicial, y corroboró la significancia del predictor (edad 30-39 años) dentro del modelo.

Tabla 7. Características socio-demográficas y del comportamiento en la población de estudio y su asociación con la positividad en la prueba de tuberculina empleando dos puntos de corte (≥ 10 mm, $n=149$) y (≥ 15 mm, $n=78$).

Característica	N	PPD-10			PPD-15		
		n (%)	OR (IC 95 %)	p	n (%)	OR (IC 95 %)	p
Edad							
14-19	31	2 (1.3)	*Referencia		2 (2.6)	Referencia	
20-29	74	10 (6.7)	2.26 (0.46-11.0)	0.300	4 (5.1)	0.83 (0.14-4.77)	1.00
30-39	96	22 (14.8)	4.31 (0.95-19.5)	0.042	11 (14.1)	1.87 (0.39-8.97)	0.424
40-49	145	45 (30.2)	6.52 (1.49-28.5)	0.005	20 (25.6)	2.32 (0.51-10.5)	0.262
50-59	180	48 (32.2)	5.27 (1.21-22.9)	0.014	30 (38.5)	2.90 (0.65-12.8)	0.143
60-69	63	22 (14.8)	7.78 (1.69-35.7)	0.003	11 (14.1)	3.06 (0.63-14.7)	0.146
Género							
Masculino	118	40 (26.8)	1.70 (1.10-2.64)	0.016	21 (26.9)	1.57 (0.91-2.72)	0.103
Femenino	471	109 (73.2)	Referencia		57 (73.1)	Referencia	
Estrato							
1	212	48 (32.2)	0.66 (0.42-1.04)	0.071	20 (25.6)	0.56 (0.30-1.03)	0.062
2	198	46 (30.9)	0.68 (0.43-1.08)	0.101	30 (38.5)	0.96 (0.55-1.68)	0.895
3	179	55 (36.9)	Referencia		28 (35.9)	Referencia	
Hacinamiento							
> 3 persona/cuarto	32	8 (5.4)	0.98 (0.43-2.24)	0.968	5 (6.4)	1.23 (0.45-3.29)	0.683
≤ 3 persona/cuarto	557	141 (94.6)	Referencia		73 (93.6)	Referencia	
Educación							
Post-secundaria	53	11 (7.4)	0.55 (0.27-1.14)	0.106	4 (5.1)	0.35 (0.12-1.05)	0.052
Secundaria	321	69 (46.3)	0.59 (0.39-0.86)	0.006	34 (43.6)	0.52 (0.32-0.85)	0.008
Primaria	215	69 (46.3)	Referencia		40 (51.3)	Referencia	
Situación Laboral							
Trabajador	259	83 (55.7)	1.89 (1.30-2.75)	0.001	42 (53.8)	1.58 (0.98-2.55)	0.059
Desempleado	330	66 (44.3)	Referencia		36 (46.2)	Referencia	
Residencia							
Zona Norte	334	74 (49.7)	0.29 (0.17-0.48)	0.000	36 (46.2)	0.22 (0.12-0.41)	0.000
Zona Ladera	183	39 (26.2)	0.27 (0.15-0.49)	0.000	17 (21.8)	0.19 (0.09-0.38)	0.000
Zona Centro	72	36 (24.2)	Referencia		25 (32.1)	Referencia	
Ejercicio							
No	412	95 (63.8)	0.68 (0.46-1.01)	0.057	52 (66.7)	0.83 (0.50-1.39)	0.497
Si	177	541 (36.2)	Referencia		26 (33.3)	Referencia	
Historia de tabaquismo							
Si	89	26 (17.4)	1.27 (0.77-2.09)	0.356	13 (16.7)	1.14 (0.60-2.18)	0.680
No	500	123 (82.6)	Referencia		65 (83.3)	Referencia	
Consumo cigarrillo							
Si	68	20 (13.4)	1.27 (0.72-2.21)	0.407	11 (14.1)	1.31 (0.65-2.62)	0.448
No	521	129 (86.6)	Referencia		67 (85.9)	Referencia	
Consumo alcohol							
Alto	6	1 (0.7)	0.61 (0.07-5.25)	0.648	0 (0.0)	-----	0.347

Moderado	36	6 (4.0)	0.61 (0.25-1.49)	0.273	3 (3.8)	0.62 (0.18-2.06)	0.428
Bajo	35	15 (10.1)	2.28 (1.13-4.59)	0.018	9 (11.5)	2.34 (1.05-5.22)	0.032
No consumo	513	127 (85.2)	Referencia		66 (84.6)	Referencia	
IMC (kg/m²)							
<18.5	20	1 (0.7)	0.18 (0.02-1.38)	0.065	1 (1.3)	0.35 (0.04-2.74)	0.301
≥18.5 a 24.9	248	56 (37.6)	Referencia		32 (41.0)	Referencia	
≥25 a 30	229	65 (43.6)	1.35 (0.89-2.05)	0.146	32 (41.0)	1.09 (0.65-1.86)	0.732
≥30	92	27 (18.1)	1.42 (0.83-2.44)	0.197	13 (16.7)	1.11 (0.55-2.22)	0.767
Cicatriz BCG							
No	53	13 (8.7)	0.96 (0.49-1.84)	0.893	8 (10.3)	1.18 (0.53-2.61)	0.677
Si	536	136 (91.3)	Referencia		70 (89.7)	Referencia	

*Referencia: Categoría empleada para realizar comparaciones.

Tabla 8. Factores asociados con la positividad a la tuberculina (≥10 mm) utilizando una regresión logística multivariada.

Variables	β	Wald	OR*	IC 95 %	p	B p
Intercepto	-2.007	6.670			0.010	0.007
Género (Masculino)	0.540	4.420	1.71	1.04; 2.84	0.036	0.027
Situación laboral (Trabajador)	0.445	4.272	1.56	1.02; 2.38	0.039	0.040
Residencia (Norte)	-1.153	16.185	0.32	0.18; 0.55	0.000	0.000
Residencia (Ladera)	-1.267	16.547	0.28	0.15; 0.52	0.000	0.000
Consumo alcohol (Bajo)	0.874	5.139	2.40	1.13; 5.11	0.023	0.032
Edad (30-39 años)	1.455	3.414	4.29	0.92; 20.0	0.065	0.034
Edad (40-49 años)	1.986	6.719	7.28	1.62; 32.7	0.010	0.008
Edad (50-59 años)	1.514	3.929	4.55	1.02; 20.3	0.047	0.025
Edad (60-69 años)	2.116	7.160	8.30	1.76; 39.1	0.007	0.004

*A partir de un modelo de regresión logístico multivariado con edad, género, estrato, hacinamiento, educación, situación laboral, residencia, ejercicio, historia de tabaquismo, consumo de cigarrillo, consumo alcohol, IMC y presencia cicatriz BCG.

B: Remuestreado para 5000 muestras, Bp: p valor del remuestreo

4.2.5 Factores demográficos, socio-económicos, estilos de vida y su asociación con positividad a la tuberculina (≥15 mm)

En el análisis bivariado para el punto de corte PPD 15 mm, solo tres variables mostraron asociación con la positividad de la PPD (**Tabla 7**). Se observó que un nivel de educación superior (secundaria) redujo la oportunidad de presentar infección tuberculosa latente comparado con un nivel de primaria o inferior [OR= 0.52, IC 95 % 0.32-0.85]. Así mismo, residir en la zona norte [OR= 0.22, IC 95 % 0.12-0.41] o zona de ladera [OR= 0.19, IC 95 % 0.09-0.38] redujeron la oportunidad de presentar LTBI. En contraste, un consumo bajo de alcohol incrementó significativamente la oportunidad de presentar tuberculosis latente [OR= 2.34, IC 95 % 1.05-5.22].

En el análisis multivariado (**Tabla 9**), en concordancia con el modelo de regresión obtenido para PPD-10, se observó que pertenecer al género masculino [OR= 1.76, IC 95 0.98-3.17], y un consumo bajo de alcohol [OR= 2.33, IC 95 % 0.98-5.56]

aumentaron la oportunidad de presentar tuberculosis latente, pero no mostraron significancia. Mientras residir en la zona norte o de ladera de la ciudad se asoció con una reducción significativa en la oportunidad de presentar tuberculosis latente [OR= 0.25, IC 95 % 0.14-0.47] y [OR= 0.19, IC 95 % 0.09-0.39], respectivamente. Otro factor que se asoció con una reducción en la oportunidad de presentar LTBI dentro de este modelo fue el nivel de educación (secundaria) con un OR= 0.49 [IC 95 % 0.29-0.83]. El modelo presentó una sensibilidad de 5.1 % y una especificidad de 99.0 %, con un coeficiente R^2 de Cox & Snell de 0.069 (6.9 %). Los resultados del remuestreo corroboraron los hallazgos del modelo de logístico.

Tabla 9. Factores asociados con la positividad a la tuberculina (≥ 15 mm) utilizando una regresión logística multivariada.

Variables	β	Wald	OR*	IC 95 %	p	B p
Intercepto	-0.421	2.011			0.156	0.168
Género (Masculino)	0.564	3.534	1.76	0.98; 3.17	0.060	0.085
Educación (Secundaria)	-0.711	7.066	0.49	0.29; 0.83	0.008	0.008
Residencia (Norte)	-1.381	19.241	0.25	0.14; 0.47	0.000	0.000
Residencia (Ladera)	-1.653	20.31	0.19	0.09; 0.39	0.000	0.000
Consumo alcohol (Bajo)	0.845	3.619	2.33	0.98; 5.56	0.057	0.080

*A partir de un modelo de regresión logística multivariado con edad, género, estrato, hacinamiento, educación, situación laboral, residencia, ejercicio, historia de tabaquismo, consumo de cigarrillo, consumo alcohol, IMC y presencia cicatriz BCG.

B: Remuestreado para 5000 simulaciones; Bp: p valor del remuestreo

4.3 DISCUSIÓN

4.3.1 Prevalencia de LTBI en población general

Estudios realizados principalmente en trabajadores de salud han mostrado diferentes factores de riesgo asociados con el desarrollo de TB en centros de salud (168-170). Sin embargo, los factores de riesgo asociados con la adquisición de LTBI en población general rara vez se informan, y estudios de este tipo son escasos (171-174). Este es el primer estudio que evalúa la prevalencia de tuberculosis latente, y los factores asociados en población general en Colombia, utilizando dos umbrales para clasificar la positividad a la PPD. Inicialmente, se empleó un punto de corte ≥ 10 mm como principal criterio para definir la positividad a la infección por *M. tuberculosis* siguiendo las directrices del CDC (47), y se encontró una prevalencia de LTBI del 25.3 % menor comparada con la prevalencia reportada en estudios previos realizados en pacientes de una unidad de trauma (38 %) (175), y trabajadores de salud de nivel I (36.8 %) (176) de la ciudad. Este último un grupo de riesgo para LTBI por su exposición ocupacional a *M. tuberculosis* (168, 177). En comparación con estudios de base poblacional, la prevalencia de LTBI observada en este estudio fue menor a la notificada en población fuente de Medellín-Colombia (42.7 %) (159), y en comunidades urbanas informales de Lima-Perú (52 %) (173) y Johannesburgo-Sudáfrica (34.3 %) (174), pero mayor a la prevalencia estimada para la región de las Américas (11 %) (46), y la de otros países con alta incidencia

de TB como China donde se reportó una prevalencia del 20 % en adultos de un área rural (171), y Singapur donde se encontró una prevalencia de 12.7 % para residentes del área urbana (172), empleando en los dos últimos estudios ensayos de liberación de IFN- γ (IGRA). Estas observaciones sugieren que la prevalencia de LTBI en asentamientos urbanos es alta y variable. Las diferencias encontradas con respecto a otros estudios pueden ser explicadas parcialmente por el tipo de población, este estudio incluyó participantes sin enfermedades crónicas de base que puedan predisponer a la infección, y la mayoría pertenecían a un estrato socioeconómico 2 (bajo) y 3 (medio-bajo).

Pese a que la PPD se ha utilizado tradicionalmente para el diagnóstico de LTBI en diferentes poblaciones alrededor del mundo (170, 178, 179), varios estudios sugieren que la PPD puede sobreestimar la prevalencia de LTBI dada su baja especificidad, y reactividad cruzada con la vacuna BCG y micobacterias no tuberculosas ambientales (171, 177-180). Razones por las cuales los ensayos de liberación de IFN- γ suelen ser preferidos para evaluar el estado LTBI (170, 171). No obstante, los IGRAs también presentan limitaciones (47, 181, 182). De hecho, en áreas con alta prevalencia de TB, la sensibilidad del IGRA no ha mostrado superioridad sobre el PPD (183). En general, ambas pruebas son imperfectas (47, 180, 184) porque requieren una respuesta inmunitaria competente para identificar personas infectadas por *M. tuberculosis* y tienen limitaciones para predecir la progresión a enfermedad activa (47, 179). Por lo tanto, la ausencia de un método estándar de oro para el diagnóstico directo de LTBI, dificulta la evaluación precisa de la prevalencia de LTBI en poblaciones de interés, y la medición del desempeño de estas pruebas en términos de sensibilidad y especificidad (180). Un buen uso de los ensayos existentes es crucial hasta que se desarrolle una prueba más específica y altamente predictiva (165).

Considerando un posible efecto de la vacunación BCG sobre la especificidad de la PPD, un umbral más alto fue usado (≥ 15 mm) mostrando una prevalencia de 13.2 % que coincide con la prevalencia de LTBI encontrada por Yap *et al* (172) en residentes de Singapur usando QuantiFERON-TB Gold en tubo (QFT-GIT). El uso de un punto de corte más alto como PPD-15 en algunos estudios ha mostrado una mayor probabilidad para detectar la infección por *M. tuberculosis* (185), y es un predictor de progresión a enfermedad activa comparable con los ensayos de liberación de IFN- γ (165). Observaciones que concuerdan con los hallazgos de Kargi *et al* (178) quien mostró que el diámetro promedio de la PPD en individuos QFT-GIT negativo fue 11 mm mientras en individuos QFT-GIT positivo fue 15.4 mm. En el presente estudio se piensa que el efecto de la vacunación fue mínimo o nulo porque en Colombia esta vacuna se administra en dosis única al nacer y como se ha demostrado previamente su efecto sobre el resultado de la PPD disminuye después de 15 años (185), y el 82 % de los participantes tenía más de 30 años. No se encontró ninguna asociación entre la ausencia de cicatriz BCG y la positividad para PPD, esta observación concuerda con lo informado en otros estudios

desarrollados en Sudáfrica un entorno de alta carga de TB donde la BCG es suministrada al nacer, y la PPD se realiza más de 10 años después (186, 187).

4.3.2 Factores asociados con positividad PPD-10

Usando un umbral PPD-10, se encontró que la edad, el género masculino, estar laboralmente activo, y un bajo consumo de alcohol incrementaron la oportunidad de presentar LTBI, mientras residir en la zona norte o de ladera de la ciudad la disminuyeron. Un gran número de los casos de TB activa informados en Cali, se encuentran en la zona centro (comunas 9 y 11) un área que se caracteriza por albergar población vulnerable en condiciones de hacinamiento, desnutrición, y consumo de drogas, razón por la cual residir en zonas distantes a este punto reduce la oportunidad de presentar LTBI. Por otra parte, los datos indican que, a partir de los 30 años, la posibilidad de presentar LTBI incrementa significativamente comparado con la categoría de edad 14-19 años. Coincidiendo con otros estudios donde informan una alta prevalencia de LTBI con la edad avanzada (168, 171, 172, 188, 189). Se desconoce si el incremento en la edad es el factor de riesgo para adquirir LTBI (189) o probablemente el aumento en la edad a partir de los 30-39 años refleja una exposición acumulada a personas con TB activa dentro de la comunidad permitiendo desarrollar una respuesta inmune detectable frente la infección por *M. tuberculosis* (168, 177, 188).

Se encontró que la prevalencia de LTBI en hombres fue significativamente mayor en comparación con las mujeres en especial entre los 40-49 años. Un hallazgo que coincide con lo evidenciado por Chen *et al* (171) en población rural de China, y con estudios comunitarios en Sudáfrica (174) y Perú (173), mostrando diferencias epidemiológicas reales basadas en el sexo para la prevalencia de LTBI. Las razones de este fenómeno son inciertas debido a la falta de estudios sobre diferencias de género en pacientes con LTBI. Pero concuerda con la proporción (2:1) entre hombres y mujeres observada en estudios epidemiológicos de TB (190). Una posible explicación es que una gran proporción de las mujeres permanecen en el hogar, y tienen menos probabilidades de exposición en comparación con los hombres que tienen responsabilidades sociales más activas (188, 191). Existe una creciente evidencia acerca del papel de la interacción social en la transmisión de la tuberculosis (192-194). En apoyo de esta hipótesis, 63 % de las mujeres en este estudio se encontraban en condición de desempleo mientras el 73 % de los hombres laboraba. Otra posibilidad es una susceptibilidad diferencial a la infección por *M. tuberculosis* o respuesta de hipersensibilidad retardada dependiente del género (195). Aunque, se esperaba que el desempleo, un marcador de marginación y nivel socioeconómico bajo se asociara con un mayor riesgo de positividad a la PPD. Los datos sugieren lo contrario, ser trabajador se asoció con un incremento en la oportunidad de presentar LTBI. Una posible explicación es que la transmisión de *M. tuberculosis* está ocurriendo en espacios en donde la población que labora está expuesta por ejemplo el transporte público, el cual es hacinado y con poca ventilación, aumentando la posibilidad de adquirir la infección por *M. tuberculosis*

entre las personas que utilizan diariamente este medio de transporte para recorrer largas distancias a su trabajo y están expuestos de forma repetida (196).

En este trabajo los resultados revelan un incremento en la oportunidad de presentar un resultado positivo a la PPD en individuos con bajo consumo de alcohol (50-100 mL 1 vez/semana) en comparación con los no bebedores. Aunque el consumo de alcohol es socialmente aceptable, puede llevar a dependencia (197). Numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* ha evidenciado que la ingesta de alcohol dependiente en gran medida de la cantidad consumida se asocia con un deterioro del sistema inmune aumentando la susceptibilidad a infecciones respiratorias como neumonía y tuberculosis, como también a la reactivación de la enfermedad latente (197-199). La exposición aguda y crónica al alcohol altera la respuesta inmune mediante múltiples mecanismos: 1) inhibe la fagocitosis por los macrófagos (200), 2) suprime la generación de especies reactivas del oxígeno dentro del macrófago (201, 202), 3) inhibe la producción del factor de inhibición de la migración (MIF) producido por linfocitos T que promueve acumulación de macrófagos en el sitio de la infección (203), 4) suprime la capacidad de los macrófagos para producir citocinas (TNF- α , IL-1 β , e IL-6) que desempeñan un papel clave en la comunicación celular, activación, proliferación y migración (204, 205), 5) inhibe la expresión de receptores de reconocimiento de patrones moleculares como receptores tipo Toll (206), 6) inhibe la capacidad de los macrófagos para presentar antígenos micobacterianos a los linfocitos T (204), y 7) reduce la activación de los linfocitos T antígeno-específico comprometiendo la respuesta inmune proinflamatoria (Th1), y alterando el equilibrio Th1/Th2 (207) lo que en conjunto favorece la supervivencia y el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* en el pulmón. Adicionalmente, el metabolismo oxidativo del alcohol lleva a la formación de acetaldehído, un compuesto con características mutagénicas (208) y carcinogénicas para el hospedero (209).

La relación entre bajos niveles de consumo de alcohol y el riesgo de LTBI y TB sigue sin aclarar. Soh *et al* (210) en un reciente estudio en una cohorte de adultos chinos de mediana y avanzada de edad, encontró que la ingesta de alcohol en bajas dosis (frecuencia mensual a semanal) se asoció con un menor riesgo de desarrollar TB activa en comparación con los no bebedores, pero su observación solo se limitó a no-fumadores. En contraste, en fumadores activos el consumo de alcohol en bajos niveles no mostró ningún efecto protector para el desarrollo de TB, pero la ingesta de dos o más copas por día actuó sinérgicamente con el consumo de cigarrillo incrementando el riesgo. Igualmente, Narasimhan *et al* (211) en un estudio de contactos domiciliarios y comunitarios en la India, observó que el género masculino, el consumo alcohol y el consumo de cigarrillo fueron factores de riesgo para la positividad a la PPD en el análisis bivariado, mientras en el análisis multivariado estas 3 variables no mostraron un efecto individual pero si conjunto sobre el incremento en el riesgo de LTBI [OR= 3.93, IC 95 % 1.3-11.9]. Estas investigaciones sugieren que el consumo de alcohol y cigarrillo están fuertemente correlacionados. En el presente estudio, se observó una baja proporción de individuos consumidores de cigarrillo (11.5 %) por lo que se descarta la influencia de este factor en los

hallazgos. El pequeño número de participantes con consumo de alcohol moderado y alto pudo dificultar las comparaciones entre las categorías ocultando cualquier posible asociación con la positividad a la PPD. Adicionalmente, estos individuos presentaron una baja tasa de positividad a la PPD. No se descarta que la falta de reactividad pueda estar relacionada a efectos inmunosupresores del alcohol.

La ingesta de alcohol como factor de riesgo para LTBI, es importante desde una perspectiva de salud pública por ser un factor de riesgo modificable. Se estima que 10 % de todos los casos de tuberculosis en el mundo son atribuibles al consumo de alcohol (197), y aproximadamente 2.3 billones de la población mundial son bebedores actuales (212). Por tal razón, las estrategias para el control de la TB deben estar orientadas a prevenir la ingesta de alcohol en poblaciones de alto riesgo de tuberculosis.

4.3.3 Factores asociados con positividad PPD-15

Cuando se incrementó el umbral (PPD-15) para descartar cualquier posible efecto de la vacunación BCG, se encontraron resultados similares a los observados al emplear un punto de corte ≥ 10 mm. El género masculino y un bajo consumo de alcohol incrementaron la oportunidad de presentar LTBI. Mientras residir en la zona norte o de ladera de la ciudad y tener estudios de educación superior (secundaria) la disminuyeron dentro del modelo. La asociación entre un mayor nivel de educación y la reducción en la oportunidad de presentar LTBI puede ser explicada por una mejoría en la calidad de vida de los individuos, y concientización sobre los riesgos en salud dependientes de los hábitos de vida, reduciendo así su exposición a reconocidos factores de riesgo para TB como la pobreza, el hacinamiento, el consumo de cigarrillo, y la desnutrición (213). En apoyo de esta hipótesis, dentro de esta población estos factores no se asociaron con la positividad a la PPD. Estos hallazgos, coinciden con estudios previos de base poblacional conducidos en China (171), Singapur (172) y Sudáfrica (174).

Por otra parte, el diámetro promedio de la induración empleando un umbral PPD ≥ 10 mm y ≥ 15 mm fue de 16 mm y de 19.7 mm respectivamente, situándose por encima de los puntos de corte establecidos, permitiendo descartar cualquier posible efecto de la vacunación BCG o reactividad cruzada con micobacterias no tuberculosas sobre el diámetro de la induración (169). Esto sugiere que la positividad PPD ≥ 10 mm en la ciudad de Cali es una herramienta útil para confirmar la infección por *M. tuberculosis* concordando con las recomendaciones del CDC (59), mientras la positividad PPD ≥ 15 mm puede emplearse como indicador de riesgo aumentado para el desarrollo de TB en individuos asintomáticos (214).

Varios estudios apoyan esta recomendación, Morán-Mendoza *et al* (215) en un estudio de cohorte de base poblacional en ocho provincias de Columbia Británica evaluó el riesgo de desarrollar TB en 26.542 contactos de casos con TB por 12 años de seguimiento, encontrando que los contactos domiciliarios con una induración

PPD de 0-4 mm tuvieron una tasa de TB de 1014/100.000, aquellos con 5-9 mm tuvieron una tasa de TB de 2161/100.000 y los que tenían 10-14 mm tuvieron una tasa de TB de 4478/100.000. En contactos no domiciliarios y esporádicos el riesgo de desarrollar TB igualmente aumentó con el diámetro en la PPD. Cao *et al* (216) en otro estudio de cohorte en 67.292 estudiantes universitarios en Beijing, China durante un seguimiento de 2 años observó que los individuos con induraciones entre 5-9 mm, 10-14 mm, 15-20 mm y ≥ 20 mm en comparación con los individuos con induraciones de 0-4 mm presentaron un incremento en el riesgo de TB con HRs (Hazard ratio) de 1.09 [IC 95 % 0.25-4.85], 3.64 [IC 95 % 1.19-11.1], 6.83 [IC 95 % 2.44-19.1] y 9.77 [IC 95 % 2.20-43.3], respectivamente. Shero *et al* (217) en un estudio de corte transversal en población de Etiopía (incidencia TB: 164/100.000 habitantes) observó que el tamaño promedio de la induración en los controles comunitarios fue de 7.9 mm, mientras en contactos domiciliarios fue de 13.6 mm, y en pacientes con TB activa fue de 18.1 mm.

Por lo tanto, conforme el tamaño de la induración en la PPD aumente más allá del punto de corte (≥ 10 mm), la extensión del aumento debe tenerse en cuenta como un factor clave en la progresión a enfermedad tuberculosa, siendo relevante para decidir si se debe suministrar tratamiento preventivo.

4.3.4 Factores asociados con la induración en la prueba de tuberculina

El diámetro de la induración para la prueba de la tuberculina en el modelo lineal generalizado estuvo influenciado por el incremento en edad a partir de los 40 años, un nivel de educación superior, residir en la zona norte o de ladera, el consumo bajo de alcohol y un bajo IMC (<18.5 kg/m²). Coincidiendo con las variables previamente asociadas con la positividad a la PPD en los modelos de regresión logística para PPD-10 y PPD-15, excepto por la asociación con el IMC. Los resultados encontrados muestran una asociación negativa y significativa entre un bajo IMC y el diámetro de la PPD, explicando el bajo promedio de la induración PPD evidenciado en individuos delgados en comparación con los individuos con IMC normal, en sobrepeso u obesidad. Estos resultados contrastan con estudios previos en donde se ha observado que un bajo IMC está asociado con un aumento en la incidencia de TB activa (218), y es un importante factor de riesgo para el desarrollo de TB (219, 220). Mientras, el sobrepeso y la obesidad son factores protectores (218, 221, 222). No obstante, esta asociación inversa entre el IMC y el riesgo de TB representa una paradoja. Dado que el exceso de grasa afecta negativamente la función inmunológica del hospedero en individuos obesos (223). Adicionalmente, la acumulación de tejido adiposo puede atenuar la respuesta inmune en el pulmón del hospedero a través de trastornos metabólicos favoreciendo la infección por *M. tuberculosis* (224, 225).

La relación entre el IMC y el riesgo de infección tuberculosa latente no está bien descrita (171, 226). Varios estudios de base poblacional en áreas rurales de China han evidenciado que un IMC de sobrepeso (171), y obesidad (188) incrementa

significativamente el riesgo de LTBI. Estos estudios igualmente han evidenciado una asociación negativa más no significativa entre un bajo IMC y LTBI. Un comportamiento similar al observado en esta investigación, en donde se encontraron ORs crudos de 0.18 para PPD-10 y 0.35 para PPD-15. Reciente en un meta-análisis Saag *et al* (226) evaluó la asociación entre individuos con bajo IMC y la infección tuberculosa latente definida por la positividad en la PPD y el QFT-GIT. Un total de 15 publicaciones fueron consideradas, entre los estudios que emplearon la PPD, los individuos con bajo peso en comparación con los individuos de peso normal mostraron un OR combinado= 0.96 [IC 95 % 0.77-1.20]. Para los estudios que emplearon QFT-GIT, los individuos con bajo peso en comparación con los individuos de peso normal mostraron un OR combinado= 0.84 [IC 95 % 0.73-0.98], sugiriendo que los individuos con un bajo IMC no están en riesgo de infección por *M. tuberculosis*. Considerando que la desnutrición afecta la respuesta inmune celular, aumentando la susceptibilidad a distintas infecciones entre ellas la infección por *M. tuberculosis* (226, 227), es posible que también comprometa el desempeño del PPD y el IGRA llevando a un subdiagnóstico de la infección latente en individuos con bajo peso. No está claro si una única métrica como un bajo IMC es una herramienta adecuada para clasificar la desnutrición.

4.3.5 Limitaciones y fortalezas del estudio

Su naturaleza transversal no permitió establecer temporalidad o causalidad entre LTBI y los factores asociados. Los estrictos criterios de exclusión empleados impidieron evaluar el efecto de conocidos factores de riesgo para TB (contacto estrecho con pacientes TB, diabetes, y estado VIH) sobre la positividad a la PPD. Por lo que el objetivo de obtener una muestra representativa de la población general pudo no haberse alcanzado por completo. No obstante, una mejor respuesta inmune pudo proporcionar un resultado interpretable en la PPD. No se incluyeron participantes de otras zonas de la ciudad (Oriente y Sur) lo que implica un sesgo de selección, dado que las personas que viven en la zona oriental tienen un alto riesgo de TB. Al no existir un estándar de oro para la detección de LTBI, la estimación de su prevalencia podría estar afectada por el rendimiento de la PPD. Esta prueba fue seleccionada por su bajo costo en comparación con los IGRA, y por ser familiar para los profesionales en los entornos clínicos evaluados. Existe una posibilidad de clasificación errónea de los bebedores por un sesgo de autoreporte y la capacidad de recordar.

Como en todo estudio observacional, puede haber un efecto de confusión residual por factores desconocidos o no medidos en las asociaciones observadas. Pese a estas limitaciones, este estudio tiene un adecuado tamaño de muestra y poder estadístico, y es el primer estudio de base poblacional que evalúa la prevalencia de LTBI y factores asociados en Colombia, por lo que brinda información valiosa en un país con una carga intermedia de TB, donde la BCG se administra al nacer.

4.3.6 Conclusiones y recomendaciones

Los programas para el control de la TB en Colombia están orientados a la búsqueda de contactos y tratamiento de casos confirmados. Identificar los factores asociados con la adquisición de LTBI a nivel del hogar y comunitario es clave para el desarrollo de intervenciones eficientes dirigidas a la detección y tratamiento de los individuos con LTBI en riesgo de progresar a enfermedad activa. Actualmente, solo los individuos VIH-positivos, y niños menores de 5 años con tuberculosis latente reciben tratamiento profiláctico (166). Se necesita un enfoque más agresivo si el objetivo de eliminar la TB para el 2035 quiere ser alcanzado (46).

En conclusión, la prevalencia de LTBI en la población de estudio, sin comorbilidades asociadas y medida empleando dos diferentes umbrales PPD (≥ 10 mm y ≥ 15 mm) fue moderada (25.3 % y 13.2 %, respectivamente), reflejando una importante carga de tuberculosis y la transmisión continua de *M. tuberculosis* en la comunidad. Varios factores tradicionalmente asociados con tuberculosis (edad, nivel de educación, género, situación laboral, IMC y consumo de alcohol) mostraron asociación con la positividad e induración a la PPD en los tres modelos multivariados empleados. Inesperadamente, un bajo IMC (< 18.5 kg/m²) mostró una asociación negativa y significativa con el diámetro de la induración a la PPD, y la prevalencia de LTBI en individuos con bajo peso fue baja. Contrastando con los estudios que han evidenciado un incremento en el riesgo de TB entre individuos con bajo peso.

Por tal razón, se requiere un estudio longitudinal con un tamaño de muestra representativo para la población de Cali que considere todas las zonas de la ciudad, el consumo de alcohol de acuerdo a la frecuencia y volumen ingerido, el hacinamiento en el transporte público masivo según el tiempo de exposición y la frecuencia de uso, y empleé una medida alterna al IMC para clasificar la malnutrición, esto permitirá validar los hallazgos del estudio actual e identificar otros factores de riesgo asociados con LTBI. Igualmente, es necesario estimar el valor predictivo de la PPD-10 y PPD-15 en comparación con los IGRAs para el desarrollo de TB en los grupos de riesgo identificados. Dado que la vacunación BCG no confiere protección contra la infección tuberculosa en adultos, y gran parte de las personas que desarrollan tuberculosis en Colombia están vacunadas. La identificación comunitaria de grupos de alto riesgo y el tratamiento profiláctico de LTBI para prevenir la progresión a TB podría constituir una estrategia costo-efectiva de gran impacto en la ciudad de Cali.

5 CAPÍTULO 2. PREVALENCIA DE COINFECCIÓN POR *H. pylori* ENTRE INDIVIDUOS CON INFECCIÓN TUBERCULOSA LATENTE Y FACTORES ASOCIADOS CON ATROFIA GÁSTRICA

La infección gástrica por *H. pylori* es una de las infecciones más prevalentes que afecta a más del 50 % de la población mundial, y causa una gastritis crónica clínicamente asintomática en la mayoría de individuos infectados, así otros factores probablemente retrasan o promueven la progresión a través de un proceso de múltiples pasos desde una gastritis crónica hasta un adenocarcinoma gástrico. Con el objetivo de estimar la prevalencia de la coinfección por *H. pylori* en individuos con infección tuberculosa latente e identificar los factores asociados con el desarrollo de atrofia gástrica dentro de esta población, a 149 individuos con síntomas de dispepsia, positivos para LTBI, se les invitó a practicarse una endoscopia digestiva; 94 individuos en un rango de edad de 19-65 años se sometieron a endoscopia, las biopsias obtenidas fueron analizadas por histopatología y cultivo de *H. pylori*. La magnitud de las asociaciones fue evaluada mediante pruebas *U* de Mann-Whitney y modelos de regresión logística. La prevalencia de la coinfección por *H. pylori* en histología y cultivo fue 83 % y 61.6 %, respectivamente con una concordancia aceptable. La infección por *H. pylori* mostró una asociación positiva pero no significativa con los siguientes factores: residir en la zona norte, no realizar actividad física, y ausencia de cicatriz BCG. Se observó una baja prevalencia de atrofia (9.6 %), y se asoció significativamente con el incremento en la edad, el género masculino, el hacinamiento, un bajo consumo de alcohol, sobrepeso, y antecedentes de cáncer gástrico familiar. La presencia de *H. pylori*, su densidad y la inflamación asociada no mostraron asociación con el desarrollo de atrofia. Estos hallazgos sugieren que hay una alta prevalencia de *H. pylori* implicando una transmisión continua dentro de la población. Sin embargo, la prevalencia de lesiones precursoras de cáncer gástrico es baja. Los factores ambientales, y del hospedero parecen jugar un papel clave en el riesgo de atrofia gástrica. Esto podría estar reflejando los efectos negativos del estilo de vida sobre la salud, siendo los hombres mayores (≥ 40 años) con un bajo consumo de alcohol, y con sobrepeso un grupo de riesgo a priorizar para la detección temprana de lesiones preneoplásicas.

5.1 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.1 Población de estudio

A los 149 individuos que presentaron infección tuberculosa latente bajo un umbral PPD-10, el médico tratante les interrogó por la presencia de síntomas de dispepsia, y se les invitó a practicarse una endoscopia digestiva como conducta diagnóstica y preventiva. Se excluyeron los participantes con gastrectomía previa, consumo de antagonistas del receptor- H_2 , inhibidores de bomba de protones, o consumo de antibióticos durante las últimas 4 semanas previo a la toma de la endoscopia. Bajo estos criterios 94 individuos (**Figura 9**), 78.7 % mujeres en un rango de edad de 19-65 años proporcionaron un segundo consentimiento informado (**Anexo 5**) y continuaron en el estudio.

5.1.2 Procedimiento de endoscopia y toma de biopsia gástrica

La endoscopia de vías digestivas superiores fue realizada por un gastroenterólogo con amplia experiencia, una vez autorizada la remisión al Hospital Universitario del Valle (HUV). Durante el procedimiento de endoscopia por cada paciente se tomaron 10 biopsias de mucosa gástrica de acuerdo al siguiente protocolo: Dos muestras de antro curvatura menor y mayor, y una de cuerpo curvatura mayor, fueron inoculadas en tioglicolato con glicerol al 20 %, y se utilizaron para el aislamiento primario de *H. pylori* y estudios moleculares posteriores. Otras cuatro muestras, dos de antro y dos de cuerpo fueron depositadas en formol al 10 % y se emplearon para diagnóstico histopatológico. Dos muestras una de antro y otra de cuerpo curvatura menor fueron colectadas en solución RNAlater para futuros estudios de expresión de ARNm, y finalmente otra muestra de antro curvatura menor se inoculó en tioglicolato con glicerol al 20 % (**Figura 11**). Las muestras fueron rotuladas con un código único de identificación por paciente. La limpieza y esterilización del endoscopio se realizó de acuerdo a las normas de la Sociedad Colombiana de Gastroenterología. Finalmente, todas las muestras en tioglicolato y RNAlater fueron enviadas en hielo seco al Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle para su preservación a -70°C.

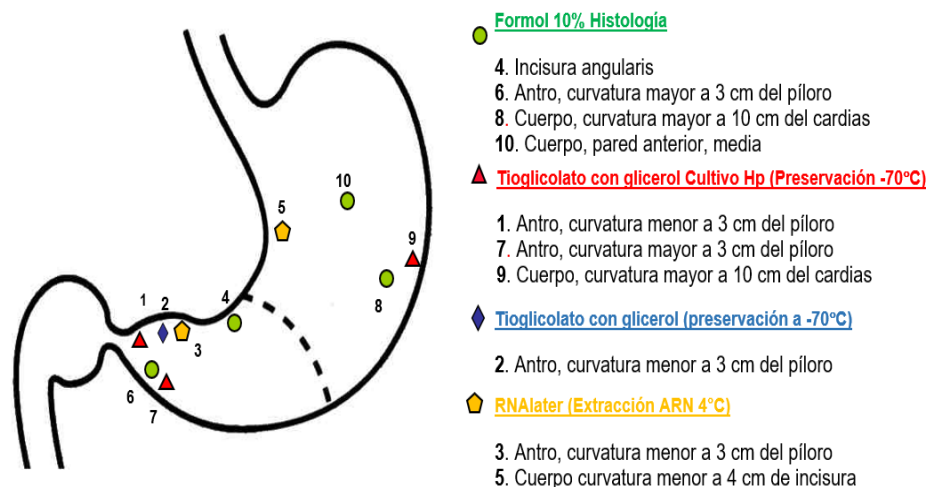


Figura 11. Topografía de los sitios anatómicos de toma de biopsias gástricas.

5.1.3 Evaluación de la infección por *H. pylori*

La infección por *H. pylori* se evaluó por tinción modificada de Giemsa en secciones histológicas, cultivo y pruebas bioquímicas para la actividad ureasa, catalasa y oxidasa. Los participantes fueron considerados *H. pylori*-positivos si en la histología se evidenció la bacteria o al menos dos de las otras pruebas fueron positivas, y se consideró *H. pylori*-negativo cuando dos o más pruebas fueron negativas.

5.1.3.1 Tratamiento e inclusión de biopsias gástricas

Las cuatro muestras de mucosa gástrica por cada participante (una de antro, una de incisura angularis y dos de cuerpo) depositadas en formol al 10 %, fueron procesadas siguiendo un protocolo previamente estandarizado. En primer lugar, se procedió a su fijación en formol en solución tampón por aproximadamente 24 horas, posteriormente, las muestras se retiraron del formol, y se envolvieron en papel filtro sin presionar el tejido y luego se colocaron en una canastilla previamente rotulada con lápiz de carbón que contenía el código, fecha y número de la biopsia. La deshidratación posterior de las muestras consistió en una fijación en 9 alcoholes y 2 parafinas a 56°C, este procedimiento se realizó por un periodo de 30 minutos para cada etapa. Al término de la primera parafina, las canastillas fueron retiradas, y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las biopsias pre-tratadas fueron posteriormente embebidas en la segunda parafina por un histólogo experimentado, quien realizó cortes histológicos que fueron teñidos con hematoxilina y eosina para histología regular, y con tinción modificada de Giemsa para detección de *H. pylori*.

5.1.3.2 Análisis histopatológico

El diagnóstico histopatológico para cada participante fue evaluado por un patólogo con experiencia en biopsias de antro, incisura angularis y cuerpo gástrico teñidas en hematoxilina y eosina de acuerdo con el sistema de clasificación de Sydney para

gastritis (228), y la clasificación de Padova para displasia (229). El diagnóstico global fue puntuado en una escala ordinal de 1 a 6 así: 1) gastritis no atrófica leve o moderada (normal); 2) gastritis no atrófica severa (GNA), 3) gastritis atrófica multifocal sin metaplasia intestinal (GAM), 4) metaplasia intestinal (MI), 5) displasia, 6) cáncer gástrico. Estas dos últimas fueron consideradas como las lesiones más severas. La lesión más avanzada observada en el conjunto de biopsias de un individuo fue considerada para el diagnóstico histológico final.

La densidad de *H. pylori* en la mucosa gástrica y la inflamación crónica asociada con la infección se clasificó en diferentes categorías. La densidad bacteriana se consideró escasa (bacterias dispersas cubriendo menos de un tercio de la superficie), moderada (bacterias presentes en muchos campos, pero no en todos), o abundante (grandes agrupaciones bacterianas o una capa continua presente en todos los campos), observaciones realizadas en un objetivo de 40X. El número normal de células mononucleares de mucosa gástrica presentes en la lámina propia fue definido como un máximo de 2 a 5 linfocitos, células plasmáticas y macrófagos por campo en el objetivo de 40X. La inflamación crónica leve fue definida como un leve aumento en la infiltración inflamatoria con predominio de células plasmáticas dentro de la lámina propia en una distribución por parches, y sin destrucción ni daño del epitelio usando un objetivo 10X para identificar agrupaciones de células mononucleares. La inflamación severa (marcada) fue definida como una densa infiltración de linfocitos dentro de la lámina propia con o sin folículos linfoides identificables en un objetivo de 4X, y destrucción del epitelio. El estado intermedio fue definido como inflamación moderada.

5.1.3.2.1 Sistema de puntuación histopatológico de Correa

Se empleó un sistema detallado de puntuación histopatológica para cuantificar las diferencias en las variables morfológicas dentro de cada categoría del diagnóstico global, el cual ha mostrado ser un sistema sensible y confiable en un seguimiento a largo plazo de pacientes tratados por infección por *H. pylori* (230). Basado en las categorías de diagnóstico histológico descritas anteriormente (codificadas de 1 a 6), la puntuación de Correa asigna valores numéricos a los diversos niveles de extensión, tipo y grado de las lesiones precancerosas GAM, MI y displasia (231). Se utilizó este sistema porque el aumento de la severidad de la atrofia gástrica se asocia con un mayor riesgo de cáncer, el tipo incompleto de metaplasia intestinal (MI) conlleva un mayor riesgo que el tipo completo, y el grado histológico de displasia se correlaciona con el riesgo de cáncer gástrico (230). El puntaje para GAM (3) fue modificado usando una escala continua: indefinido para atrofia (0.25), leve (0.5), moderada (0.75) y severa (1.0) resultando en puntuaciones de 3.25 a 4.0. La puntuación para MI (4) se modificó según el tipo y la extensión. El tipo de MI se clasificó en cuatro categorías en una escala ordinal: tipo completo (0.1), mixta de predominio tipo completo (0.2), mixta de predominio tipo incompleto (0.3) y tipo incompleto (colónico) (0.4). La extensión promedio del MI (número de biopsias con MI/número total de biopsias) se agrupó por terciles. A cada tercio se le asignó un

valor: 0.2, 0.4 o 0.6, respectivamente. Para obtener una puntuación total de MI, se agregaron los valores de tipo y extensión a la puntuación original de MI (4) resultando en puntuaciones que van desde 4.3 a 5.0. El puntaje para displasia (5) se modificó utilizando una escala continua: indefinida (0.25), bajo grado (0.50) y alto grado (0.75). Esta puntuación histopatológica graduada, más no el diagnóstico global, se utilizó para los análisis estadísticos.

5.1.3.3 Tratamiento para la infección por *H. pylori*

Como parte del compromiso social adquirido, todos los pacientes positivos para la infección con *H. pylori* según diagnóstico histológico, se les suministró tratamiento anti-*H.pylori* de primera línea con claritromicina (MK®, Colombia) 500 mg, amoxicilina (MK®, Colombia) 1000 mg y omeprazol (MK®, Colombia) 20 mg, dos veces al día por 14 días siguiendo las guías del consenso Maastricht V (232).

5.1.3.4 Análisis microbiológicos

5.1.3.4.1 Cultivo y aislamiento primario de *H. pylori* a partir de biopsia

De los 3 fragmentos de mucosa gástrica obtenidos por paciente para el aislamiento primario, inicialmente se trabajó con la biopsia No.1 de antro curvatura menor, en los casos donde no se evidenció crecimiento o fue muy escaso, se procedió a utilizar la biopsia No.7 antro curvatura mayor para un nuevo intento de aislamiento de *H. pylori*. Sí no se obtuvo aislamiento de esta muestra, se empleó la biopsia No.9 de cuerpo gástrico. Estudios previos realizados por el grupo de investigación han permitido observar que la detección de *H. pylori* mediante cultivo, es dependiente del número de biopsias y sitio anatómico evaluado (233, 234). La mayor frecuencia de aislamiento se ha observado a partir de fragmentos de antro, específicamente curvatura menor (Comunicación personal Dr. Álvaro Pazos Moncayo).

Los fragmentos de mucosa gástrica de antro y cuerpo fueron homogenizados completamente bajo condiciones estériles en 200 µL de solución salina estéril 0.89 % usando un homogenizador (Kimble-Kontes, Vineland, NJ, USA). El homogenizado se sembró por estría con asa de argolla (Fisher Brand®) calibrada a 10 µL/gota en agar Columbia (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) con sangre desfibrinada de cordero al 7 % más suplemento selectivo para *Helicobacter pylori* (Dent) conteniendo Vancomicina (10 mg/L), Cefsulodina de sodio (5 mg/L), Lactato de Trimetoprim (5 mg/L) y Anfotericina B (5 mg/L) (Oxoid Ltd, Hampshire, England), luego de la siembra se preservó el macerado en una solución de tioglicolato (BBL®) con glicerol al 20 % (Merck®), y se congeló en un freezer a -70°C. Las cajas de agar se incubaron bajo condiciones microaerófilas (6 % O₂, 6 % CO₂, 88 % N₂, usando CampyPak Plus (BBL, Nashville, TN, USA) a 37°C de 4 a 8 días hasta observar pequeñas colonias grises y translúcidas compatibles con *H. pylori*.

5.1.3.4.2 Purificación de los aislados de *H. pylori*

Las colonias típicas para *H. pylori* fueron subcultivadas por agotamiento en agar Columbia (Oxoid Ltd, Hampshire, England) con sangre desfibrinada de cordero al 7 %, sin suplemento selectivo, y se incubaron en condiciones similares a las descritas anteriormente, para lograr cultivos axénicos antes del proceso de identificación fenotípica.

5.1.3.4.3 Identificación microscópica y bioquímica de *H. pylori*

Las colonias pequeñas, traslúcidas y con apariencia de gotas de rocío que crecieron en agar Columbia fueron posteriormente identificadas como *H. pylori* mediante su morfología en tinción de Gram y análisis bioquímicos para la actividad oxidasa, catalasa y ureasa.

Prueba de la oxidasa

Para esta prueba se emplearon tiras de oxidasa (Oxoid Ltd, Hampshire, England) que se colocaron en contacto con un inóculo bacteriano, la positividad de la reacción se evidenció por formación de un complejo púrpura que indicó la oxidación de la N, N-Dimetil-p-fenilendiamina por parte de la citocromo oxidasa.

Prueba de la catalasa

Para esta prueba se tomó una colonia bacteriana y se extendió sobre un portaobjetos, posteriormente se adicionaron 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 30 % (J.T Baker®). La positividad de la prueba se observó por formación de burbujas, producto de la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua.

Prueba de la ureasa

Para evaluar la presencia de la ureasa bacteriana, se tomó una colonia única con un asa de argolla y se colocó dentro de un tubo de 1.5 mL que contenía una solución de urea al 10 % con rojo de fenol 0.1 %. La reacción se evidenció por un incremento del pH de la solución producto de la hidrólisis de la urea a amonio y dióxido de carbono.

5.1.3.4.4 Preservación de los aislados de *H. pylori*

A partir de cada aislado de *H. pylori* obtenido, se tomaron colonias únicas con un asa estéril y se transfirieron a un tubo criogénico (Corning®) con 800 µL de caldo tioglicolato (BBL®), al que se adicionaron 200 µL de glicerol (Merck®). Los viales se agitaron para lograr su homogenización, y se almacenaron a -70°C para su conservación y uso en estudios posteriores.

5.1.4 Toma de muestras sanguíneas

Se extrajo en una sola toma de cada participante, sangre venosa periférica por venopunción que fue colectada en tubos BD vacutainer® con activador de la coagulación y tubos BD vacutainer® con EDTA para la obtención de suero y sangre anticoagulada, respectivamente. El volumen de sangre a extraer considerando la edad y peso del individuo fue de 20 mL en adolescentes mayores de 14 años y adultos, estos valores no exceden el 1 % del volumen sanguíneo completo de un individuo sano, evitando de esta forma cualquier alteración de los valores del hematocrito (235). Las muestras debidamente rotuladas fueron enviadas al laboratorio, en donde se sometieron a centrifugación a 1200 rpm/10 minutos a temperatura ambiente. El suero y el plasma obtenidos se almacenaron a -80°C. La fase celular, que permaneció posterior a la recuperación del plasma se empleó para la obtención de células mononucleares de sangre periférica (por sus siglas en inglés PBMC).

5.1.5 ELISA cuantitativo para TNF- α

El TNF- α fue medido en suero como un biomarcador inflamatorio empleando un kit de ELISA comercial (KHC3011, Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Inicialmente, se adicionaron 50 μ L de la solución de incubación a todos los pozos de la microplaca, a excepción de los pozos para el blanco del cromógeno. Luego, se adicionaron 100 μ L de la solución para dilución de estándares a los pozos para el blanco. Diluciones seriadas (1:2) de un estándar de TNF- α de 1000 pg/mL se emplearon para crear una curva estándar de 7 puntos con el límite inferior a 15.6 pg/mL. A continuación, 100 μ L de los estándares, muestras, y controles fueron adicionados a los pozos respectivos. La microplaca se agitó brevemente, y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, los pozos fueron lavados con 400 μ L de solución de lavado, tres veces. Luego, 100 μ L de TNF- α humana conjugada con biotina fueron adicionados a cada pozo, excepto los pozos para el blanco del cromógeno seguido de una incubación por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con 400 μ L de solución de lavado. Después, la microplaca se invirtió y se secó. A continuación, se adicionaron 100 μ L de estreptavidina peroxidasa a los pozos excepto los pozos para el blanco del cromógeno, y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente, y nuevamente se repitieron los lavados. Luego se adicionaron 100 μ L de estabilizador de cromógeno (Tetrametilbenzidina) a todos los pozos, y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Finalmente, 100 μ L de solución de parada fue adicionado a todos los pozos, y se midió la absorbancia de cada pozo empleando un lector de ELISA (Stat Fax-2100, Awareness Technology INC, Estados Unidos) con un filtro de 450 nm. A la absorbancia obtenida en cada pozo conteniendo estándares, muestras y controles, se sustrajo la absorbancia de fondo, y a partir de las absorbancias obtenidas para los estándares, se realizó una regresión lineal considerando una ponderación $1/Y^2$ que permitió interpolar a partir de las absorbancias obtenidas para las muestras su

correspondiente concentración de TNF- α en pg/mL. La cantidad mínima detectable de este ensayo es 1.7 pg/mL

5.1.6 Plan de análisis estadístico

Se realizó un análisis univariado, y se comprobó la normalidad de los datos cuantitativos (diámetro de la induración PPD, puntaje histopatológico, y niveles de TNF- α séricos) mediante la prueba de Shapiro-Wilk, encontrándose que no se distribuían en forma normal, por lo que se recurrió a la estadística no paramétrica. Durante el análisis bivariado para datos independientes, las variables continuas se describieron como promedios con su respectiva desviación estándar, y las variables categóricas como proporciones. Para estudiar la asociación entre las variables independientes (tipo de gastritis crónica, infección por *H. pylori* y densidad de *H. pylori*) con el diámetro de la induración PPD, el puntaje histopatológico y los niveles de TNF- α séricos (variables dependientes), se empleó la prueba *U* de Mann-Whitney o una ANOVA de Kruskal-Wallis. Además, se realizaron comparaciones múltiples para la variable (densidad de *H. pylori*) empleando la prueba de Dunn sin ajustar los valores de significancia. Por otra parte, para estudiar las diferencias entre cada una de las variables independientes (demográficas, sociales y estilos de vida) y la presencia de coinfección por *H. pylori* o el tipo de gastritis crónica, se empleó una prueba de X^2 o una prueba exacta de Fisher con su correspondiente razón de ventajas (OR) y los intervalos de confianza al 95 %.

Una regresión logística bivariada se empleó para identificar los factores asociados con la coinfección por *H. pylori* y la presencia de gastritis atrófica. Partiendo de un modelo completo con todos los predictores potenciales, se empleó un método de eliminación por pasos hacia atrás (Backward: Wald), eliminando el factor menos significativo de uno en uno hasta que todos los factores restantes fueran significativos, los criterios de probabilidad empleados fueron (entrada $p \leq 0.05$, salida $p \geq 0.10$). Adicionalmente, se empleó el método (Introducir) para generar un modelo con solo los factores que mostraron una asociación positiva en el análisis bivariado acompañado de un análisis de remuestreo con reemplazo para 5000 muestras que permitió comparar las medidas de efecto obtenidas en el modelo original con el modelo remuestreado. Finalmente, para comparar el desempeño de los métodos empleados en la detección de *H. pylori* (histología y cultivo), se estimó el estadístico de Kappa, su interpretación se realizó según la escala sugerida por Landis & Koch, 1977 (3). La significancia estadística fue aceptada con un valor $p \leq 0.05$. El análisis de datos fue realizado con el paquete estadístico SPSS 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos) y GraphPad Prism 7 (GraphPad software Inc., San Diego, CA, Estados Unidos).

5.2 RESULTADOS

5.2.1 Características socio-demográficas y estilos de vida de la población sometida a endoscopia gástrica

De los 149 individuos con tuberculosis latente detectados mediante la aplicación de la PPD-10, el 63.1 % (94/149) cumplieron con los criterios de inclusión, y accedieron a practicarse una endoscopia. Como se observa en la **Tabla 10**, el 75.6 % de los participantes eran mayores de 40 años y la edad promedio fue de 46.5 ± 11.2 años. Las mujeres constituyeron el 78.7 % de la población total. La distribución de los individuos en los 3 niveles sociales evaluados fue homogénea (~30 %). La proporción de participantes en condiciones de hacinamiento fue baja 4.3 %. Más de la mitad de los participantes habían cursado estudios de secundaria (53.2 %), se encontraban laborando (54.3 %) y vivían en la zona norte de la ciudad (53.2 %). El 57.4 % no realiza actividad física regular y más de la mitad de la población evaluada presentó sobrepeso y obesidad (66 %). El 84.0 % de los participantes manifestó no tener antecedentes de tabaquismo o consumo actual de cigarrillo, el 81.9 % no consume alcohol y 61.7 % no consume sal. Como antecedentes clínicos, se observó que el 91.5 % de los individuos presentó la cicatriz BCG y 51 % presentaron induraciones PPD en el rango de 10-14 mm.

Tabla 10. Características socio-demográficas y estilos de vida en población tuberculosa latente sometida a endoscopia gástrica (n= 94)

Característica	N (%)	<i>H. pylori</i> + (n = 78)		<i>H. pylori</i> - (n = 16)		OR (IC 95 %)	p
		n	%	n	%		
Edad							
14-19	1 (1.1)	1	1.3	0	0.0	-----	*1.000
20-29	8 (8.5)	8	10.3	0	0.0	-----	*1.000
30-39	14 (14.9)	12	15.4	2	12.5	Referencia	
40-49	33 (35.1)	27	34.6	6	37.5	0.75 (0.13-4.27)	0.745
50-59	26 (27.7)	20	25.6	6	37.5	0.56 (0.09-3.21)	0.507
60-69	12 (12.8)	10	12.8	2	12.5	0.83 (0.09-7.03)	*1.000
Género							
Masculino	20 (21.3)	16	20.5	4	25.0	0.77 (0.22-2.72)	0.690
Femenino	74 (78.7)	62	79.5	12	75.0	Referencia	
Estrato							
1	36 (38.3)	30	38.5	6	37.5	0.93 (0.25-3.38)	0.907
2	26 (27.7)	21	26.9	5	31.3	0.78 (0.20-3.04)	0.718
3	32 (34.0)	27	34.6	5	31.3	Referencia	
Hacinamiento							
> 3 persona/cuarto	4 (4.3)	4	5.1	0	0.0	-----	*1.000
≤ 3 persona/cuarto	90 (95.7)	74	94.9	16	100	Referencia	
Educación							
Post-secundaria	10 (10.6)	8	10.3	2	12.5	0.75 (0.13-4.34)	0.754
Secundaria	40 (42.6)	33	42.3	7	43.8	0.89 (0.28-2.81)	0.845
Primaria	44 (46.8)	37	47.4	7	43.8	Referencia	

Situación Laboral							
Trabajador	51 (54.3)	41	52.6	10	62.5	0.66 (0.22-2.00)	0.467
Desempleado	43 (45.7)	37	47.4	6	37.5	Referencia	
Residencia							
Zona Norte	50 (53.2)	46	59.0	4	25.0	3.14 (0.61-16.0)	0.155
Zona Ladera	30 (31.9)	21	26.9	9	56.3	0.63 (0.14-2.84)	0.552
Zona Centro	14 (14.9)	11	14.1	3	18.7	Referencia	
Ejercicio							
No	54 (57.4)	46	59.0	8	50.0	1.44 (0.49-4.23)	0.508
Si	40 (42.6)	32	41.0	8	50.0	Referencia	
Historia de tabaquismo							
Si	15 (16.0)	11	14.1	4	25.0	0.49 (0.13-1.81)	0.278
No	79 (84.0)	67	85.9	12	75.0	Referencia	
Consumo cigarrillo							
Si	12 (12.8)	10	12.8	2	12.5	1.03 (0.20-5.22)	0.972
No	82 (87.2)	68	87.2	14	87.5	Referencia	
Consumo alcohol							
Alto	1 (1.1)	1	1.3	0	0.0	-----	*1.000
Moderado	5 (5.3)	5	6.4	0	0.0	-----	*0.582
Bajo	11 (11.7)	9	11.5	2	12.5	1.00 (0.19-5.15)	1.000
No consumo	77 (81.9)	63	80.8	14	87.5	Referencia	
Consumo de sal							
Siempre	21 (22.3)	17	21.8	4	25.0	0.68 (0.18-255)	0.565
Algunas veces	15 (16.0)	11	14.1	4	25.0	0.44 (0.11-1.73)	0.230
No consumo	58 (61.7)	50	64.1	8	50.0	Referencia	
IMC (kg/m²)							
≥18.5 a 24.9	32 (34.0)	28	35.9	4	25.0	Referencia	
≥25 a 30	40 (42.6)	34	43.6	6	37.5	0.81 (0.21-3.16)	0.761
≥30	22 (23.4)	16	20.5	6	37.5	0.38 (0.09-1.55)	0.170
Cicatriz BCG							
No	8 (8.5)	7	9.0	1	6.3	1.48 (0.17-12.9)	0.722
Si	86 (91.5)	71	91.0	15	93.8	Referencia	
PPD induración							
≥15 mm	45 (47.9)	37	47.4	8	50.0	0.90 (0.31-2.65)	0.852
≥10-14 mm	49 (52.1)	41	52.6	8	50.0	Referencia	

*Valor *p* fue calculado a partir de una prueba exacta de Fisher.

5.2.2 Prevalencia de la infección crónica por *H. pylori*

La prevalencia global de infección por *H. pylori* por histología en la subpoblación con LTBI evaluada fue 83 % (78/94). La mayor prevalencia de la infección (34.6 %) se observó en el rango de edad de 40-49 años. La prevalencia de *H. pylori* fue mayor en mujeres (79.5 %) (**Tabla 10**). No obstante, cuando se evaluó la distribución de prevalencia de la infección entre hombres y mujeres por grupos de edad, se observó una prevalencia de *H. pylori* elevada y sostenida para ambos géneros (**Figura 12**), sin diferencias significativas (**Tabla 11**). La prevalencia de la infección fue mayor en

individuos pertenecientes al estrato 1 (38.5 %) y sin condiciones de hacinamiento (94.9 %). La población con un nivel educativo de primaria presentó una mayor prevalencia de *H. pylori* (47.4 %). Así mismo, los trabajadores presentaron una mayor prevalencia de *H. pylori* (52.6 %). Al evaluar la prevalencia de *H. pylori* por zonas, se evidenció que la zona norte presentó una elevada prevalencia (59.0 %). La prevalencia de *H. pylori* también fue mayor en individuos quienes no realizaban actividad física regular (59 %), y están en sobrepeso (43.6 %). Por el contrario, los individuos sin antecedentes de tabaquismo, y sin consumo de cigarrillo, alcohol y sal mostraron una alta prevalencia de infección (>60 %). Finalmente, se observó una prevalencia del 91.0 % en individuos vacunados con BCG, y 52.6 % en individuos con induración entre 10-14 mm en la prueba de la tuberculina.

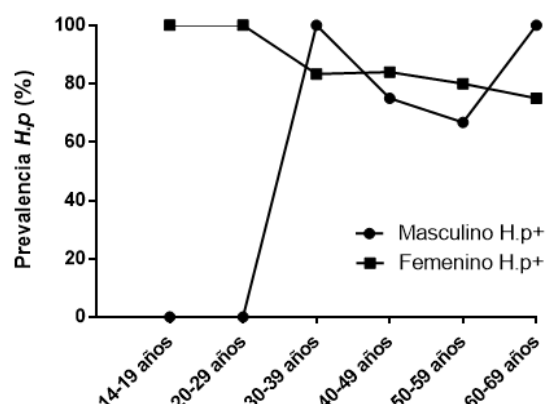


Figura 12. Tendencia en la prevalencia de *H. pylori* según la edad en la población con tuberculosis latente estratificada por sexo.

Tabla 11. Diferencias en la prevalencia de infección por *H. pylori* entre hombres y mujeres por grupos de edad.

Edad	Masculino			Femenino			OR (95 % CI)	p
	N	<i>H. pylori</i> + n	%	N	<i>H. pylori</i> + n	%		
14-19	0	0	--	1	1	100	-----	-----
20-29	0	0	--	8	8	100	-----	-----
30-39	2	2	100	12	10	83.3	-----	*1.000
40-49	8	6	75	25	21	84	0.57 (0.08-3.92)	*0.616
50-59	6	4	66.7	20	16	80	0.50 (0.07-1.53)	*0.596
60-69	4	4	100	8	6	75	-----	*0.515

*Valor *p* fue calculado a partir de una prueba exacta de Fisher.

5.2.3 Factores demográficos, socio-económicos, estilos de vida y su asociación con la infección por *H. pylori* en población con LTBI

En el análisis bivariado, se tomó como referencia la categoría 30-39 años, dado que las categorías de edad inferior presentaron un bajo número de individuos. En general, se encontró una asociación positiva con los siguientes factores: residir en la zona norte [OR= 3.14, IC 95 % 0.61-16.0], no realizar actividad física regular [OR=

1.44, IC 95 % 0.49-4.23], y ausencia de cicatriz BCG [OR= 1.48, IC 95 % 0.17-12.9], aunque no fue significativa (**Tabla 10**). Para ninguno de los modelos del análisis multivariado incluyendo el modelo completo o selectivamente considerando solo los factores que mostraron asociación positiva en el análisis bivariado ajustado por género, se encontró asociación significativa entre los factores y la infección por *H. pylori*. No obstante, en el último modelo tras una simulación de muestreo con 5000 muestras, residir en la zona norte mostró un valor *p* cercano a la significancia (*p*=0.07) (**Tabla 12**).

Tabla 12. Factores asociados con la infección por *H. pylori* en población con TB latente utilizando un modelo de regresión logística bivariado

Variables	β	Wald	OR*	IC 95 %	<i>p</i>	<i>B p</i>
Intercepto	1.044	1.725			2.840	0.123
Género (Masculino)	-0.343	0.247	0.71	0.18-2.75	0.619	0.618
Residencia (Norte)	1.236	2.087	3.44	0.64-18.4	0.149	0.078
Residencia (Ladera)	-0.423	0.287	0.66	0.14-3.07	0.592	0.519
Ejercicio (No)	0.437	0.583	1.55	0.49-4.85	0.454	0.473
Cicatriz BCG (No)	0.568	0.241	1.77	0.18-17.0	0.619	0.320

*A partir de un modelo de regresión logístico bivariado ajustado por género, residencia, ejercicio, y presencia cicatriz BCG.

5.2.4 Diagnóstico y aislamiento de *H. pylori* por cultivo

De los 94 pacientes que voluntariamente se sometieron a endoscopia, en el 61.7 % (58/94) de ellos se logró el aislamiento de *H. pylori*, las pruebas de identificación bioquímica fueron positivas para la actividad oxidasa, catalasa y ureasa. En todos los casos los hallazgos fueron confirmados por observación morfológica de la bacteria en tinción de Gram. No obstante, la prevalencia de la infección por histopatología fue mayor 83 % (78/94). La frecuencia de cultivos positivos para *H. pylori* fue mayor en la curvatura menor del antro (37.2 %) en comparación con la curvatura mayor (10.6 %), y el cuerpo gástrico (12.8 %), concordando con estudios previos (233) (**Tabla 13**).

Tabla 13. Frecuencia de detección de *H. pylori* según método diagnóstico y sitio anatómico de obtención de la biopsia de mucosa gástrica.

Sitio de toma de biopsia	Cultivo				Histología			
	Frecuencia		Acumulado		Frecuencia		Acumulado	
	n	%	%	<i>p</i>	n	%	%	<i>p</i>
Cali	94							
Biopsia de antro								
Curvatura menor	35	37.2	37.2	0.000	72	76.6	76.6	0.944
Curvatura mayor	10	10.6	47.8		70	74.5	80.9	
Biopsia de cuerpo	13	13.8	61.7		71	75.5	83.0	
Total	58		61.7		78		83.0	

Es importante mencionar que se evidencia una independencia entre el diagnóstico histológico de *H. pylori* con respecto al número de biopsias y sitio anatómico de la biopsia gástrica ($p=0.944$), situación que no se observó al detectar *H. pylori* mediante cultivo, pues se evidenció que el método de diagnóstico por cultivo de *H. pylori*, mejoró significativamente al cultivar más de una biopsia gástrica de diferente localización anatómica, incrementando su frecuencia de aislamiento de 37.2 % a 61.6 % al sembrar una y tres biopsias, respectivamente ($p=0.000$) (**Tabla 13**).

5.2.5 Factores bacterianos y su asociación con el tipo de gastritis crónica en población tuberculosa latente

En la población general con TB latente, la gastritis no atrófica fue la más frecuente con una prevalencia del 90.4 % (85/94). En contraste, se observó una baja prevalencia de 9.6 % (9/94) para gastritis atrófica. Específicamente, 7 participantes presentaron metaplasia intestinal (MI) de tipo completa, 1 caso de MI mixta de predominio tipo completo, y 1 caso de MI incompleta. La prevalencia de la infección por *H. pylori* en los dos tipos de gastritis crónica fue similar (77.8 % vs 83.5) ($p=0.662$). Adicionalmente, se analizó si la densidad de *H. pylori* y el grado de inflamación asociado a la infección incrementaban la posibilidad de desarrollar atrofia, pero no se encontró ninguna asociación significativa (**Tabla 14**).

Tabla 14. Características bacterianas y su asociación con el tipo de gastritis crónica en población tuberculosa latente.

Característica	Gastritis atrófica (<i>n</i> = 9)		Gastritis no atrofia (<i>n</i> = 85)		OR crudo (IC 95 %)	<i>p</i>
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%		
Estatus <i>H. pylori</i>						
Positivo	7	77.8	71	83.5	0.69 (0.13-3.68)	0.662
Negativo	2	22.2	14	16.5	Referencia	
Densidad <i>H. pylori</i>						
Abundante	3	33.3	26	30.6	0.81 (0.12-5.42)	*1.000
Moderada	4	44.4	28	32.9	1.00 (0.16-6.14)	*1.000
Escaso	0	0.0	17	20.0	-----	*0.227
Ausente	2	22.2	14	16.4	Referencia	
Inflamación						
Severa	1	11.1	22	25.9	0.27 (0.02-3.33)	*0.544
Moderada	4	44.4	23	27.1	1.04 (0.17-6.54)	*1.000
Leve	2	22.2	28	32.9	0.43 (0.05-3.41)	*0.581
Ausente	2	22.2	12	14.1	Referencia	

*Valor p fue calculado a partir de una prueba exacta de Fisher.

5.2.6 Factores demográficos, socio-económicos, estilos de vida y su asociación con la gastritis atrófica en población LTBI coinfectada por *H. pylori*

En los 78 individuos coinfectados por *H. pylori*, la proporción de individuos con gastritis atrófica y no atrófica (9 % y 91 % respectivamente) fue similar a la observada en la población general con LTBI. Los individuos en un rango de edad de 40-49 años [OR= 1.37, IC 95 % 0.13-14.7], 50-59 años [OR= 1.22, IC 95 % 0.09-15.1], 60-69 años [OR= 1.22, IC 95 % 0.07-22.4] presentaron una mayor oportunidad de tener atrofia gástrica en comparación con el grupo de menor edad (30-39 años) aunque no fue significativa. Se encontró una asociación positiva más no significativa entre la presencia de atrofia y los siguientes factores: pertenecer a estrato 2 [OR= 2.08, IC 95 % 0.32-13.8], vivir en condiciones de hacinamiento [OR= 3.78, IC 95 % 0.34-42.1], bajo consumo de alcohol [OR= 3.31, IC 95 % 0.54-20.4], estar en sobrepeso [OR= 5.78, IC 95 % 0.65-51.3], presentar antecedentes de cáncer gástrico familiar [OR= 3.85, IC 95 % 0.69-21.3], y una induración PPD ≥ 15 mm [OR= 1.53, IC 95 % 0.32-7.36] (**Tabla 15**).

En el análisis multivariado considerando solo los factores que mostraron una asociación positiva con atrofia ajustados por género y edad, inicialmente no se encontró asociación significativa pero una asociación positiva fue corroborada para los siguientes factores: edad 40-49 años [OR= 2.11, IC 95 % 0.05-91], 50-59 años [OR= 3.33, IC 95 % 0.04-293], 60-69 años [OR= 5.09, IC 95 % 0.05-535], hacinamiento [OR= 22.0, IC 95 % 0.32-1538], consumo bajo de alcohol [OR= 40.0, IC 95 % 0.82-1967], estar en sobrepeso [OR= 5.26, IC 95 % 0.42-65.1] y presentar antecedentes de cáncer gástrico familiar [OR= 12.9, 0.78-217]. En contraste con los hallazgos del análisis bivariado, pertenecer al estrato 2 [OR= 0.81, IC 95 % 0.02-31.6], y presentar una induración PPD ≥ 15 mm [OR= 0.67, IC 95 % 0.06-8.26] se asociaron negativamente. Mientras el género masculino se asoció positivamente [OR= 3.12, IC 95 % 0.12-79.0].

El modelo presentó una sensibilidad de 33.3 % y una especificidad de 98.4 %, con un coeficiente R^2 de Cox & Snell de 0.205 (20.5 %). Los resultados de 5000 simulaciones de muestreo permitieron evidenciar la significancia estadística de los predictores que mostraron asociación positiva dentro del modelo ($p \leq 0.05$) (**Tabla 16**).

Tabla 15. Características sociodemográficas, estilos de vida y su asociación según el tipo de gastritis crónica en población LTBI coinfectada por *H. pylori*

Característica	Gastritis atrófica (n = 7)		Gastritis no atrofia (n = 71)		OR crudo (IC 95 %)	p
	n	%	n	%		
Edad						
14-19	0	0.0	1	1.4	-----	*1.000
20-29	0	0.0	8	11.3	-----	*1.000
30-39	1	14.3	11	15.5	Referencia	
40-49	3	42.9	24	33.8	1.37 (0.13-14.7)	*1.000
50-59	2	28.6	18	25.4	1.22 (0.09-15.1)	*1.000
60-69	1	14.3	9	12.7	1.22 (0.07-22.4)	*1.000
Género						
Masculino	1	14.3	15	21.1	0.62 (0.07-5.57)	0.669
Femenino	6	85.7	56	78.9	Referencia	
Estrato						
1	2	28.6	28	39.4	0.89 (0.12-6.82)	*1.000
2	3	42.9	18	25.4	2.08 (0.32-13.8)	*0.641
3	2	28.6	25	35.2	Referencia	
Hacinamiento						
> 3 persona/cuarto	1	14.3	3	4.2	3.78 (0.34-42.1)	*0.319
≤ 3 persona/cuarto	6	85.7	68	95.8	Referencia	
Educación						
Post-secundaria	0	0.0	7	9.9	-----	0.252
Secundaria	1	14.3	33	46.5	0.16 (0.02-1.37)	*0.109
Primaria	6	85.7	31	43.7	Referencia	
Situación laboral						
Trabajador	2	28.6	39	54.9	0.33 (0.06-1.81)	*0.175
Desempleado	5	71.4	32	45.1	Referencia	
Residencia						
Zona Norte	5	71.4	41	57.7	Referencia	
Zona Ladera	2	28.6	19	26.8	0.86 (0.15-4.86)	*1.000
Zona Centro	0	0.0	11	15.5	-----	*0.571
Ejercicio						
No	3	42.9	43	60.6	0.49 (0.10-2.35)	*0.303
Si	4	57.1	28	39.4	Referencia	
Historia de tabaquismo						
Si	1	14.3	10	14.1	1.01 (0.11-9.36)	0.988
No	6	85.7	61	85.9	Referencia	
Consumo de cigarrillo						
Si	0	0.0	10	14.1	-----	0.288
No	7	100	61	85.9	Referencia	
Consumo de alcohol						
Alto	0	0.0	1	1.4	-----	*1.000
Moderado	0	0.0	5	7.0	-----	*1.000

Bajo	2	28.6	7	9.9	3.31 (0.54-20.4)	0.176
No consumo	5	71.4	58	81.7	Referencia	
Consumo de sal						
Siempre	0	0.0	17	23.9	-----	*0.325
Algunas veces	1	14.3	10	14.1	0.73 (0.08-6.79)	0.784
No consumo	6	85.7	44	62.0	Referencia	
IMC (kg/m²)						
≥18.5 a 24.9	1	14.3	27	38.0	Referencia	
≥25 a 30	6	85.7	28	39.4	5.78 (0.65-51.3)	*0.116
≥30	0	0.0	16	22.5	-----	*1.000
Pariente CG[^]						
Si	3	50.0	13	20.6	3.85 (0.69-21.3)	*0.132
No	3	50.0	50	79.4	Referencia	
PPD induración						
≥15 mm	4	57.1	33	46.5	1.53 (0.32-7.36)	*0.702
≥10-14 mm	3	42.9	38	53.5	Referencia	

*Valor *p* fue calculado a partir de una prueba exacta de Fisher.

[^]No se incluyeron 9 pacientes que desconocían sus antecedentes de CA gástrico familiar

Tabla 16. Factores asociados con gastritis atrófica en población LTBI coinfectada por *H. pylori* utilizando un modelo de regresión logística.

Variables	β	Wald	OR*	IC 95 %	<i>p</i>	<i>B p</i>
Intercepto	-5.825	3.846			0.003	0.000
Edad (40-49 años)	0.746	0.151	2.11	0.05-91.0	0.698	0.034
Edad (50-59 años)	1.204	0.278	3.33	0.04-293.7	0.598	0.031
Edad (60-99 años)	1.628	0.470	5.09	0.05-535.1	0.493	0.030
Género (Masculino)	1.138	0.476	3.12	0.12-79.0	0.490	0.050
Estrato (2)	-0.215	0.013	0.81	0.02-31.6	0.908	0.148
Hacinamiento (>3 personas/cuarto)	3.092	2.037	22.0	0.32-1538	0.154	0.003
Consumo alcohol (Bajo)	3.690	3.449	40.0	0.82-1967	0.063	0.002
IMC (Sobrepeso)	1.660	1.669	5.26	0.42-65.1	0.196	0.016
Pariente CG (SI)	2.563	3.180	12.9	0.78-217	0.075	0.004
Induración PPD (≥15 mm)	-0.398	0.097	0.67	0.06-8.26	0.756	0.232

*A partir de un modelo de regresión logístico multivariado ajustado por edad, género, estrato, hacinamiento, consumo de alcohol, IMC, cáncer gástrico familiar e induración PPD.

B: Remuestreado para 5000 simulaciones

5.2.7 El diámetro de la PPD y su relación con atrofia gástrica asociada a la infección por *H. pylori*

El diámetro promedio de la induración PPD fue mayor en individuos con gastritis atrófica en comparación con los individuos sin atrofia (media= 19.3 ± 8.16 mm vs 15.6 ± 5.26 mm, respectivamente). Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas (*p*=0.2699) (**Figura 13**). En apoyo de esta observación, en el análisis bivariado y multivariado tampoco se encontró asociación significativa entre una mayor induración PPD (≥15 mm) y el desarrollo de atrofia gástrica (**Tabla 15 y 16**).

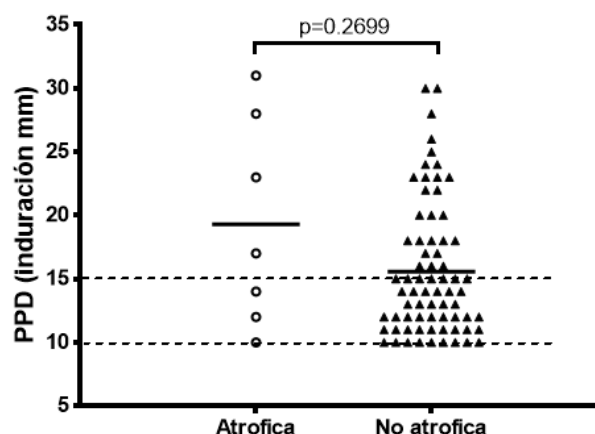


Figura 13. Reacción a la PPD en individuos con tuberculosis latente coinfectados por *H. pylori* según el tipo de gastritis. Los puntos de corte (líneas horizontales punteadas) para positividad están basados en induraciones de 10 y 15 mm. Cada símbolo representa un participante. Los números de la muestra fueron: 7 individuos con atrofia y 71 sin atrofia. Las barras horizontales representan la media; el valor p fue obtenido por una prueba U de Mann Whitney.

5.2.8 Niveles TNF- α séricos y su relación con atrofia gástrica

Los niveles de TNF- α en suero de individuos con tuberculosis latente coinfectados con *H. pylori* en comparación con los individuos sin coinfección fueron similares (media= 11.26 ± 0.62 y 10.92 ± 1.46 pg/mL, respectivamente; **Figura 14A**) no encontrándose diferencias significativas ($p=0.6587$). En los 78 individuos coinfectados por *H. pylori*, los niveles de TNF- α séricos mostraron un discreto incremento en individuos con atrofia en comparación con los individuos no atróficos pero esta variación no fue significativa (media= 12.48 ± 5.75 vs 11.14 ± 5.43 ; $p=0.5869$) (**Figura 14B**).

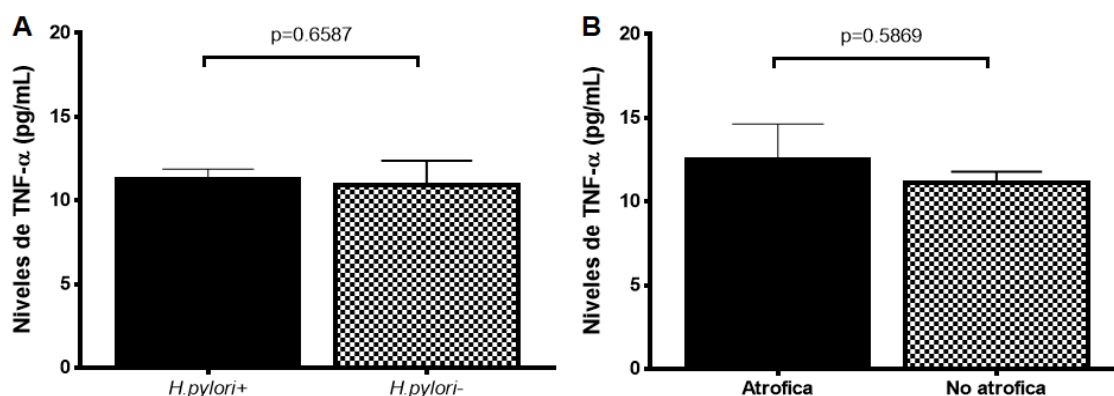


Figura 14. Niveles séricos de TNF- α en individuos con infección tuberculosis latente según su: **A)** estado infeccioso para *H. pylori* y **B)** tipo de gastritis. Los números de la muestra fueron: 78 *H. pylori*+, 16 *H. pylori*-, 7 atróficos, 70 no atróficos. En un individuo sin atrofia, no fue posible medir el TNF- α sérico. Las barras representan el error estándar de la media

la media; el valor p fue obtenido por una prueba U de Mann Whitney. Rango de referencia: 0-8.1 pg/mL

5.2.9 Concordancia entre la histología y el cultivo para diagnóstico de la infección por *H. pylori* en población LTBI

En los individuos con gastritis no atrófica la detección de *H. pylori* por histopatología y tinción de Giemsa modificada fue mayor que por cultivo (83.5 % y 64.7 %, respectivamente) con una concordancia aceptable entre ambos métodos diagnósticos según la escala de Landis & Koch 1977 (3), [$\kappa= 0.36$, IC 95 % 0.16-0.55, $p=0.000$]. En los 9 participantes con gastritis atrófica, la proporción de positividad por histopatología (77.8 %) continuó siendo mayor que por cultivo (33.3 %) con una concordancia aceptable entre ambos métodos diagnósticos, [$\kappa= 0.25$, IC 95 % -0.11-0.61, $p=0.257$]. El coeficiente global de concordancia para ambos métodos de diagnóstico fue aceptable, [$\kappa= 0.35$, IC 95 % 0.17-0.53, $p=0.000$].

No se observaron diferencias en la detección de *H. pylori* para cada método diagnóstico según el tipo de gastritis crónica. Es importante observar que la proporción de aislamiento de *H. pylori* fue menor en individuos con gastritis atrófica comparado con los individuos con gastritis no atrófica (33.3 % y 64.7 %, respectivamente) (**Tabla 17**).

Tabla 17. Comparación de casos por método diagnóstico para detección de *H. pylori* y tipo gastritis

Tipo de gastritis	Método diagnóstico								
	Histopatología				Cultivo			Concordancia	
	N	Positivo			Positivo			κ	p
		n	%	$^{\$}p$	n	%	$^{\$}p$	IC 95 %	
Atrófica	9	7	77.8		3	33.3		0.25	[-0.11-0.61]
No atrófica	85	71	83.5	0.66	55	64.7	0.07	0.36	[0.16-0.55]
Total	94	78	83.0		58	61.7		0.35	[0.17-0.53]

$^{\$}$ Valor p para comparaciones entre tipo de gastritis y método diagnóstico

5.2.10 Cantidad de *H. pylori* en mucosa gástrica y probabilidad de aislamiento

En los 78 participantes diagnosticados por histopatología con infección crónica por *H. pylori*, 37.2 % (29/78) presentaron la bacteria en cantidad abundante, 41 % (32/78) en cantidad moderada y 21.8 % (17/78) en cantidad escasa. La proporción de aislamiento de *H. pylori* por cultivo disminuyó gradualmente de acuerdo a la carga bacteriana observada por histopatología, 32 % (25/78) con cantidad abundante, 23.1 % (18/78) con cantidad moderada y 15.4 % (12/78) con cantidad escasa (**Figura 15**).

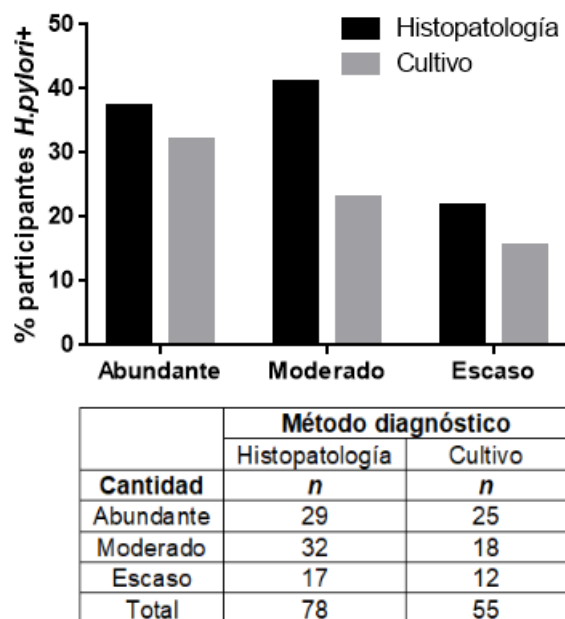


Figura 15. Proporción de participantes con cantidad abundante, moderada y escasa de *H. pylori* según diagnóstico histopatológico y probabilidad de aislamiento.

5.2.11 Inflamación en la mucosa gástrica y su relación con la cantidad de *H.pylori*

De los 78 pacientes positivos para la infección por *H. pylori*, 28.2 % (22/78) presentaron inflamación severa, 34.6 (27/78) inflamación moderada y 37.2 % (29/78) inflamación leve de la mucosa gástrica. El nivel de inflamación estuvo directamente relacionado con la cantidad de la bacteria observada en el epitelio gástrico por histopatología ($p=0.000$). Así el 63.6 % de los participantes con *H. pylori* en cantidad abundante presentaron inflamación severa, 59.3 % de los participantes con *H. pylori* en cantidad moderada presentaron inflamación moderada y 48.3 % de los participantes con *H. pylori* en cantidad escasa presentaron inflamación leve (Figura 16).

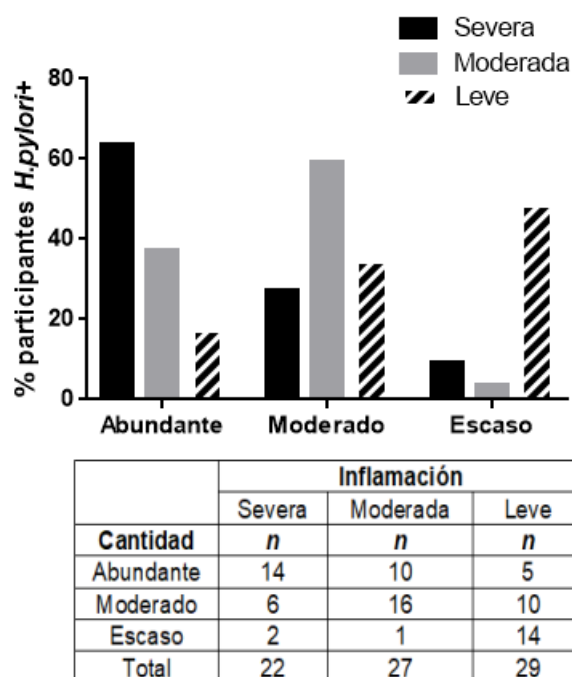


Figura 16. Proporción de participantes con inflamación de la mucosa gástrica severa, moderada y leve, y su relación con la cantidad de *H. pylori*.

5.2.12 Escala histopatológica de Correa y su asociación con la cantidad de *H. pylori* en mucosa gástrica

Se evaluó la heterogeneidad de las lesiones gástricas en los 78 individuos infectados por *H. pylori* y su asociación con la cantidad bacteriana encontrando diferencias significativas ($p=0.006$). Los individuos con una cantidad abundante de *H. pylori* presentaron lesiones más avanzadas [media= 1.82, IC 95 % 1.45-2.20] que los individuos con *H. pylori* en cantidad moderada [media= 1.58, IC 95 % 1.17-2.0] y que los individuos con *H. pylori* en cantidad escasa [media= 1.12, IC 95 % 0.95-1.29], diferencias que fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$, **Figura 17**).



Figura 17. Análisis histopatológico para biopsias gástricas de individuos con tuberculosis latente coinfectados con cepas de *H. pylori* según cantidad de la bacteria: abundante ($n=29$), moderada ($n= 32$), y escasa ($n= 17$). El puntaje está representado en una escala

de 1 a 6 (definido en metodología, cada símbolo representa el puntaje para un individuo). Las barras horizontales representan la media; los valores p fueron obtenidos por una prueba post-hoc de Dunn.

5.2.13 Efecto de la coinfección por *H. pylori* y su cantidad sobre el diámetro de la induración PPD en población latente

En general, la presencia de la coinfección con *H. pylori* no se asoció con una induración mayor en la prueba cutánea de la tuberculina [OR= 0.90, IC 95 % 0.31-2.65; $p=0.852$] (**Tabla 10**). Se observó que los individuos LTBI coinfectados con *H. pylori* presentaron un diámetro promedio de induración PPD de 15.9 ± 0.64 mm en comparación con los individuos no coinfectados que presentaron una induración de 14.6 ± 1.03 mm, estas diferencias no fueron significativas ($p=0.577$) (**Figura 18A**). Además, se observó que independientemente de la cantidad de *H. pylori* en la mucosa gástrica, el diámetro promedio de induración PPD en individuos coinfectados no mostró diferencias significativas en comparación con los individuos sin coinfección para las comparaciones múltiples ($p>0.05$) (**Figura 18B**).

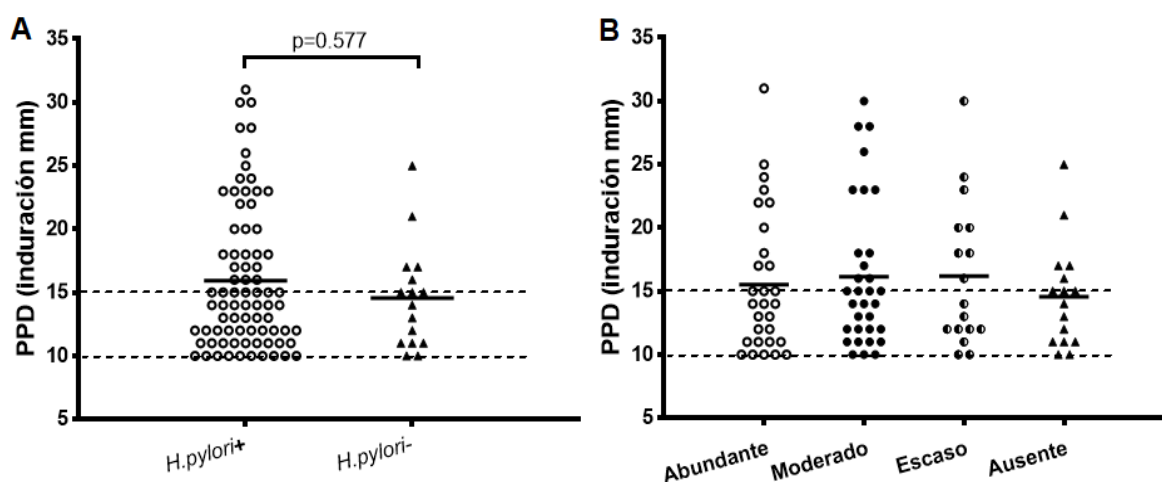


Figura 18. Reacción a la PPD en participantes con tuberculosis latente según su: **A)** estado *H. pylori* y **B)** Cantidad de *H. pylori* en mucosa gástrica. Los puntos de corte (líneas horizontales punteadas) para positividad están basados en induraciones de 10 y 15 mm. Cada símbolo representa un participante. Los números de la muestra fueron: 78 individuos *H. pylori*+ y 16 *H. pylori*-. De los individuos *H. pylori*+, 29 presentaron la bacteria en cantidad abundante, 32 moderada y, 17 escasa. Las barras horizontales representan la media; el valor p fue obtenido por una prueba U de Mann Whitney o una prueba post-hoc de Dunn.

5.3 DISCUSIÓN

5.3.1 Prevalencia de infección por *H. pylori* en población tuberculosa latente

En la actualidad se acepta que la infección gástrica por *H. pylori* es un factor de riesgo para cáncer gástrico y se encuentra implicado aproximadamente en el 60 % de todos los casos (236). El desenlace de la infección es determinado por características del patógeno (CagA, ureasa, VacA, BabA2) en combinación con factores ambientales (condiciones socioeconómicas, nutrición, exposición a sustancias tóxicas, patógenos coinfectantes) y genéticos del hospedero (polimorfismos en genes que codifican para IL-1 β , TNF- α , IL-10, IL-6, e IL-8) (234, 237-239). Por lo anterior, conocer la prevalencia de la infección e identificar los factores asociados con su adquisición dentro de la población puede ser útil para tomar medidas orientadas a reducir su transmisión y mejorar el éxito de las tasas de erradicación de los regímenes antibióticos disponibles.

Este es el primer estudio en Colombia que describe la prevalencia de *H. pylori*, y los factores asociados en población con infección tuberculosa latente. Se encontró una prevalencia de *H. pylori* de 83 % en histología y 61.7 % en cultivo. La concordancia entre ambos métodos diagnósticos fue aceptable. Las diferencias entre los resultados podrían atribuirse a la distribución desigual de *H. pylori* en el estómago que condiciona la probabilidad de encontrarlo a partir de la biopsia (234), la baja sensibilidad del cultivo ~58.1 % (240), y el consumo frecuente de inhibidores de la bomba de protones que dificulta su aislamiento (241), este último aunque fue un criterio de exclusión no se descarta un sesgo en el reporte. Además, el crecimiento de la bacteria en el cultivo es dependiente de la densidad bacteriana en la muestra. En particular, la baja proporción de aislamiento en individuos con atrofia gástrica puede ser explicada por la alteración del microambiente gástrico (inflamación e hipoclorhidria) y la consecuente progresión a metaplasia intestinal, condiciones desfavorables para el crecimiento de *H. pylori* (242). De hecho, la bacteria rara vez puede aislarse en pacientes seropositivos con adenocarcinoma gástrico (102).

La prevalencia encontrada (83 %) es bastante elevada considerando que la prevalencia de *H. pylori* estimada para la región de Sur América en el 2015 fue del 69.4 % [IC 95 % 63.9-74.9], y es mayor a la prevalencia reportada en países como Argentina 49.1 %, Brasil 71.2 %, Chile 74.6 %, Ecuador 72.2 % y Panamá 54.1 % (243). Los resultados encontrados coinciden con la prevalencia de infección por histología reportada previamente para Cali, 72.2 % (173/244) en 1987 (244), 80.7 % (109/135) en 1988 (245), 63.1 % (879/1392) en 1997 (105), y 68.9 % (113/164) en 2003 (246), sugiriendo que la prevalencia de *H. pylori* en Cali es alta, y no ha mostrado disminución en los últimos 30 años. Las diferencias observadas entre estos estudios pueden deberse a la edad y el sexo de los pacientes incluidos. En ninguna de las investigaciones se indica el estado de los participantes frente a la infección latente por *M. tuberculosis*. No obstante, como es una infección crónica de prevalencia global, según las más recientes estimaciones, se puede asumir que el

23 % de los participantes en los estudios mencionados presentaban infección por *M. tuberculosis* (46), lo que permite la comparación con los hallazgos encontrados en la actual investigación. Aunque en esta investigación no se evaluó la prevalencia de *H. pylori* en población PPD-negativa, Torres *et al* (35) en adultos dispépticos de Perú, mostró una prevalencia de *H. pylori* igualmente alta, y similar entre individuos PPD-positivos y PPD-negativos (86 % vs 80 %, respectivamente, $p=0.379$).

5.3.2 Factores asociados con la infección por *H. pylori* en población LTBI

La adquisición de la infección por *H. pylori* a nivel poblacional se han asociado con múltiples factores de riesgo incluyendo bajo estrato socioeconómico, tener padres (especialmente madres) portadoras de *H. pylori*, hermanos mayores *H. pylori*-positivos, condiciones de hacinamiento en el hogar, alimentos contaminados y pobre higiene personal, condiciones de saneamiento, nivel de educación, país de origen y etnicidad (101, 247, 248). En este estudio algunos factores incrementaron la oportunidad de adquirir la infección por *H. pylori* entre ellos residir en la zona norte de la ciudad, no realizar actividad física regular, y ausencia de cicatriz BCG. Estas asociaciones no fueron significativas en el análisis bivariado ni multivariado ajustado por género.

En este estudio no se observaron diferencias en la prevalencia de *H. pylori* en relación a la edad y el género, aunque la prevalencia alcanzó su punto máximo en la edad adulta entre los 40 a 49 años. La alta prevalencia de la infección dentro de la población, y el pequeño número de representantes en algunas de las categorías de edad limitó el alcance del análisis. Sin embargo, estas observaciones concuerdan con lo informado en pacientes dispépticos de Camerún (249) e Italia (250), en donde se encontró que la infección por *H. pylori* tuvo lugar en la niñez y adolescencia, y alcanzó su punto máximo en la edad de 35 a 50 años. En cuanto al género, la alta prevalencia de la infección observada en mujeres puede estar influenciada por su mayor participación en el estudio en comparación con los hombres (78.7 % vs 21.3, respectivamente). Estudios previos en diferentes poblaciones, no han encontrado diferencias significativas entre la infección por *H. pylori* y el género (249, 251, 252). Con respecto a la prevalencia de *H. pylori* por zonas de la ciudad, esta fue particularmente alta en la zona norte (59.0 %), y residir en esta zona incrementó la oportunidad de presentar la infección en el análisis bivariado [OR= 3.14 IC 95 % 0.61-16.0], asociación positiva que se mantuvo en el análisis multivariado [OR= 3.44 IC 95 % 0.64-18.4] mostrando un valor p cercano a la significancia en el remuestreo ($p=0.078$), por lo que se consideró importante explicar esta observación.

Una posible hipótesis es que la adquisición de la infección en esta zona este asociada con la presencia de *H. pylori* en el agua potable, la cual es tomada y tratada a partir del río Cauca, uno de los ríos más contaminados del país. Varios estudios han confirmado la presencia de *H. pylori* en muestras de agua ambiental y potable alrededor del mundo (253-255). Lu *et al* (256) logró aislar *H. pylori* a partir

de aguas residuales, y la genotipificación de los aislados evidenció una marcada presencia de genotipos *vacA s1a/m1* los cuales están asociados con lesiones gástricas severas. Vesga *et al* (257) aisló con éxito *H. pylori* a partir de muestras de agua afluyente y efluente en tres plantas de tratamiento de agua potable en Bogotá-Colombia que toman agua de ríos circundantes (río Bogotá, Tunjuelo y Teusacá). En conjunto, estas investigaciones muestran que *H. pylori* puede sobrevivir en el agua, y los tratamientos convencionales para la potabilización del agua con cloro no garantizan su eliminación y constituyen una potencial fuente de transmisión de la infección.

Por otra parte, los individuos que no realizaban actividad física regular (≤ 2 veces/semana) mostraron una alta prevalencia de *H. pylori* (59.0 %). La ausencia de actividad física, un factor modificable aumentó 0.44 veces la probabilidad de infección por *H. pylori* en el análisis bivariado y 0.55 veces en el modelo logístico, aunque en ningún caso fue significativo. Igualmente, la ausencia de cicatriz BCG un indicador de ausencia de vacunación se asoció con un incremento en la oportunidad de presentar infección por *H. pylori* [OR= 1.48, IC 95 % 0.17-12.9], efecto que se mantuvo en el modelo de regresión ajustado [OR= 1.77, IC 95 % 0.18-17.0]. Un posible efecto protector de la actividad física con intensidad moderada, y la vacunación BCG contra la infección por *H. pylori* y sus manifestaciones clínicas más severas como úlcera péptica y cáncer gástrico no ha sido bien explorado, y la evidencia existente a la fecha es limitada (258-260). De existir un vínculo biológico, este podría estar mediado por la estimulación y fortalecimiento de la respuesta inmune innata y adaptativa (261-263).

5.3.3 Prevalencia de lesiones gástricas en individuos con LTBI

En la cascada de carcinogénesis gástrica, la atrofia constituye un paso crucial (28). El riesgo de desarrollar cáncer gástrico incrementa exponencialmente como la gastritis atrófica se extiende, y la metaplasia intestinal se incrementa (101). Los pacientes con gastritis atrófica multifocal tienen un riesgo 90 veces mayor de desarrollar adenocarcinoma gástrico que aquellos con mucosa normal (264). Por lo que el conocimiento de su prevalencia dentro de la población es importante. En este estudio, se encontró una baja prevalencia de gastritis atrófica (9.6 %), y en todos los casos acompañados de metaplasia intestinal. Estos hallazgos llaman la atención en una población hiper-endémica para la infección por *H. pylori* (83 %), y con un riesgo moderado de cáncer gástrico de 20 casos por 100.000 habitantes en hombres y 10.5 casos por 100.000 habitantes en mujeres (Tomado del registro de cáncer de Cali para el periodo 2008-2012). En apoyo a esta observación, un estudio previo realizado en Cali en 1997, empleando 1.392 informes histopatológicos, reportó una frecuencia de gastritis atrófica de 15.2 % cuando la prevalencia de *H. pylori* encontrada fue apenas del 63.1 % (105), menor que la prevalencia que se observó en esta investigación. Un estudio de Zhang *et al* (265) en Japón, un país con una incidencia de cáncer gástrico de 31.3 casos por 100.000 habitantes reportó una prevalencia para *H. pylori* de 55 % y para atrofia gástrica de 36.8 %. Estos

hallazgos podrían deberse a: 1) un sesgo muestral, más de la mitad (78.7 %) de los sujetos reclutados en este estudio fueron mujeres, y el adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal es predominante en hombres (101), 2) la población de estudio eran individuos dispépticos sin manifestaciones gastroduodenales significativas, y 3) un 25 % de los participantes eran menores de 40 años, y solo el 12.8 % eran ≥ 60 años.

Por otra parte, como es bien conocido la infección por *H. pylori* incrementa significativamente el riesgo de desarrollar lesiones precursoras de cáncer gástrico al promover una fuerte respuesta inflamatoria (101, 239). Sin embargo, en esta investigación la positividad para *H. pylori*, su densidad en la mucosa gástrica, y el grado de inflamación relacionado con la infección no se asoció con un incremento en la oportunidad de desarrollar atrofia. Este fenómeno, puede en parte ser explicado por el tamaño limitado de la muestra en el grupo con gastritis atrófica ($n=9$), lo que llevó a un bajo poder estadístico. También podría sugerir que para la población de estudio otros factores diferentes a los bacterianos pueden estar contribuyendo al desarrollo de las lesiones gástricas. De hecho, solo el 20 % de los pacientes infectados por *H. pylori* desarrollan manifestaciones clínicas (102), lo cual corrobora que la severidad de la enfermedad depende de las interacciones entre el hospedero, el ambiente y los factores de virulencia bacterianos (102, 239).

5.3.4 Factores asociados con atrofia gástrica en población coinfectada por *H. pylori*

Aunque el tratamiento de erradicación para *H. pylori* en estómagos atróficos puede prevenir algunos casos de cáncer evitando el desarrollo adicional de atrofia o resolviendo parcialmente la inflamación relacionada directamente con daño al ADN, el cáncer puede y frecuentemente se desarrolla (28). Adicionalmente, un estudio coreano encontró que la erradicación de *H. pylori* no detuvo el desarrollo de cáncer gástrico en pacientes con metaplasia intestinal (266). Estos hallazgos sugieren que la atrofia es un punto de no retorno (28, 239). Varios estudios han sido conducidos para identificar los factores de riesgo asociados con atrofia y metaplasia intestinal (239, 267, 268), y clásicamente se piensa que los factores de riesgo para el desarrollo de estas lesiones premalignas son idénticos a los asociados con cáncer gástrico (95). Pero a la fecha ningún estudio ha evaluado los factores asociados a estas dos condiciones en población con TB latente coinfectada por *H. pylori*, y sin manifestaciones gastroduodenales significativas. En este estudio se encontró que la edad, el género masculino, estar en sobrepeso, tener una historia familiar de cáncer gástrico, el hacinamiento, y un bajo consumo de alcohol aumentaron significativamente la oportunidad de tener atrofia gástrica. Los resultados indican que, a partir de los 40 años, la posibilidad de desarrollar atrofia gástrica incrementa significativamente comparado con la categoría de edad 30-39 años, y este fenómeno puede ser explicado por la infección con *H. pylori*, la cual usualmente se adquiere en la infancia y persiste a lo largo de la vida causando una inflamación crónica en la mucosa que favorece el desarrollo de atrofia en la población mayor (101, 269).

Se observó que ser hombre incrementó la oportunidad de presentar atrofia, en contraste con los hallazgos del análisis bivariado donde mostró reducir dicha posibilidad, lo cual sugiere que el género estaba actuando como un factor de confusión que debía ser controlado dentro del modelo multivariado. Las razones para explicar un incremento en la oportunidad de presentar de atrofia para el género masculino son inciertas, aunque está bien descrito que la prevalencia de *H. pylori*, y de trastornos gástricos es más común en hombres que en mujeres (101, 270). Recientemente se ha sugerido que el receptor de andrógenos puede jugar un papel importante en la carcinogénesis gástrica (271). En general, estas observaciones son consistentes con los resultados encontrados por Kim *et al* (239) en población coreana dispéptica, en donde el incremento en edad a partir de los 48 años mostró una asociación positiva más no significativa con el riesgo de desarrollar atrofia, [OR= 2.23, IC 95 % 0.87-5.70] para 48-60 años, y [OR= 3.71, IC 95 % 1.31-10.9] para ≥ 61 años. En otro reciente estudio realizado por estos investigadores que incluyó un mayor tamaño muestral ($n=4.023$ individuos) el riesgo de desarrollar atrofia igualmente aumentó, en este caso a partir de los 40 años, [OR = 2.55, IC 95 % 2.05-3.18] para 40-59 años, y [OR= 5.00, IC 95 % 3.71-6.74] para ≥ 60 años, y los hombres presentaron un riesgo mayor [OR= 1.38, IC 95 % 1.17-1.64] ambas asociaciones fueron significativas (272).

En la presente investigación se encontró una alta prevalencia de gastritis atrófica entre individuos con sobrepeso (85.7 %), y en el análisis multivariado el sobrepeso ($\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$) se asoció con un incremento en la oportunidad de desarrollar atrofia gástrica. Múltiples estudios han mostrado que el exceso de peso corporal está directamente asociado con el riesgo de varios tipos de cáncer, incluyendo colon, mama (en mujeres posmenopáusicas), endometrio, esófago, riñón y estómago no es la excepción (273). Es bien reconocido que el riesgo de adenocarcinoma gástrico es sustancialmente mayor en individuos obesos, una asociación que parece ser más sólida para cáncer gástrico de cardias (gastro-esofágico) (274, 275). En un meta-análisis Yang *et al* (276) mostró que el exceso de peso corporal ($\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$) se asoció con un mayor riesgo de cáncer gástrico [OR= 1.22, IC 95 % 1.06–1.41]. Pero en el análisis estratificado encontró que el exceso de peso corporal se asoció significativamente con un mayor riesgo de cáncer gástrico de cardias [OR= 1.55, IC 95 % 1.31–1.84], mientras para cáncer gástrico no cardias la asociación fue positiva más no significativa [OR= 1.18, 95 % IC 95 % 0.96–1.45]. En contraste, en un reciente estudio Levi *et al* (277) en población adolescente de Israel observó que la obesidad pero no el sobrepeso, en hombres y mujeres se asoció con el riesgo de cáncer gástrico no cardias [HR= 1.78 CI 95 % 1.12-2.83]. Sin embargo, cualquier efecto del exceso de peso corporal, y el riesgo de cáncer gástrico no cardias y sus lesiones precursoras parece ser relativamente pequeño, y requiere más investigación. Las razones para explicar una posible asociación pueden atribuirse a que la grasa visceral induce la liberación de adipocinas y citocinas que conducen a hiperinsulinemia (278), y a alteraciones en el metabolismo de las hormonas endógenas (hormonas sexuales, y factores de

crecimiento similares a la insulina) que en conjunto pueden generar una alteración del balance normal entre la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis (273). Por lo cual, evitar el aumento de peso parece ser un factor a considerar para prevenir el cáncer gástrico.

Un historial de cáncer gástrico familiar fue otro factor asociado con atrofia en la población de estudio, un punto a destacar considerando el pequeño número de sujetos. Este hallazgo es consistente con estudios previos que sugieren que un antecedente familiar de cáncer gástrico, y la presencia de infección por *H. pylori* son los dos factores más importantes para cáncer gástrico distal, y sus lesiones precursoras (279). Un meta-análisis realizado por Rokkas *et al* (280) considerando solo estudios con población emparejada por edad y sexo, mostró que los familiares en primer grado de pacientes con cáncer gástrico tenían un riesgo mayor de desarrollar atrofia [OR= 2.2, IC 95 % 1.26–3.82], y metaplasia intestinal [OR= 1.98, IC 1.36-2.88] en comparación con los controles. En otro estudio reciente con casos y controles emparejados por edad y sexo, se observó que los familiares en primer grado de pacientes con cáncer presentaron un riesgo de 2.69 [IC 95 % 1.06–6.80] para metaplasia intestinal antral en hombres. Pero cuando se evaluó el riesgo en población general infectada por *H. pylori* se observó un incremento mayor [OR= 9.28, IC 95 % 4.73–18.18] para atrofia, [OR= 7.81, IC 95 % 3.72–16.4] y metaplasia intestinal antral (95). Adicionalmente, los familiares de pacientes con cáncer gástrico comúnmente presentan una mayor prevalencia de lesiones precancerosas (279, 281). La razón por la cual una historia familiar de cáncer gástrico es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de lesiones preneoplásicas puede atribuirse a polimorfismos genéticos heredables que incrementan la respuesta inflamatoria. Igual impacto tienen los entornos socioeconómicos vulnerables compartidos (95), y los factores ambientales incluyendo la infección por *H. pylori*, la ingesta excesiva de sal y compuestos nitrados, y una deficiencia de antioxidantes en la dieta entre los pacientes con cáncer gástrico y sus familiares (272). En consecuencia, se recomienda la erradicación profiláctica de *H. pylori* en familiares de pacientes con cáncer gástrico para contribuir a la prevención del mismo (95).

En términos de factores ambientales, vivir en condiciones de hacinamiento (>3 personas/cuarto) fue otro importante factor asociado con el desarrollo de atrofia en este estudio, pese al bajo número de individuos que manifestaron esta condición. Una explicación para este hallazgo, es que el hacinamiento está interrelacionado con otros reconocidos factores de riesgo para la infección por *H. pylori* como un bajo nivel socioeconómico y la convivencia con familiares portadores de la infección (101, 247), que en conjunto favorece la transmisión de *H. pylori* dentro del núcleo familiar, uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de lesiones precursoras, y cáncer gástrico (101, 279). Además, propicia la interacción entre pacientes con cáncer gástrico y sus familiares, y como bien se ha documentado los familiares en primer grado de pacientes con cáncer gástrico tienen un riesgo incrementado de atrofia y metaplasia intestinal (272, 279).

Otro factor ambiental que se asoció positivamente con un incremento en la oportunidad de desarrollar atrofia gástrica fue el consumo de alcohol. El consumo de alcohol es una de las principales causas de morbilidad, discapacidad y mortalidad en el mundo. Para el 2012, se estimó que 5.5 % de todos los casos de cáncer, y una proporción similar de muertes por cáncer se atribuyeron al consumo de alcohol (282). El impacto del consumo de alcohol en el cáncer de cabeza y cuello, y en el carcinoma de células escamosas de esófago es bien conocido, pero el número de cánceres asociados con el consumo de alcohol ha aumentado en los últimos años, y actualmente incluye cáncer de colon, recto, hígado, mama, y páncreas (283). Una relación entre el consumo de alcohol, y el riesgo de lesiones precursoras y cáncer gástrico es biológicamente admisible, y podría ser dependiente de la dosis ingerida (284). En un reciente meta-análisis Tramacere *et al* (284) en comparación con no bebedores encontró un RR combinado de 1.07 [IC 95 % 1.01–1.13] para bebedores, y 1.20 [IC 95 % 1.01–1.144] para bebedores pesados (≥ 4 copas/día). Las estimaciones agrupadas fueron aparentemente más altas para cáncer gástrico no cardias [RR= 1.17, IC 95 % 0.78-1.75] que para cáncer de cardias [RR= 0.99 IC 95 % 0.67-1.47] en bebedores pesados. El modelo dosis-riesgo estimó un RR de 0.95 [IC 95 % 0.91-0.99] para 10 g/día y 1.14 [IC 95 % 1.08 a 1.21] para 50 g/día. Resultados similares fueron encontrados por Han *et al* (285) en otro meta-análisis donde se observó que el consumo de alcohol incrementó el riesgo de cáncer gástrico [RR= 1.17 IC 95 % 1.00-1.34]. El modelo de dosis-respuesta mostró que cada 10 g/día de incremento en el consumo de alcohol se asoció con un aumento del 7 % en el riesgo de cáncer gástrico.

En conjunto ambos estudios, proporcionan evidencia que el consumo de alcohol es un factor importante para cáncer gástrico. Los mecanismos biológicos subyacentes a esta asociación no están bien comprendidos. Aunque se reconoce que el consumo excesivo de alcohol causa daños en el estómago y el duodeno al afectar la integridad de la barrera mucosa predisponiendo a lesiones gástricas (258, 284). Este daño puede ser parcialmente explicado por el metabolismo oxidativo del etanol que conduce a la formación de acetaldehído y especies reactivas del oxígeno, el estrés oxidativo generado en el estómago a su vez induce a la peroxidación lipídica que conduce a la formación de malondialdehído otro compuesto también mutagénico (210). El acetaldehído y malondialdehído generados pueden unirse al ADN y las proteínas formando aductos estables con capacidad de inducir respuestas pro-inflamatorias (286). La ingesta de alcohol también causa un deterioro del sistema inmune que afecta la activación y función de los linfocitos NK (287), que desempeñan un papel importante en la destrucción de las células malignas (288). Es pertinente indicar que en este estudio no fue posible evaluar el efecto del consumo moderado y pesado de alcohol por el reducido número de sujetos en estas categorías. La ingesta de alcohol como factor asociado al desarrollo de lesiones precursoras de cáncer gástrico, es importante desde una perspectiva de salud pública por ser un factor modificable.

5.3.5 TNF- α y atrofia gástrica en población LTBI

Dado que el TNF- α es mediador clave que se produce en gran cantidad en respuesta a infecciones bacterianas e induce la transcripción de un amplio repertorio de citocinas y quimiocinas, amplificando la respuesta inflamatoria (289). Se esperó encontrar una elevada cantidad de esta citocina en sangre de individuos con tuberculosis latente coinfectados con *H. pylori* en comparación con los individuos sin coinfección. Los niveles encontrados fueron ligeramente altos y no difirieron entre ambos grupos. Dado que el TNF- α es una potente citocina que inhibe la producción de ácido gástrico favoreciendo el sobrecrecimiento de bacterias sensibles al pH con la consecuente inflamación asociada que lleva a atrofia (101). Es de esperar que en presencia de moderados niveles de TNF- α sistémicos y probablemente gástricos, los individuos LTBI coinfectados por *H. pylori* presentaran una baja prevalencia de atrofia (9 %). Esta observación está apoyada por los niveles moderados de TNF- α séricos observados en los individuos con atrofia gástrica que no fueron superiores estadísticamente en comparación con los individuos con gastritis no atrófica. Estos hallazgos sugieren que aunque el TNF- α es esencial para el control de la infección por *M. tuberculosis* (79) y *H. pylori* (289), otros factores parecen ser necesarios para mantener el equilibrio entre inmunidad y susceptibilidad.

5.3.6 Cantidad de *H. pylori* en mucosa gástrica, inflamación y severidad de las lesiones

La inflamación gástrica es el sello distintivo de la infección crónica por *H. pylori*, y se piensa subyace a la enfermedad. Comprende una gama completa de células inflamatorias, pero es predominantemente linfocítica. Sin embargo, en casos poco comunes de infecciones crónicas, generalmente hay un componente neutrofílico en la lámina propia, y se cree que es particularmente importante en la patogénesis a través de la liberación de mediadores inflamatorios perjudiciales como las especies reactivas de oxígeno (ROS) (107). La severidad de la inflamación gástrica generada por *H. pylori* se define en función de sus factores de virulencia, densidad bacteriana y la respuesta inmune del hospedero. Esta última está condicionada por los efectos locales proinflamatorios de *H. pylori* dentro del estómago, y por la respuesta inmune local y sistémica (107). Dado que más de la mitad (62.8 %) de los individuos *H. pylori* positivos en este estudio presentaron una cantidad moderada y escasa de la bacteria se puede comprender la baja prevalencia de lesiones gástricas precancerosas encontrada.

En apoyo de esta observación, la densidad bacteriana se asoció en una relación “dosis-respuesta” con el nivel de inflamación y la puntuación obtenida en la escala de Correa. De modo que en la colonización escasa solo 9.1 % de los individuos tenía inflamación severa, mientras en la colonización abundante 63.6 % de los individuos tenía inflamación severa. De ahí que los individuos con *H. pylori* en cantidad abundante presentaran lesiones histopatológicas más avanzadas. Estos

resultados concuerdan con lo reportado por Ghasemi *et al* (251) en población iraní, quien observó que los pacientes con tasas de colonización de *H. pylori* escasa presentaron el nivel más alto de actividad leve (33.52 %). En contraste, aquellos con colonización de *H. pylori* abundante presentaron el nivel más alto de actividad severa (43.75 %). Adicionalmente, también observaron una relación significativa entre densidad de *H. pylori* y los hallazgos histopatológicos incluyendo atrofia, metaplasia intestinal y formación de folículos linfoides. En otro estudio realizado por Alagoz *et al* (290) en Turquía, igualmente se demostró una correlación positiva ($r=0.72$) entre la densidad de *H. pylori* y la actividad de la infección (grado de infiltración neutrofílica). A la luz de estos hallazgos, y la alta prevalencia de *H. pylori* encontrada en la población de estudio, su erradicación previo al desarrollo de atrofia constituye una estrategia de prevención que puede ayudar reducir o controlar las tasas de incidencia de cáncer gástrico.

5.3.7 Efecto de la coinfección por *H. pylori* y su cantidad en mucosa gástrica sobre el diámetro PPD

Dado que *H. pylori* es un patógeno crónico, y un estimulador activo de la respuesta inmune innata y adaptativa a nivel local y sistémico (107), y se sabe que altas densidades de *H. pylori* pueden exacerbar esta respuesta (251). Se esperó que en el contexto de una coinfección por *H. pylori*, la continua inflamación y estimulación de macrófagos y linfocitos T vírgenes hacia un perfil Th1 en respuesta a la infección potencializará la respuesta inmune frente a la infección por *M. tuberculosis*, una especie de efecto “espectador” en individuos que ya estaban previamente sensibilizados (LTBI). Sin embargo, la provocación con el derivado proteico purificado (PPD) de *M. tuberculosis* en individuos coinfectados por *H. pylori* no mostró un incremento significativo en el diámetro promedio de la induración PPD (una reacción de hipersensibilidad retardada) en comparación con los individuos sin coinfección. La densidad de *H. pylori* en la mucosa tampoco afectó esta observación. Esto podría estar sugiriendo indirectamente que la respuesta inmune frente a *H. pylori* no necesariamente mejora la respuesta inmune frente *M. tuberculosis* como se ha indicado en algunos estudios (20, 33).

5.3.8 Limitaciones y fortalezas del estudio

Su diseño transversal no permitió establecer temporalidad o causalidad entre la infección por *H. pylori* o el desarrollo de atrofia gástrica con los factores asociados. La ausencia o baja frecuencia de participantes en el rango de edad de 14-19 impidió su uso como grupo de referencia para evaluar el efecto en el incremento de la edad sobre la positividad a la coinfección por *H. pylori*, y el desarrollo de atrofia gástrica, llevando a subestimar el riesgo de estas condiciones en relación con la edad, el cual se sabe es mayor en personas de edad avanzada por tener una ventana más amplia de exposición a *H. pylori*, y una disminución de la función inmune relacionada con el envejecimiento (258).

No se incluyeron participantes de otras zonas de la ciudad (por ejemplo, del Oriente) en donde conviven personas con deficientes condiciones socioeconómicas y de higiene. No obstante, este sesgo de selección tuvo una influencia limitada en los resultados dado que la prevalencia global de *H. pylori* encontrada fue alta. El tamaño limitado de la muestra en el grupo *H. pylori*-negativo ($n=16$), y en los individuos *H. pylori*-positivos con atrofia ($n=7$) dificultó las comparaciones entre categorías llevando a un bajo poder estadístico que se vio reflejado en amplios intervalos de confianza, y en la necesidad de simular un muestreo con 5000 muestras para alcanzar la significancia estadística para algunos de los factores incluidos dentro los modelos multivariados.

Todos los individuos con atrofia incluidos en este estudio también tenían metaplasia intestinal, esto puede representar un sesgo hacia la identificación de factores asociados con el desarrollo de atrofia. Pese a ello, los hallazgos encontrados son válidos dado que la metaplasia intestinal es una consecuencia de la atrofia según el modelo propuesto para cáncer gástrico tipo intestinal (291). Existe una posibilidad de clasificación errónea de los bebedores por el sesgo de autoreporte. No se puede descartar un posible efecto de confusión residual producto de factores desconocidos o no medidos sobre las asociaciones observadas.

Pese a estas limitaciones, este es un estudio único en Colombia que proporciona información valiosa sobre la prevalencia de la infección por *H. pylori* y lesiones precursoras de cáncer gástrico, e identifica factores asociados importantes para la adquisición de la infección y la progresión a atrofia en una subpoblación con infección tuberculosa latente de base.

5.3.9 Conclusiones y recomendaciones

En Colombia, el cáncer gástrico ocupa el tercer puesto en incidencia y el primero en mortalidad por enfermedades malignas en hombres, lo que exige una mejora en las estrategias de mitigación. La sola infección por *H. pylori* no parece justificar el riesgo aumentado para el desarrollo de lesiones precursoras y cáncer gástrico. El mejoramiento de las condiciones de saneamiento e higiene, la promoción de hábitos nutricionales saludables, y la erradicación de *H. pylori* en conjunto constituyen estrategias clave de prevención primaria que deben ser consideradas. Sin embargo, gran parte de los esfuerzos en la prevención de este tipo de cáncer deben ser enfocados en la identificación de los factores de riesgo (bacterianos, ambientales, y genéticos) asociados con la adquisición de la infección, y su progresión a lesiones preneoplásicas. Además de la vigilancia constante en la prevalencia de la atrofia, y metaplasia intestinal dentro de la población orientada a la detección temprana y tratamiento.

En conclusión, entre los individuos con infección tuberculosa latente, la prevalencia de *H. pylori* diagnosticada por histopatología fue elevada (83 %) reflejando la alta carga de infección por *H. pylori* y su transmisión continua en la comunidad. Residir

en la zona norte de la ciudad, no realizar actividad física regular, y la ausencia de cicatriz BCG incrementaron la oportunidad de adquirir la infección por *H. pylori*, aunque esta asociación no fue significativa. La prevalencia de atrofia gástrica fue baja (9.6 %), y varios factores tradicionalmente asociados con el desarrollo de adenocarcinoma gástrico distal (Edad, género, hacinamiento, consumo de alcohol, sobrepeso, e historia de cáncer gástrico familiar) se asociaron significativamente con la presencia de atrofia. Mientras factores como la cantidad de *H. pylori* en la mucosa gástrica y la inflamación asociada no mostraron ninguna asociación con atrofia, sugiriendo que los factores ambientales y del hospedero son determinantes claves en la progresión hacia atrofia gástrica dentro de la población. Una posible explicación es que la bacteria reduce su interacción con el hospedero para evitar la progresión desde una gastritis asintomática a una seria destrucción del tejido (atrofia) que afecte su microambiente.

Cabe destacar que la edad a partir de los 40 años, el género masculino, y un bajo consumo de alcohol fueron factores asociados comunes para la adquisición de la infección por *M. tuberculosis* y el desarrollo de atrofia en este estudio. Por lo que este grupo de individuos debe ser considerado de alto riesgo para la adquisición de la infección por *M. tuberculosis* y *H. pylori*, y sus complicaciones asociadas.

6 CAPÍTULO 3. EFECTO DE LA INFECCIÓN SIMULTÁNEA CON *H. pylori* Y SU VIRULENCIA SOBRE LA RESPUESTA INMUNE A *M. tuberculosis*

H. pylori y *M. tuberculosis* son los patógenos bacterianos más prevalentes a nivel mundial. En muchas poblaciones principalmente de países en desarrollo, estas infecciones comunes coexisten interactuando con el sistema inmune del hospedero sin causar daño en la mayoría de los infectados. Casi nada se sabe acerca del entrecruzamiento de estas infecciones. Por lo anterior, uno de los objetivos del presente trabajo fue evaluar el efecto de la infección simultánea con *H. pylori* y su virulencia sobre la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis*. Se analizaron muestras de 94 individuos con infección tuberculosa latente sometidos a endoscopia y venopunción. Las biopsias gástricas y muestras de sangre, se emplearon para aislamiento de *H. pylori*, obtención de ADN y células mononucleares de sangre periférica (PBMC). A partir del ADN bacteriano y genómico obtenido, se realizaron estudios de genotipificación de *H. pylori*. Un subgrupo de muestras de PBMCs de 17 individuos coinfectados por *H. pylori* y 14 sin coinfección, se emplearon para caracterizar los perfiles inmunes de 11 citocinas (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IP-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, IFN- γ , y TNF- α) y su respuesta a antígenos micobacterianos después de 72 horas de estímulo. Muestras de heces se emplearon para diagnóstico de helmintos intestinales. La prevalencia de genotipos de alta virulencia fue del 100 % (7/7) en individuos con gastritis atrófica, y del 50 % (32/64) en individuos sin atrofia. El alelo *vacA m1* mostró una alta prevalencia en individuos con atrofia ($p=0.038$). El nivel de inflamación y las lesiones histopatológicas en la mucosa gástrica mostraron relación con la virulencia bacteriana ($p<0.05$). En los 31 individuos seleccionados para estudios de perfil inmune, la coinfección con *H. pylori* específicamente con genotipos de alta virulencia, se asoció con una reducción en los niveles de IP-10 ($p=0.04$), y una tendencia hacia la reducción en los niveles de IFN- γ e IL-2. El análisis de componentes principales (CP) generó 3 componentes. El CP1 compuesto por IFN- γ , IL-2, IL12p70 e IL-13. El CP2 compuesto por IL-10, TNF- α e IL-1 β , y el CP3 compuesto por IL-17 e IP-10. El promedio de las puntuaciones obtenido para el CP1, evidenció que los individuos coinfectados por *H. pylori* en comparación con los individuos sin coinfección, presentaron un puntaje promedio menor. Para el CP2, las puntuaciones entre ambos grupos no mostraron diferencias. El genotipo bacteriano no se asoció con ninguno de los dos componentes. Ningún individuo presentó helmintos coinfectantes. Estos hallazgos sugieren que la coinfección por *H. pylori* se asocia con una reducción en la respuesta del IFN- γ , IL-2 e IP-10 frente antígenos micobacterianos que parece estar influenciada por la virulencia bacteriana. Esto podría modificar el riesgo de progresión a tuberculosis activa con importantes implicaciones para el control de la enfermedad.

6.1 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.1 Diseño del estudio y población

Aislados de *H. pylori*, biopsias gástricas, y muestras de sangre obtenidas a partir de 94 individuos con infección tuberculosa latente, y síntomas de dispepsia, se emplearon para la extracción del ADN, y la obtención de PBMCs. A partir del ADN bacteriano y genómico obtenido, se realizaron estudios de genotipificación. 31 muestras de PBMCs correspondientes a 17 individuos *H. pylori*-positivo y 14 individuos *H. pylori*-negativo se seleccionaron para la caracterización de perfiles inmunológicos (**Figura 9**).

6.1.2 Métodos de biología molecular

6.1.2.1 Extracción de ADN a partir de aislados de *H. pylori*

A partir de cultivos puros obtenidos de biopsias gástricas, se tomaron colonias únicas con un asa de transferencia o hisopos de algodón, y se lavaron en tubo de 1.5 mL con 200 µL de solución salina normal estéril (0.89 %). El contenido de los tubos se homogenizó en un vórtex por 10 segundos y se centrifugó en una microcentrifuga universal 320R (Hettich Inc, Tuttlingen, Alemania) a 13.000 rpm por 2 minutos a 4°C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet bacteriano en 300 µL de buffer de lisis (3 µL de Tris HCL 1M, pH 8.0 (Promega®, Madison, WI, Estados Unidos), 3 µL de EDTA 0.5 M (Calbiochem®, Gibbstown, NJ, Estados Unidos), 15 µL de SDS 10 % (Calbiochem®, Gibbstown, NJ, Estados Unidos), 3 µL de proteinasa K (10 mg/mL) (Invitrogen®, Carlsbad, CA, Estados Unidos) y 276 µL de agua destilada) y se incubó en un bloque seco (Labnet®, Edison, NJ, Estados Unidos) a 56°C por 18 horas. A continuación, se inactivó la proteinasa K por calentamiento a 70°C por 10 minutos, y se adicionó 120 µL de NaCl 5M (Calbiochem®, Gibbstown, NJ, Estados Unidos), se homogenizó por vórtex y se centrifugó por 5 min a 13.000 rpm, el sobrenadante fue transferido a otro tubo en el cual se adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto (Mallinckrodt®, St.Louis, MO, Estados Unidos), una vez más se centrifugó a 13.000 rpm por 20 minutos, a continuación se descartó el sobrenadante, y se agregó 200 µL de etanol al 70 %. Nuevamente se centrifugó por 5 minutos a 10.000 rpm, y luego se descartó el sobrenadante. Cada tubo se dejó secar por inversión a temperatura ambiente. Finalmente, se adicionaron 50 µL de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 (Promega®, Madison, WI, Estados Unidos), EDTA 1 mM, pH 8.0 (Calbiochem®, Estados Unidos), y se almacenó el ADN a -20°C. La cantidad y la pureza del ADN bacteriano, se determinó por lectura de densidad óptica a 260/280 nm en espectrofotómetro (NanoDrop One® ThermoFisher Scientific, Estados Unidos) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

6.1.2.2 Extracción de ADN genómico a partir de biopsias gástricas

Solo para aquellos individuos *H. pylori*-positivo por histología que no presentaron crecimiento bacteriano en cultivo para ninguna de las tres biopsias gástricas (No.1, No.7 y No.9), se procedió a la extracción de ADN genómico a partir del macerado de biopsia gástrica que se conservó en cada caso durante el procedimiento de cultivo y aislamiento primario descrito en el capítulo 2 (sección 5.1.3.4, página). El ADN fue extraído siguiendo el mismo protocolo de digestión con proteinasa K, y precipitación con etanol empleado para colonias bacterianas.

6.1.2.3 Marcadores de virulencia para *H. pylori*

Para caracterizar la virulencia de los aislados de *H. pylori*, se llevaron a cabo reacciones de PCR por separado para los genes *vacA*, *cagA*, y motivos EPIYA.

6.1.2.4 Amplificación de la región *s* del gen *vacA*

Para amplificar la región *s* del gen *vacA* que codifica el péptido señal, se utilizaron los cebadores VA1F (5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3') y VA1R (5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3') que amplifican un fragmento de 259 pb (alelo *s1*) y 286 pb (alelo *s2*) (292). La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Swift MiniPro™, Esco Technologies, Hatboro, PA, Estados Unidos) en volumen final de 25 µL conteniendo: 5 µL de Buffer de PCR (10 mM de Tris-HCl pH 8.0 y 50 mM de KCl- Promega®, Madison, WI, Estados Unidos), 0.2 mM de dNTPs (desoxirribonucleosídeos 5'-trifosfato – dATP, dCTP, dGTP y dTTP – Promega®), 25 pmol de cada oligonucleótido, 1.5 mM de MgCl₂ y 1 U Go *Taq* polimerasa (Promega®, Madison, WI, Estados Unidos). Al final de la mezcla, se adicionó 1 µL de ADN. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos, seguida de 45 ciclos de: 95°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto y 72 °C por 1 minuto, seguido por una extensión final de 5 minutos a 72°C. En cada experimento, se incluyeron como controles positivos cepas de *H. pylori* que han sido aisladas de pacientes con gastritis crónica y confirmadas por secuenciación, PZ5085 (*vacA s2*) y PZ5080 (*vacA s1*).

6.1.2.5 Amplificación de la región *m* del gen *vacA*

Para la detección de la región *m* del gen *vacA* que codifica para la subunidad p55 de la proteína VacA, se emplearon los cebadores HPMGF (5'-CACAGCCACTTT CAATAACGA-3') y HPMGR (5'-CGTCAAATAATTCCAAGGG-3') que resultaron en la amplificación de un fragmento de 401 pb (alelo *m1*) y 476 pb (alelo *m2*) (293). La reacción de PCR, se llevó a cabo en un termociclador (Swift MiniPro™, Esco Technologies, Hatboro, PA, Estados Unidos) a volumen final de 25 µL conteniendo: 5 µL de Buffer de PCR (10 mM de Tris-HCl pH 8.0 y 50 mM de KCl- Promega®, Madison, WI, Estados Unidos), 0.2 mM de dNTPs (desoxirribonucleosídeos 5'-trifosfato – dATP, dCTP, dGTP y dTTP – Promega®, Madison, WI, Estados Unidos),

25 pmol de cada oligonucleótido, 1.5 mM de MgCl₂ y 1 U Go *Taq* polimerasa (Promega®, Madison, WI, Estados Unidos). 1 µL de ADN fue adicionado en cada reacción. El programa de amplificación consistió en 9 minutos de pre-incubación a 94°C, seguido por 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 45 segundos y 72°C por 45 segundos. Posteriormente se realizó una extensión final a 72 °C por espacio de 5 minutos. En cada experimento, se incluyeron como controles positivos las cepas de *H. pylori* Tx30a (ATCC 51932) y ATCC 43504 que corresponden a los alelos *m2* y *m1*, respectivamente.

6.1.2.6 Amplificación del extremo 5' del gen *cagA*

Con el fin de detectar la presencia del islote de patogenicidad *cag*, se amplificó el gen terminal en el islote el *cagA*, comúnmente usado como marcador para el locus *cag* completo (101). Se emplearon los cebadores *cagAF* (5'-TTGACCAACAACCACAAACCGAAG-3') y *cagAR* (5'-CTTCCCTTAATTGCGAGATTCC-3') que amplificaron un fragmento de 183 pb del extremo 5' del gen *cagA* (293). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µL de una solución compuesta por 50 pmol de cada cebador, 0.2 mM dNTP (Promega®, Madison, WI, Estados Unidos), 1.5 mM de MgCl₂ y 0.5 U de Go *Taq* DNA polimerasa (Promega®, Madison, WI, Estados Unidos) y 1 µL del ADN extraído a partir de los aislados de *H. pylori*. El programa de PCR, se desarrolló en un termociclador automático (Swift MiniPro™, Esco Technologies, Hatboro, PA, Estados Unidos) comprendiendo una desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos, seguido por 45 ciclos de: 95°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, seguido por una extensión final de 5 minutos a 72°C. En cada experimento, se incluyó un control negativo, en este caso ADN de la cepa de referencia *H. pylori* Tx30a (ATCC 51932), y un control positivo cepa *H. pylori* 26695 (ATCC 700392).

6.1.2.7 Evaluación de la ausencia del *cag* PAI por PCR sitio-vacío

Los aislados negativos para el gen *cagA* fueron en todos los casos confirmados por PCR *cag* sitio-vacío “empty-site” empleando los cebadores ES-F (5'-AAGAGAGAGTGG TGCGAT-3') y Rnew-1R (5'-TCATGCGAGCGGCGATGTG-3'), al detectarse un fragmento de 106 pb que indica la pérdida del *cag* PAI (294). La reacción de PCR se realizó en un termociclador (Swift MiniPro™, Esco Technologies, Hatboro, PA, Estados Unidos), y consistió en una mezcla de 0.6 U de Hot start Gold *Taq* polimerasa (Roche®), 2 µL de tampón de PCR 10X (10 mM de Tris-HCl pH 8.0, 50 mM de KCl y 1.5 mM MgCl₂ Roche®), 0.3 mM de dNTP y 0.3 µM de cada oligonucleótido forward y reverse, y 1 µL de ADN en un volumen final de 20 µL. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 15 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 54°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, seguida de una extensión final a 72°C por 5 minutos. En cada experimento, se incluyó como control positivo la cepa de referencia *H. pylori* Tx30a (ATCC 51932), control negativo la cepa *H. pylori* 26695 (ATCC 700392), junto con controles de inhibición de cada muestra. Estos últimos, utilizados para descartar resultados

falsos negativos y, consisten en reacciones que contienen ADN de las muestras problema contaminados con ADN de *H. pylori* del control positivo.

6.1.2.8 Amplificación de la región variable 3' del *cagA*

Para confirmar la presencia del *cag* PAI, y caracterizar el número de motivos EPIYA presentes en la región variable 3' del gen *cagA*, se realizó una reacción de PCR utilizando los cebadores *cagA*2530S y *cagA*3000AS que delimitan una región entre las posiciones 582453 a 582977 con referencia al genoma de la cepa *H. pylori* 26695 (121). La amplificación se realizó en un termociclador (Swift MiniPro™, Esco Technologies, Hatboro, PA, Estados Unidos) en un volumen final de reacción de 50 µL que contenía 10 mM Tris, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 U de Go *taq* polimerasa (Promega®, Madison, WI, Estados Unidos), 200 µM de dNTPs, 0.5 µM de cada cebador, y 2 µL de ADN. Las condiciones de la PCR incluyeron un paso inicial de desnaturalización 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 50°C por 45 segundos, y 72°C por 45 segundos, y una extensión final de 72°C por 5 minutos. En aquellos casos en los que no se evidenció una banda clara o presencia de amplificado, se realizó una segunda PCR bajo las mismas condiciones, empleando 1 µL del amplificado inicial, junto con los respectivos controles para detectar posible contaminación cruzada. Durante el desarrollo de los ensayos, se utilizaron las cepas 26695 (ATCC 700392) (número de acceso AE000511.1) como control de tamaño de la secuencia nucleotídica que codifica para tres motivos EPIYA-ABC (470 pb ± 25 pb), y la cepa ATCC 43504 que presenta un motivo EPIYA-ABCCC (670 pb ± 25 pb), así la predicción del número de repeticiones de los motivos EPIYA fue posible por comparación directa de los tamaños correspondientes a los amplificados de PCR.

6.1.2.9 Electroforesis de los amplificados

Todos los amplificados obtenidos en cada una de las reacciones de PCR descritas anteriormente, se corrieron en un gel de agarosa (SeaKim®, FMC Biolabs) al 2 %, teñida con 2 µL de SYBR™ Safe DNA (Thermo Fisher Scientific Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos) en una cámara de electroforesis (Fotodyne Inc, Hartland, WI, Estados Unidos) a un voltaje de 75 V por 40-50 minutos proporcionado por una fuente de poder EC 105 (Thermo Fisher Scientific Inc, Asheville, NC, Estados Unidos). Los amplificados fueron visualizados en un transiluminador Safe Imager™ Blue Light (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) a una intensidad de 470 nm.

6.1.2.10 Clasificación de la virulencia bacteriana

El genotipo de las cepas de *H. pylori* presentes en cada participante, se clasificó con base a la combinación de los marcadores *cagA*+, *cagA* sitio-vacío, y *vacA* alelos *m* y *s*. Lo que permitió, identificar 10 diferentes combinaciones de genotipos (**Anexo 6**). La positividad para el gen *cagA* fue un indicador de actividad citotóxica. Mientras la positividad para el PCR sitio-vacío indicó la ausencia del islote *cag*, y por tanto,

la carencia de actividad citotóxica. Para el gen *vacA*, se consideraron las cepas *vacA s1/m1* con actividad vacuolizante completamente activa, las cepas *vacA s2/m2* carentes de actividad vacuolizante, y las cepas *vacA s1/m2* y *s2/m1* con actividad vacuolizante intermedia. La presencia de cada marcador genético fue graduada basado en sus efectos sobre líneas celulares según lo reportado en la literatura (**Tabla 18**) (28, 295). Este sistema de graduación permitió construir una escala para clasificar la virulencia en 3 categorías: alta (6+), intermedia (5+ a 4+), y baja (3+ a 1+). En los casos con infección por múltiples cepas de *H. pylori*, se consideró la categoría mayor para determinar la virulencia de cepa infectante (**Anexo 6**).

Tabla 18. Sistema de graduación para los factores de virulencia *cagA* y *vacA* basada en sus efectos a nivel celular

Marcador genético	*Actividad celular
<i>cagA</i>	
Positivo	++
Negativo	-
<i>vacA</i>	
<i>m1</i>	++
<i>m2</i>	+
<i>s1</i>	++
<i>s2</i>	-

+Magnitud del efecto, - sin efecto
 *Actividad: efectos perjudiciales de la proteína sobre las células epiteliales.

6.1.3 Métodos de inmunología

6.1.3.1 Aislamiento y preservación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Tres viales de 4 mL de sangre completa con EDTA por paciente fueron sometidos a centrifugación a 1200 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente para la obtención de plasma, el cual se recuperó y almacenó en tubos de 1.5 mL a -80°C para posteriores estudios. La fase celular restante, se diluyó en medio RPMI 1640 con L-glutamina y bicarbonato de sodio (Sigma Aldrich, Milwaukee, WI, Estados Unidos) a una proporción 1:1. Posteriormente, se adicionó 2 mL de Ficoll-Histopaque® (Sigma Aldrich, Milwaukee, WI, Estados Unidos), y se centrifugó a 2000 rpm por 25 minutos a temperatura ambiente. Las células mononucleares se recuperaron de la interfase, y se resuspendieron en 4 mL de RPMI seguido por una centrifugación a 1500 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se descartó, y el botón celular fue resuspendido en 1 mL de RPMI con 10 % de Suero fetal bovino inactivado (SFB) (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc, Asheville, NC, Estados Unidos). A continuación, se realizó un recuento y evaluación de la viabilidad celular con azul de tripan al 0.4 % en cámara de Neubauer. Posteriormente, se adicionó 1

a 2 mL de medio de preservación conteniendo SFB + 20 % Dimetilsulfoxido (DMSO) (Sigma Aldrich, Milwaukee, WI, Estados Unidos) ajustando la concentración final entre $3 \text{ a } 5 \times 10^6$ células por mL. Cada 1 mL de la suspensión celular, se alícuotó en tubos criogénicos que se almacenaron en nitrógeno líquido.

6.1.3.2 Descongelamiento de PBMCs

Los crioviales a emplear preservados en nitrógeno líquido fueron colocados en baño maría 37°C por algunos minutos, evitando su descongelación total. A continuación 1 mL de suero fetal bovino inactivado por calor (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc, Asheville, NC, Estados Unidos) fue adicionado al criovial, y el contenido del tubo fue colocado en un tubo de 15 mL (Falcon™, Fisher Scientific, Estados Unidos). Posteriormente, se adicionaron 10 mL de RPMI 1640 con L-glutamina y bicarbonato de sodio (Sigma Aldrich, StLouis, MO, Estados Unidos), se centrifugó a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C, y el sobrenadante fue descartado. Este paso se repitió una vez más. El botón celular obtenido, se resuspendió en 1 mL de medio RPMI 1640, y se homogenizó por pipeteo. Finalmente, se realizó un recuento y evaluación de la viabilidad celular con azul de tripán al 0.4 %.

6.1.3.3 Antígenos

Como estímulo antigénico se emplearon proteínas filtradas del cultivo (CFP) de *M. tuberculosis* cepa H37Rv (No. NR-14825, BEI Resources, Estados Unidos) que contenían la mayoría de las proteínas secretadas, y la proteína recombinante de secreción temprana 6 (ESAT-6) de *M. tuberculosis* (No. NR-49424, BEI Resources, Estados Unidos). El activador policlonal de linfocitos T, fitohemaglutinina-P (PHA-P) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) fue usado como control positivo, y se incluyó un control sin estímulo (medio RPMI completo) para cada individuo. Las concentraciones finales a emplear fueron 20 µg/mL para CFP y ESAT-6, y 10 µg/mL para PHA.

6.1.3.4 Estandarización del tiempo óptimo de incubación para los antígenos y el mitógeno empleado

Para estandarizar las condiciones de cultivo de los PBMCs, se seleccionó un participante con un adecuado recuento de PBMCs, sus células se descongelaron, y se ajustaron a una densidad de 3.2×10^6 células en un volumen de 800 µL empleando medio RPMI 1640 completo (Sigma Aldrich, Milwaukee, WI, Estados Unidos) suplementado con 1X antibióticos (penicilina/estreptomicina) (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc, Asheville, NC, Estados Unidos), 20 % de SFB inactivado por calor (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc, Asheville, NC, Estados Unidos), 1 % de aminoácidos no esenciales (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc, Asheville, NC, Estados Unidos), y 1 % de piruvato de sodio (Sigma Aldrich, Milwaukee, WI, Estados Unidos). Un volumen de 100 µL de la suspensión (4×10^5 células) fue adicionado en 8 pozos repartidos en dos filas (4 pozos por fila) de una

microplaca para cultivo celular de 96 pozos fondo redondo (Celltreat®, Scientific products, Estados Unidos). Posteriormente, 100 µL de cada antígeno (RPMI solo, CFP, ESAT-6 y PHA) fueron adicionados a cada pozo por fila para completar un volumen final de 200 µL por pozo. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5 %, y 100 % de humedad durante 48, 72, 96 y 120 horas.

La primera fila se empleó para monitorear el crecimiento celular a 48 y 72 horas, y la segunda fila para monitorear el crecimiento a 96 y 120 horas. Pasadas 48 horas, se retiró la microplaca de la incubadora, y se observó la proliferación celular en un microscopio de campo invertido, 100 µL del sobrenadante de cada pozo de la primera fila fueron recolectados y dispuestos en una nueva microplaca de 96 pozos, el cual fue cubierto y almacenado a -70°C. A las 72 horas, se retiró la microplaca de la incubadora, y se retiraron 90 µL del sobrenadante restante de cada pozo de la primera fila, y se almacenaron en la microplaca previamente congelada a -70°C, los 10 µL del sobrenadante restante, se emplearon para recuento y evaluación de viabilidad celular con azul de tripán 0.4 %. Después de 96 horas, se retiró la microplaca de la incubadora, y se observó la proliferación celular en el microscopio de campo invertido, 100 µL del sobrenadante de cada pozo de la segunda fila fueron recolectados, y dispuestos en el plato de 96 pozos junto con los otros sobrenadantes previamente almacenados.

Finalmente, a las 120 horas la microplaca fue retirada de la incubadora, y se retiraron 90 µL del sobrenadante de cada pozo de la segunda fila, los cuales se almacenaron a -70°C, y los 10 µL del sobrenadante restante se emplearon para recuento y evaluación de viabilidad celular con azul de tripán 0.4 %. Los sobrenadantes almacenados, se emplearon para un ensayo inmuno-enzimático de IFN-γ.

6.1.3.4.1 Elisa cuantitativo para IFN-γ

El IFN-γ una citocina clave en la respuesta inmune frente antígenos micobacterianos (75) fue medido en sobrenadantes de cultivo celular incubados 24, 48, 72 y 120 horas. Se seleccionó el IFN-γ para los ensayos de estandarización por ser una citocina producida por linfocitos NK en la respuesta innata, y por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en la respuesta inmune celular, y en conjunto estas células con los linfocitos B constituyen la principal proporción celular (70-90 %) presente en PBMC (296), por lo que, se esperó detectar concentraciones medibles de esta citocina en los retos antigénicos previamente realizados.

Para el ensayo se empleó un kit de ELISA comercial para IFN-γ humana (KHC4021, Invitrogen, Frederick, MD, EEUU) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Inicialmente, se adicionaron 50 µL de la solución de incubación a todos los pozos de la microplaca que se emplearon, a excepción de los pozos para el blanco del cromógeno. Luego, se adicionó 50 µL de la solución para dilución de estándares a los pozos para el blanco. Diluciones seriadas (1:2) de un estándar de IFN-γ de 1000

pg/mL se emplearon para crear una curva estándar de 7 puntos con el límite inferior a 15.6 pg/mL. 50 µL de los estándares, muestras, y controles fueron adicionados a los pozos respectivos. Luego, 50 µL de IFN-γ humano conjugado con biotina fueron adicionados a cada pozo, excepto los pozos para el blanco del cromógeno. La microplaca se cubrió, y agitó por 4 minutos en un agitador, luego se incubó por 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, los pozos fueron lavados con 400 µL de solución de lavado, tres veces. Se adicionaron 100 µL de estreptavidina peroxidasa a los pozos excepto los pozos para el blanco del cromógeno, y se incubó por 45 minutos a temperatura ambiente. Esta solución fue removida, y se lavaron los pozos con 400 µL de solución de lavado, tres veces. Luego, se adicionaron 100 µL de estabilizador de cromógeno (Tetrametilbenzidina) a todos los pozos, y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

Finalmente, 100 µL de solución de parada fueron adicionados a todos los pozos, y se midió la absorbancia de cada pozo empleando un lector de ELISA (Stat Fax-2100, Awareness Technology INC, Estados Unidos) con un filtro de 450 nm. A la absorbancia obtenida en cada pozo conteniendo estándares, muestras y controles, se sustrajo la absorbancia de fondo, y a partir de las absorbancias obtenidas para los estándares se realizó una regresión lineal que permitió interpolar la concentración de IFN-γ en pg/mL para cada muestra. La cantidad mínima detectable de este ensayo fue de 4 pg/mL. Se observó que, entre las 72 y 96 horas de incubación, se detectó la mayor producción de IFN-γ, específicamente CFP funcionó mejor a las 72 h, mientras ESAT-6 funcionó mejor a las 96 h. A las 120 h la producción de esta citocina mostró un descenso en su producción frente a los tres antígenos (CFP, ESAT-6 y PHA).

6.1.3.5 Cultivo y estimulación antigénica de PBMCs

Después de estandarizar, y definir las condiciones óptimas para el cultivo de los PBMCs, se seleccionaron 31 individuos (17 *H. pylori*-positivo y 14 *H. pylori*-negativo) todos con infección tuberculosa latente. Los PBMCs de los individuos seleccionados fueron descongelados, y se ajustaron a una densidad de 2.8×10^6 células en un volumen de 700 µL empleando medio RPMI 1640 completo (Sigma Aldrich, Milwaukee, WI, Estados Unidos) suplementado con 1X antibióticos (penicilina/estreptomicina) (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc, Asheville, NC, Estados Unidos), 20 % de SFB inactivado por calor (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc, Asheville, NC, Estados Unidos), 1 % de aminoácidos no esenciales (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc, Asheville, NC, Estados Unidos). Un volumen de 100 µL de la suspensión (conteniendo 4×10^5 células) fue agregado en 6 pozos por fila para cada individuo empleando microplacas de cultivo celular de 96 pozos fondo redondo (Celltreat®, Scientific products, Estados Unidos). Posteriormente, 100 µL de cada antígeno (RPMI solo, CFP 20 µg/mL y PHA 10 µg/mL) fueron adicionados por duplicado a los pozos por cada fila, completando un volumen final de 200 µL por

pozo. Las microplacas con la suspensión celular, se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5 %, y 100 % de humedad durante 72 y 96 horas.

Por cada microplaca, PBMCs de 4 a 6 individuos fueron cultivados. A las 72 horas, se retiraron las microplacas de la incubadora, y se observó la proliferación celular en un microscopio de campo invertido, 100 µL del sobrenadante en cada pozo por fila fueron recolectados y dispuestos en microplacas nuevas de 96 pozos e igualmente por filas, las cuales fueron cubiertas y almacenadas a -70°C. Después de 96 horas, se retiraron nuevamente las microplacas de la incubadora, y se recolectaron 90 µL del sobrenadante restante de cada pozo por fila, y se almacenaron en nuevas microplacas de 96 pozos por filas, las cuales fueron cubiertas y almacenadas a -70°C.

6.1.3.6 Estudio de perfiles de citocinas

Para estandarizar los ensayos, los sobrenadantes obtenidos a partir de los cultivos celulares estimulados y sin estimular por 72 y 96 horas de dos individuos (LTBI+/H. pylori+) seleccionados aleatoriamente fueron descongelados, y se prepararon para análisis en la plataforma LUMINEX®MAP empleando un kit personalizado con perlas magnéticas recubiertas (Milliplex®MAP, Millipore, Bellerica, MA, Estados Unidos) para detección de citocinas y quimiocinas en humanos de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los analitos analizados fueron: IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IP-10 (CXCL10), IL-12p70, IL-13, IL-17, IFN-γ, y TNF-α basados en estudios previos (20, 33, 297), y por su papel en las infecciones estudiadas. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Inicialmente, se adicionó 200 µL de solución de lavado en cada pozo de una microplaca con filtro (MultiScreen®, Millipore, Irlanda), se selló y se mezcló en un agitador de placas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó la solución de todos los pozos empleando una unidad de filtración al vacío (MultiScreen®HTS, Millipore, Irlanda). Diluciones seriadas (1:5) de un estándar de citocinas humanas de 10.000 pg/mL, se empleó para crear una curva logística de 5 parámetros (5PL) con el límite inferior a 3.2 pg/mL. A continuación, 25 µL de cada estándar, y de los controles de calidad fueron adicionados a los pozos respectivos. Luego, 25 µL del buffer de ensayo fueron adicionados a los pozos para las muestras. Posteriormente, se adicionó 25 µL en cada pozo de las perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos específicos para cada citocina previamente mezcladas en partes iguales. La microplaca se cubrió, y se agitó toda la noche en un agitador orbital de placas (Flask dancer, Boekel Scientific, Feasterville, PA, Estados Unidos) a 4°C.

A las 24 horas, se retiró el contenido de los pozos, y se lavó la microplaca con 200 µL de tampón de lavado dos veces, y el contenido fue removido por filtración al vacío. Luego, se adicionó 25 µL del anticuerpo de detección en cada pozo, la microplaca fue cubierta con papel aluminio, y se incubó en agitación por 1 hora a

temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó 25 μ L de estreptavidina-ficoeritrina a los pozos. La microplaca fue nuevamente cubierta con papel aluminio, y se incubó en agitación por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se retiró el contenido de los pozos, y se lavó la microplaca con 200 μ L de tampón de lavado dos veces, y el contenido fue removido por filtración al vacío. Finalmente, 150 μ L del fluido de revestimiento (Luminex® Sheath fluid, EMD Millipore, Estados Unidos) se adicionaron a todos los pozos, y la microplaca se agitó por 5 minutos en un agitador orbital. La adquisición de los resultados, se realizó en un lector Luminex® 200™ (Luminex, Estados Unidos) con el software xPONENT® (Luminex, Estados Unidos) que midió la intensidad de fluorescencia media (MFI) para cada citocina en cada pozo conteniendo estándares, controles de calidad y muestras, y los expresó en pg/mL empleando una curva logística de 5 parámetros (5PL) con una ponderación $1/Y^2$ construida a partir de las concentraciones conocidas de los estándares.

Se observó que las concentraciones de IFN- γ , IL-13, IL-10, IL-2, IL-12p70, e IP-10 (CXCL10) en sobrenadantes de PBMCs estimulados por 72 horas o 96 horas presentaban niveles detectables y con diferencias mínimas. Mientras los niveles de IL-1 β aumentaron, y los niveles de TNF- α se redujeron con el tiempo. En contraste, los niveles de IL-4, IL-5, e IL-17 se encontraron por debajo de los límites de detección para ambos tiempos de incubación. A partir de estos resultados, se seleccionaron los sobrenadantes obtenidos a las 72 horas con estímulo y sin estímulo antigénico de los 29 individuos restantes para análisis en la plataforma LUMINEX®MAP siguiendo las condiciones anteriormente descritas.

6.1.3.7 Análisis sanguíneos

Para descartar cualquier posible alteración de los parámetros hematológicos y del estado de hierro que pueda estar asociada con infecciones crónicas (298) e influencie los hallazgos, se realizó un conteo sanguíneo completo usando un analizador automatizado de hematología Sysmex XT 1800i (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) que utiliza los principios de la citometría de flujo para los conteos celulares. Además, se determinó la concentración de ferritina sérica por un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia, y la concentración de hierro sérico y transferrina por inmunoturbidometría.

6.1.3.8 Diagnóstico de parásitos intestinales

Considerando la posible polarización de la respuesta inmune hacia un perfil Th2 asociado con la infestación por parásitos intestinales principalmente helmintos (88), fue necesario evaluar esta condición en los 31 individuos seleccionados para estudios de perfil inmune. Muestras de materia fecal, se emplearon para examen directo, concentración y tinción tricromica.

6.1.3.9 Plan de análisis estadístico

Se realizó un análisis univariado, y se comprobó la normalidad de los datos cuantitativos (puntaje histopatológico) mediante la prueba de Shapiro-Wilk, encontrándose que no se distribuían en forma normal, por lo que se recurrió a la estadística no paramétrica. En el análisis bivariado para muestras no relacionadas, las variables continuas se describieron como promedios con su respectiva desviación estándar, y las variables categóricas como proporciones. Para estudiar la asociación entre la virulencia de *H. pylori* y el puntaje histopatológico de Correa, se empleó una ANOVA de Kruskal-Wallis, y las comparaciones múltiples se realizaron mediante la prueba de Dunn sin ajustar los valores de significancia. Se empleó una prueba de X^2 o una prueba exacta de Fisher para estudiar las diferencias entre cada una de las variables independientes (genotipo, virulencia, tipo de colonización y número de repeticiones EPIYA de *H. pylori*) y el tipo de gastritis crónica e inflamación en mucosa gástrica. Las diferencias en las proporciones de detección del islote de patogenicidad *cag* por PCR *cagA* y PCR-EPIYA en individuos coinfectados por *H. pylori* se evaluó mediante una prueba X^2 .

Los niveles de citocinas y quimiocinas en respuesta antígenos de *M. tuberculosis* o PHA y un control con RPMI por cada individuo fueron normalizados para los análisis estadísticos usando logaritmo base 10 (*Log*), los valores por debajo de 1, fueron codificados como 1. Para cada individuo la concentración de citocina en el pozo sin estimular fue sustraída de la respuesta de la citocina en los pozos estimulados por el antígeno, $\text{Log}(\text{antígeno}) - \text{Log}(\text{nulo})$, expresados como Log pg/mL . Para cada citocina, se comparó el promedio de su concentración según el estado infeccioso frente a *H. pylori* y la virulencia bacteriana empleando una prueba *t*-student y una ANOVA de un factor. Se realizaron comparaciones múltiples para la variable (virulencia) empleando la prueba de Dunnett. La interpretación de los valores *p* sin ajustar, se realizó basado en la comparación de los grupos de alta, media y baja virulencia con el grupo de referencia (*H. pylori*).

Se empleó un análisis de componentes principales (ACP)(299) para caracterizar la inter-correlación de la respuesta de las citocinas dentro de la población de estudio, y obtener perfiles de agrupación. El ACP se realizó a partir de la matriz de correlación (variables estandarizadas a media= 0, y desviación estándar= 1) por lo que la contribución de las variables individuales no fue influenciada por su varianza. La medida de adecuación muestral de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) y la prueba de esfericidad de Bartlett proporcionaron los estándares mínimos para llevar a cabo el APC.

Para facilitar la interpretación de la solución factorial se empleó un método de rotación ortogonal Varimax. La selección de componentes se realizó siguiendo el criterio de Kaiser (conservar los factores con autovalores >1) lo que permitió obtener una solución de 3 componentes. Las puntuaciones factoriales de los individuos en cada uno de los factores resultantes resumió la información contenida en las

variables originales. Los dos primeros componentes con autovalores >1 , se seleccionaron para su representación gráfica. El promedio de las puntuaciones estandarizadas para cada componente fue comparado entre los individuos con y sin coinfección por *H. pylori* mediante una prueba *t*-student. La significancia estadística fue aceptada con un valor $p \leq 0.05$ a dos colas. El análisis de datos fue realizado con el paquete estadístico SPSS 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos) y GraphPad Prism 7 (GraphPad software Inc., San Diego, CA, Estados Unidos).

6.2 RESULTADOS

6.2.1 Caracterización de la virulencia de *H. pylori* y su distribución según el tipo de gastritis

En el 91.0 % (71/78) de los individuos con infección tuberculosa latente positivos para la infección por *H. pylori* fue posible la caracterización de los genes de virulencia *cagA* y *vacA* de las cepas de *H. pylori* coinfectantes. Los resultados de la genotipificación son mostrados en la **Tabla 19**. La prevalencia de genotipos de alta virulencia fue del 100 % (7/7) en individuos con gastritis atrófica, mientras sólo el 50 % (32/64) de los individuos con gastritis no atrófica presentaron genotipos de alta virulencia ($p=0.041$). La prevalencia del marcador *cagA*⁺ y *cagA*⁻ en las cepas de *H. pylori* de individuos con gastritis atrófica y no atrófica no mostró diferencias significativas ($p=0.764$). Sin embargo, la presencia conjunta de estos dos marcadores permitió evidenciar una alta prevalencia de infección mixta en individuos con atrofia y sin atrofia (85.7 % vs 79.7 %, respectivamente, $p=0.704$).

El alelo *s1* del gen *vacA* se encontró en alta prevalencia en individuos con atrofia en comparación con los individuos sin atrofia (100 % vs 64.5 %) aunque estas diferencias no fueron significativas ($p=0.088$). Mientras el alelo *m1* del gen *vacA* que igualmente se encontró en una alta prevalencia en individuos con gastritis atrófica en comparación con los individuos sin atrofia (100 % vs 56.7 %, respectivamente) sí mostró diferencias significativas ($p=0.038$). En los individuos colonizados por una sola cepa de *H. pylori*, el genotipo *cagA*⁺; *vacA s1/m1* fue el más prevalente, estando presente en 71.4 % (10/14) de las muestras. En los individuos con colonización múltiple, el genotipo *cagA*⁺; *vacA s1/m1* y *cagA*⁻; *vacA s1/m1* fue el más prevalente estando presente en 50.9 % (29/57) de las muestras (**Anexo 6**).

Tabla 19. Prevalencia de genotipos de *H. pylori* según el tipo de gastritis en individuos LTBI coinfectados por *H. pylori* (n= 71)

Genotipo	Gastritis atrófica (n = 7)		Gastritis no atrófica (n = 64)		p
	n	%	n	%	
cagA					
cagA +	1	14.3	13	20.3	0.764
cagA -	0	0.0	3	4.7	
cagA +/-	6	85.7	48	75.0	
vacA s[§]					
s1	7	100	40	64.5	0.088*
s2	0	0.0	22	35.5	
vacA m[†]					
m1	7	100	38	56.7	0.038*
m2	0	0.0	29	43.3	
Virulencia					
Alta	7	100	32	50.0	0.041
Intermedia	0	0.0	12	18.8	
Baja	0	0.0	20	31.2	
Colonización Hp					
Mixta	6	85.7	51	79.7	0.704
Única	1	14.3	13	20.3	

[†]En 3 individuos se observó colonización mixta por cepas m1 y m2

[§]En 2 individuos la región vacA s no pudo ser amplificada

*Valor p fue calculado a partir de una prueba exacta de Fisher.

6.2.2 Caracterización de las repeticiones EPIYA en el gen *cagA* de *H. pylori* y su distribución según el tipo de gastritis

Se amplificó exitosamente la región variable 3' del gen *cagA* en 67.6 % (48/71) de las cepas de *H. pylori* presentes en individuos con infección tuberculosa latente coinfectados por *H. pylori*. Lo que permitió confirmar la presencia del islote de patogenicidad *cag* PAI detectado previamente por PCR *cagA*, y adicionalmente caracterizar el número de motivos EPIYA presentes. El tamaño de los amplificadores de PCR obtenidos varió en el rango de 470 pb (3 repeticiones EPIYA), 570 pb (4 repeticiones EPIYA), 670 pb (5 repeticiones EPIYA), 770 pb (6 repeticiones EPIYA) $\pm$ 25 pb equidistantes entre ellos por aproximadamente 100 pb según lo sugerido por Panayotopoulou *et al* (121).

La mayoría de los individuos presentaron un amplicón único en el PCR EPIYA (71.4 % de los individuos con atrofia y 51.6 % de los individuos sin atrofia), indicando la presencia de una sola cepa *cagA*-positivo infectante (**Tabla 20**). El motivo EPIYA correspondiente a 4 repeticiones fue el más prevalente, y está presente en el 57.1 % de cepas de *H. pylori* de individuos con atrofia, y en 40.6 % de las cepas de individuos sin atrofia. Al comparar las proporciones de amplificación del PCR-EPIYA

y el PCR *cagA* en la detección del islote de patogenicidad *cag* (67.6 % vs 95.8 %, respectivamente), se encontraron diferencias significativas entre ambos métodos ($p=0.000$) (**Tabla 21**), sugiriendo un bajo rendimiento del PCR EPIYA como marcador de patogenicidad.

Tabla 20. Diversidad de la proteína CagA según el número de motivos EPIYA presentes en aislados de individuos LTBI coinfectados por *H. pylori*

Numero de repeticiones EPIYA	Gastritis atrófica (<i>n</i> = 7)		Gastritis no atrófica (<i>n</i> = 64)	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Colonización mixta[‡]				
6 y 4	0	0.0	1	1.6
5 y 4	2	28.6	6	9.4
3 y 4	0	0.0	1	1.6
Colonización única				
6	0	0.0	1	1.6
5	1	14.3	4	6.2
4	4	57.1	26	40.6
3	0	0.0	2	3.1
Indeterminado*	0	0.0	23	35.9

*No amplificó la región variable 3' del *cagA*

[‡]Presencia de dos cepas *cagA*+

Tabla 21. Detección del islote de patogenicidad *cag* por dos métodos de PCR en individuos con infección tuberculosa latente coinfectados por *H. pylori* (*n*= 71)

Método	Positivo		Negativo		<i>p</i>
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
PCR <i>cagA</i> +	68	95.8	3	4.2	0.000
PCR EPIYA	48	67.6	23	32.4	

6.2.3 Inflamación en mucosa gástrica y su relación con la virulencia de *H.pylori*

De los 71 pacientes positivos para la infección por *H. pylori*, 26.8 % (19/71) presentaron inflamación severa, 35.2 % (25/71) inflamación moderada, y 38.0 % (27/71) inflamación leve de la mucosa gástrica. El nivel de inflamación estuvo directamente relacionado con la virulencia de la bacteria ($p=0.001$). Así el 84.2 % y 64 % de los participantes con inflamación severa y moderada, respectivamente presentaron infección por cepas de alta virulencia. Mientras el 48.1 % de los individuos con inflamación leve portaban cepas de baja virulencia (**Figura 19**).

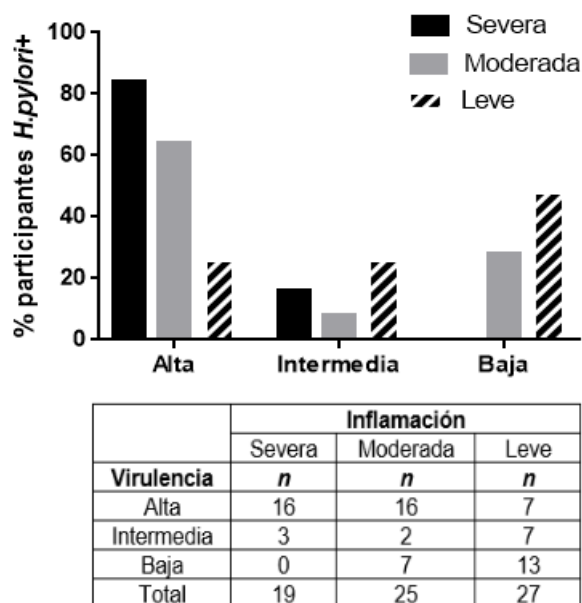


Figura 19. Proporción de participantes con inflamación de la mucosa gastrica severa, moderada y leve, y su relación con la virulencia bacteriana.

6.2.4 Escala histopatológica de Correa y su asociación con la virulencia de *H. pylori*

Se evaluó la heterogeneidad de las lesiones gástricas en los 71 individuos infectados por *H. pylori* y su asociación con la virulencia bacteriana encontrando diferencias significativas ($p=0.0001$). Los individuos portadores de cepas de alta virulencia presentaron un puntaje mayor en la escala histopatológica de Correa [media= 1.99, IC 95 % 1.60-2.39] en comparación con los individuos portadores de cepas de intermedia [media= 1.25, IC 95 % 0.96-1.53] y baja virulencia [media= 1, IC 95 % 1-1] con diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$, **Figura 20**).

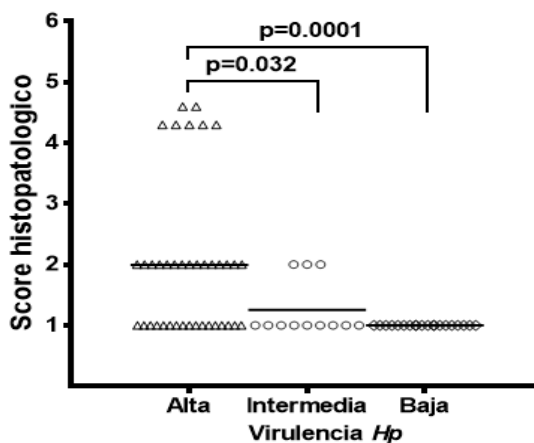


Figura 20. Análisis histopatológico para biopsias gástricas de individuos con tuberculosis latente coinfectados con *H. pylori* (*Hp*) según virulencia bacteriana: alta ($n= 39$), intermedia

($n=12$), y baja ($n=20$). El puntaje está representado en una escala de 1 a 6 (definido en metodología, cada símbolo representa el puntaje para un individuo). Las barras horizontales representan la media; los valores p fueron obtenidos por una prueba post-hoc de Dunn.

6.2.5 Análisis del perfil de citocinas y quimiocinas específicas en respuesta frente antígenos de *M. tuberculosis* en el contexto de la coinfección por *H. pylori*

En los 31 individuos (17 *H. pylori*+ y 14 *H. pylori*-) con infección tuberculosa latente seleccionados para caracterización del perfil inmunológico frente antígenos micobacterianos (**Figura 9**), los parámetros hematológicos se encontraron dentro de los límites normales, y no se observaron diferencias entre los grupos, con excepción del número absoluto de neutrófilos que fue mayor en los individuos sin coinfección por *H. pylori*. Mientras, los niveles séricos de TNF- α , se encontraron ligeramente aumentados en los dos grupos. Ninguno de los individuos presentó coinfección por helmintos intestinales. En la mitad de los participantes ($n=14$) se detectó la presencia de protozoarios coinfectantes en su gran mayoría comensales, con excepción de 3 participantes positivos para *H. pylori* que presentaron infección por *Entamoeba histolytica* (**Anexo 7**).

La coinfección con *H. pylori* mostró una tendencia hacia la reducción en los niveles de IFN- γ (media= 0.81 Log pg/mL vs 1.24 Log pg/mL), IL-2 (media= 0.26 Log pg/mL vs 0.57 Log pg/mL) e IP-10 (media= 0.26 Log pg/mL vs 0.42 Log pg/mL) en comparación con los individuos sin coinfección, aunque no fue significativa. La coinfección por *H. pylori*, no tuvo ningún efecto en la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-13, IL-17 e IL-12p70 en respuesta antígenos micobacterianos. En ningún caso, se observaron diferencias en los niveles de producción de las citocinas anteriormente mencionadas en respuesta al mitógeno PHA para ambos grupos (**Figura 21**) (**Anexo 8**). Debido a que los niveles de producción de IL-4 y IL-5 en la mayoría de participantes de ambos grupos, se encontraban por debajo del límite de detección del ensayo, no fue posible comparar la magnitud de las respuestas de estas citocinas al CFP y PHA.

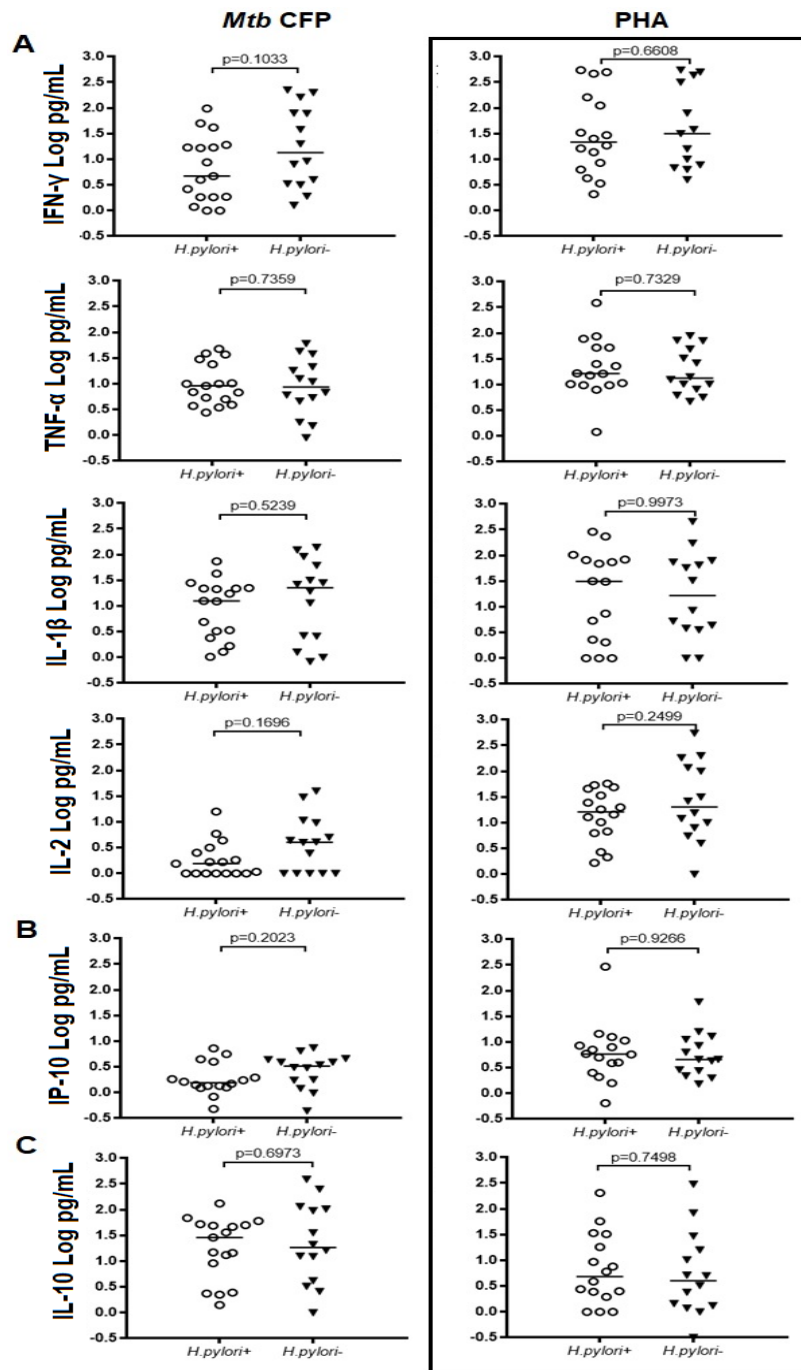


Figura 21. Respuesta de citocinas frente antígenos de *M. tuberculosis* en individuos con tuberculosis latente según su estado para *H. pylori*, medidas mediante un ensayo múltiple en LUMINEX®MAP (*H. pylori*-positivo $n=17$, *H. pylori*-negativo $n=14$). **A.** Citocinas pro-inflamatorias; **B.** Quimiocina; **C** Citocina anti-inflamatoria en sobrenadantes de PBMCs que fueron estimulados con proteínas filtradas a partir de cultivo de *M. tuberculosis* cepa H37Rv (CFP) o fitohemaglutinina (PHA-P) por 72 h. Las barras horizontales representan la media. Los valores p fueron calculados mediante una prueba t -student.

6.2.6 Efecto de la virulencia de *H. pylori* sobre la respuesta inmune frente antígenos de *M. tuberculosis*

Dentro del grupo LTBI/*H.pylori*+, la infección concurrente con aislados de *H. pylori* de alta virulencia se asoció con una significativa reducción en los niveles de IP-10 (media= 0.07 Log pg/mL vs 0.42 Log pg/mL; $p=0.04$), junto con una clara tendencia hacia la reducción en los niveles de IFN- γ (media= 0.61 Log pg/mL vs 1.24 Log pg/mL; $p=0.13$), e IL-2 (media= 0.24 Log pg/mL vs 0.57 Log pg/mL; $p=0.25$) en comparación con los individuos sin coinfección. En contraste, no se observó ningún efecto de los genotipos de alta virulencia sobre la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-13, IL-17 e IL-12p70 en respuesta antígenos micobacterianos. La infección concurrente con genotipos de intermedia y baja virulencia no mostró ningún efecto significativo o tendencia hacia la subregulación en la producción de las citocinas evaluadas. En ningún caso, se observó diferencias significativas en la producción de estas citocinas en respuesta a PHA entre los grupos (**Figura 22**) (**Anexo 8**).

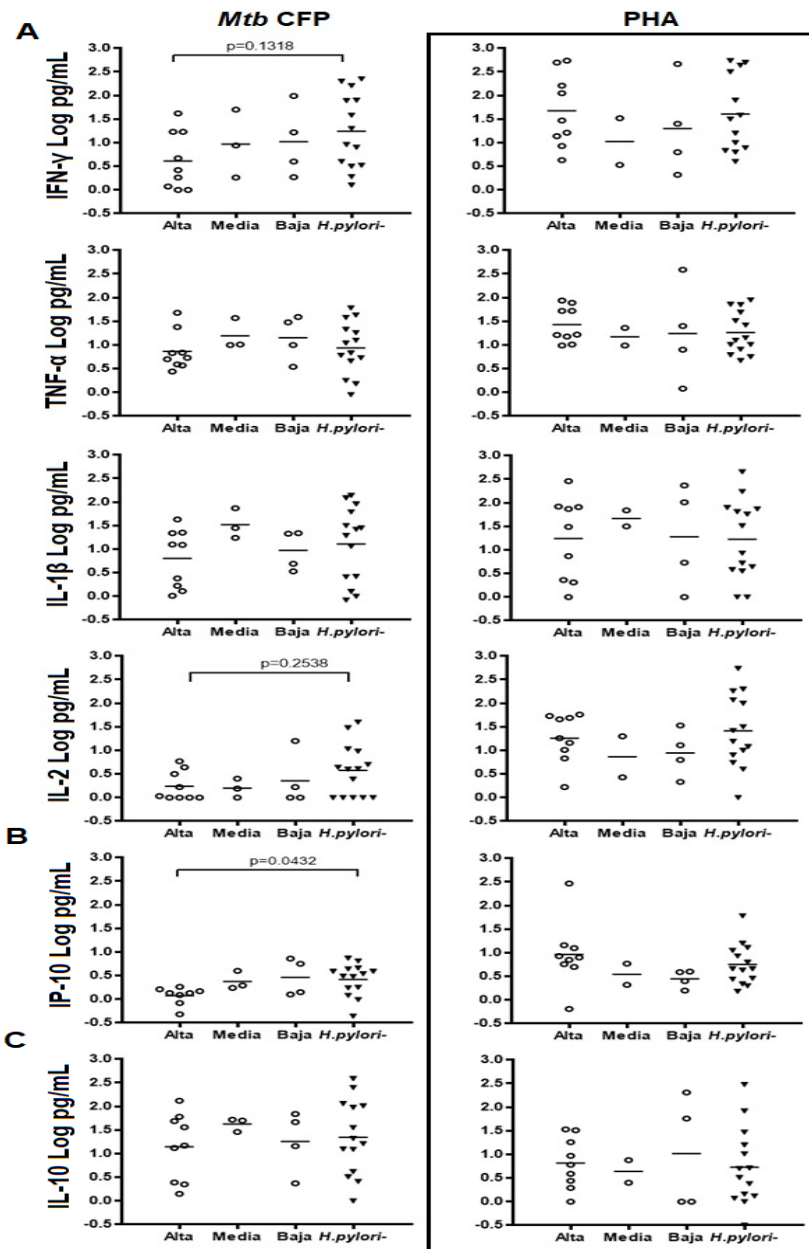


Figura 22. Efecto de la virulencia de *H. pylori* sobre la respuesta inmune frente antígenos de *M. tuberculosis* en individuos con tuberculosis latente coinfectados por *H. pylori*. **A.** Citocinas pro-inflamatorias; **B.** Quimiocina; **C** Citocina anti-inflamatoria en sobrenadantes de PBMCs que fueron estimulados con proteínas filtradas a partir de cultivo de *M. tuberculosis* cepa H37Rv (CFP) o fitohemaglutinina (PHA-P) por 72 h. Las barras horizontales representan la media. Participantes con genotipos de alta ($n= 9$), intermedia ($n= 3$), y baja ($n= 4$) virulencia. Para 1 caso de virulencia intermedia, no fue posible medir las respuestas de las citocinas frente a PHA, y 1 individuo *H. pylori*+ no fue incluido por presentar genotipo indefinido. Los valores p fueron calculados mediante una prueba post-hoc de Dunnett empleando como referencia el grupo *H. pylori*-negativo. Solo, los valores $p < 0.25$ son indicados.

6.2.7 Correlaciones entre citocinas y quimiocinas en individuos LTBI con y sin coinfección por *H. pylori*

Hubo una asociación positiva entre el IFN- γ con varias de las citocinas evaluadas. Específicamente, el IFN- γ tuvo una correlación considerable (coeficiente de correlación ≥ 0.6) (4, 300) con la citocina proinflamatoria IL-2, pero también con la citocina tipo Th2 IL-13. De hecho, IL-2 e IL-13 estaban correlacionadas entre sí ($r = 0.67$). Igualmente, se observó una correlación intermedia entre IFN- γ y la IL-12p70 ($r = 0.31$). Otras correlaciones relevantes, se observaron entre la citocina reguladora IL-10 con las citocinas proinflamatorias IL-1 β , y TNF- α (**Tabla 22**). Estas dos últimas citocinas proinflamatorias también mostraron una correlación considerable. En todos los casos las correlaciones fueron significativas.

Tabla 22. Análisis de componentes principales para 9 citocinas/quimiocinas medidas en sobrenadantes estimulados con CFP de *M. tuberculosis* por 72 h de individuos LTBI

			Contribución al componente principal (Coeficiente de correlación múltiple)		
Categoría funcional	Citocina	Correlación con IFN- γ [#]	CP1	CP2	CP3
			Autovalor 3.2	Autovalor 2.4	Autovalor 1.4
% explicado de la varianza acumulada			35.2	61.4	76.4
Inflamatoria	IFN- γ	1.00	0.91	0.09	0.01
	IL-2	0.87*	0.92	0.15	0.07
	IL-12p70	0.31*	0.52	0.33	-0.07
	IL-1 β	0.22	0.11	0.91	0.12
	TNF α	0.03	-0.058	0.90	-0.31
Anti-inflamatoria o reguladora	IP-10	0.06	0.04	0.05	-0.82
	IL-10	0.22	0.17	0.92	0.11
	IL-13	0.68*	0.86	-0.19	0.18
Th17	IL-17A	0.18	0.15	0.04	0.80

CP: Componente principal, Autovalor: valor unitario de la varianza explicada por cada componente.

* Coeficiente de correlación de Pearson para valores transformados

* $p < 0.05$

Otras correlaciones significativas entre citocinas: IL-10 y TNF- α ($r = 0.74$), IL10 e IL-1 β ($r = 0.82$), IL-2 e IL-12p70 ($r = 0.43$), IL-2 e IL-13 ($r = 0.67$), IL-1 β e TNF- α ($r = 0.74$), IP-10 e IL-17 ($r = 0.47$).

6.2.8 Análisis de componentes principales

El análisis generó un perfil Th1/Th2 mixto mostrando que el 76.4 % de la variación puede ser explicada por los 3 primeros componentes. El primer componente “eje IFN- γ mixto” explicó el 35.2 % de la varianza, y estuvo compuesto por el IFN- γ y otras citocinas correlacionadas con el IFN- γ , incluyendo citocinas inflamatorias como IL-2 e IL12p70, y citocinas anti-inflamatorias como IL-13. El segundo componente “eje IL-10 mixto” explicó un 26.2 % adicional de la varianza total compuesto por la citocina reguladora IL-10, y dos marcadores inflamatorios fuertemente correlacionados, TNF- α e IL-1 β . Un tercer componente, explicó un 15 % adicional de la varianza, representado por IL-17 e IP-10, quienes mostraron una correlación moderada. En general, estos 3 componentes muestran que las 9

citocinas evaluadas son importantes para explicar la variación total dentro de la población de individuos LTBI con y sin coinfección por *H. pylori* (**Tabla 22**).

Dentro de los 31 individuos LTBI, 12 (38.7 %) tuvieron un puntaje elevado en el eje IFN- γ mixto, incluyendo 6 (50 %) quienes fueron dominantes en el primer componente. De estos individuos dominantes en el eje IFN- γ mixto, solo 2 (33.3 %) estaban coinfectados por *H. pylori*, y presentaban genotipos de alta virulencia. En contraste, 17 (54.8 %) individuos tuvieron un puntaje elevado en el eje IL-10 mixto, incluyendo 11 (64.7 %) quienes fueron dominantes en el segundo componente. De estos individuos dominantes en el eje IL-10 mixto, 6 (54.5 %) estaban coinfectados por *H. pylori*, exhibiendo una mezcla de genotipos de baja, intermedia, y alta virulencia (**Figura 23A y B**). La distribución de las repeticiones EPIYA dentro de las cepas de *H. pylori* no mostró ninguna relación con un componente específico (**Anexo 9**).

El promedio de las puntuaciones para cada componente, evidenció que los individuos coinfectados por *H. pylori* en comparación con los individuos sin coinfección, presentaron un puntaje promedio menor en el componente 1 ($p=0.05$). Mientras para el componente 2, las puntuaciones estandarizadas entre ambos grupos no mostraron diferencias significativas (**Figura 23C**). La virulencia bacteriana no se asoció con las puntuaciones obtenidas en ninguno de los dos componentes principales (**Anexo 9**).

En conjunto esto sugiere que la respuesta del IFN- γ y las citocinas asociadas dentro de la población LTBI no fue dominante y se encuentra comprometida por efecto de la coinfección con *H. pylori*. Por el contrario, se evidencia una dominante respuesta inflamatoria manejada por el TNF- α e IL-1 β que no muestra diferencias entre individuos con y sin coinfección por *H. pylori* y parece estar regulada por acción de la IL-10. El papel de la virulencia de *H. pylori* en este análisis no fue tan claro.

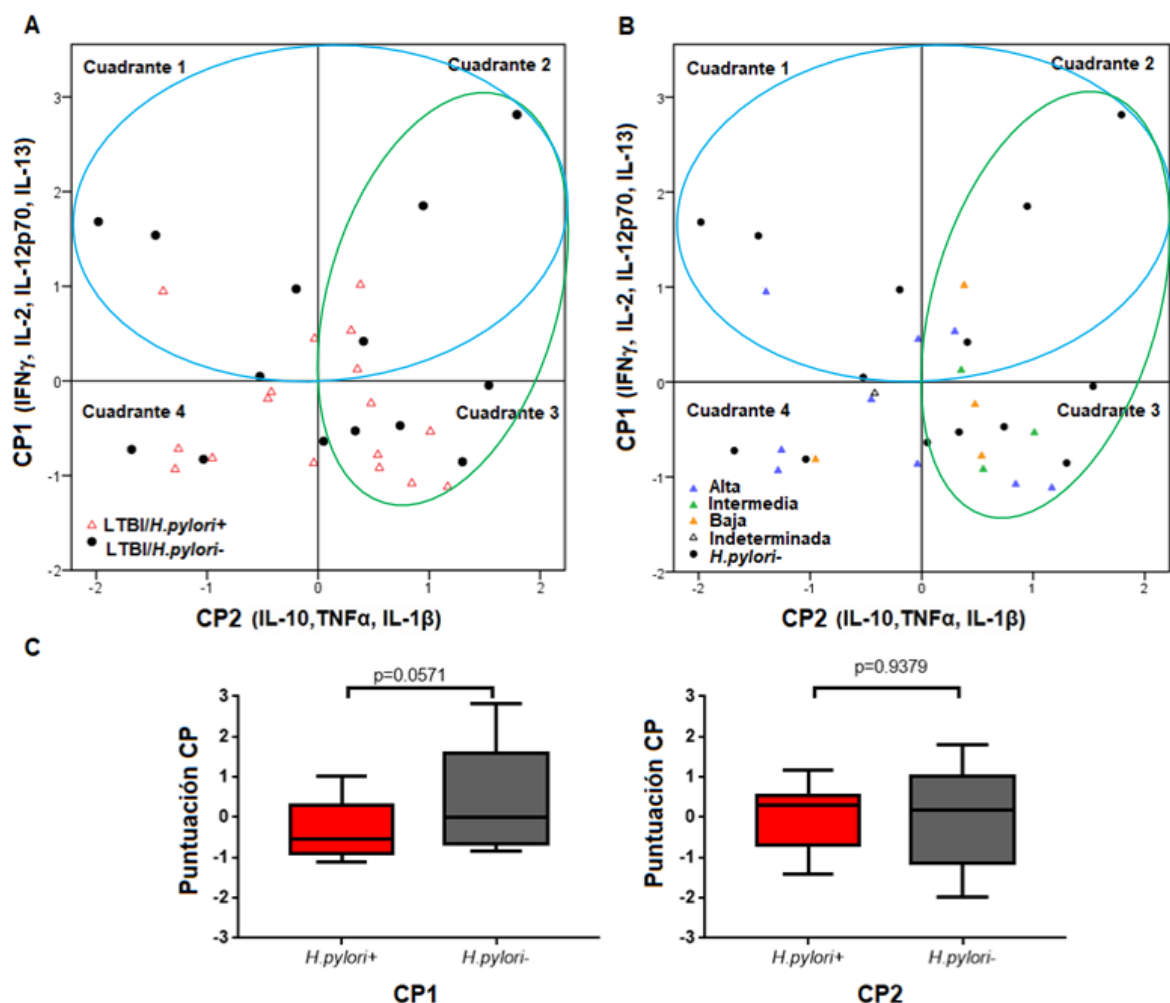


Figura 23. Diagrama de dispersión para los dos primeros componentes principales, ilustrando la distribución de los puntajes para 31 individuos LTBI con y sin coinfección por *H. pylori*. **A.** Diagrama de dispersión según estado infeccioso para *H. pylori*. Punto negro: 14 individuos *H. pylori*-negativo; Triángulo rojo: 17 individuos *H. pylori*-positivos según histología. **B.** Diagrama de dispersión según la virulencia de los genotipos de *H. pylori*. Triángulo purpura: 9 individuos con genotipos de alta-virulencia; Triángulo verde: 3 individuos con genotipos intermedios; Triángulos naranja: 4 individuos con genotipos de baja-virulencia; Triángulo negro sin relleno: 1 individuo con múltiples genotipos *cagA* y *vacA* s/m, considerado como indeterminado. Las líneas de referencia denotan cuadrantes centrados en 0. **C.** Comparación del puntaje promedio de los componentes estandarizados. Diferencias evaluadas mediante una prueba *t*-student para muestras no relacionadas. El círculo en azul, denota los individuos que presentaron un puntaje elevado en el eje IFN- γ mixto. El círculo en verde, denota los individuos que presentaron un puntaje elevado en el eje IL-10 mixto. CP1, componente principal 1; CP2, componente principal 2.

6.3 DISCUSIÓN

6.3.1 Genotipificación de *H. pylori* entre individuos con infección tuberculosa latente

Los genotipos de *H. pylori* asociados a virulencia son determinantes importantes en el resultado clínico de la infección (267, 301). En algunas series, pacientes con úlcera péptica son predominantemente infectados con cepas *cagA*⁺; *vacA* s1/m1, las cepas *cagA*⁻; *vacA* s2/m2 suelen ser más frecuentes en pacientes con dispepsia no ulcerosa (302). Con frecuencia existe un alto grado de colinealidad en la distribución de los genotipos *cagA*⁺ y *vacA* s1 (109, 301). Cómo estos factores de virulencia conllevan a enfermedad es cada vez mejor comprendido, aunque el beneficio para *H. pylori* de poseerlos requiere más investigación. Una posibilidad es que los cambios en el epitelio causados por *H. pylori* (directamente o a través de la inflamación) favorezcan la liberación de nutrientes a la bacteria (28).

En este estudio, se encontró una elevada prevalencia de genotipos de alta virulencia, la cual fue más marcada entre individuos con atrofia (100 %) en comparación con los individuos sin atrofia (50 %). Los marcadores *cagA* y *vacA* s no mostraron asociación con el tipo de gastritis. En contraste, el alelo m1 del gen *vacA* se asoció con la presencia de atrofia gástrica. Estos resultados concuerdan con un estudio previo realizado en San José-Costa Rica una población latinoamericana con alto riesgo de cáncer gástrico, en donde se encontró una alta prevalencia de genes *cagA*, *vacA* s1b y *vacA* m1 entre individuos con gastritis atrófica en comparación con los individuos sin atrofia, y los alelos *vacA* s1 y m1 de forma individual se asociaron con un incremento en el riesgo de atrofia y cáncer gástrico, aunque el riesgo de desarrollar enfermedad fue marcadamente superior en presencia del alelo m1. El genotipo *cagA*⁺; *vacA* s1b/m1 también se asoció con un incremento en el riesgo de atrofia [OR= 5.4, IC 95 % 2.6-162.1] pero no de cáncer gástrico [OR= 1.7 IC 95 % 0.6-4.6] (303).

Igualmente concuerda con otros estudios realizados en diferentes poblaciones colombianas, Sicinschi *et al* (294) en 107 individuos residentes en Túquerres y Tumaco dos poblaciones con contraste en el riesgo de cáncer gástrico (alto y bajo riesgo, respectivamente) encontró que todos los pacientes con gastritis atrófica, metaplasia intestinal y displasia en la población de alto riesgo estaban infectados por cepas *cagA*⁺; *vacA* s1/m1. En la población de bajo riesgo, la progresión de las lesiones se correlacionó con la prevalencia de genotipos virulentos. Melo-Narváez *et al* (304) y Yamaoka *et al* (305) en Bogotá observaron una alta prevalencia del genotipo *cagA*⁺; *vacA* s1a/m1 en aislados de *H. pylori* de pacientes con diferentes manifestaciones clínicas (úlcera duodenal, gastritis crónica, metaplasia y cáncer gástrico) pero difieren parcialmente con los resultados de este estudio al no encontrar asociación entre el estado *cagA* y *vacA*, y los hallazgos clínicos. En conjunto, estas investigaciones sugieren que la prevalencia de genotipos virulentos

en la región y en el país es alta, y su asociación con el resultado clínico muestra variación geográfica.

La falta de asociación entre el estado *cagA* y el tipo de gastritis observada en la presente investigación puede estar condicionada por la presencia de infección mixta con cepas *cagA*+ y *cagA*- colonizando el mismo individuo, la cual fue frecuente en individuos con y sin atrofia, representando posiblemente una asociación estable en la colonización a largo plazo (126). Estas cepas (competidoras) a menudo cooperan mediante autoinducción (quorum sensing) y recombinación para reducir su interacción con el hospedero. En apoyo a esta hipótesis la colonización de antro y cuerpo por diferentes cepas conlleva a poca perturbación fisiológica, mientras la infección con una sola cepa colonizando antro puede llevar a úlcera duodenal (28).

Con respecto al mosaico de alelos *vacA*, varios estudios en diferentes países han mostrado que el alelo *s1* está asociado con enfermedad (306-308), aunque otros estudios (305) incluido este difieren en los hallazgos. En cuanto al alelo *m* algunas investigaciones, no ha observado una clara asociación con condiciones clínicas como la úlcera péptica (309, 310). Las cepas *m1* en estudios con aislados de Colombia (267) y Norte América (306) se han vinculado a mayor daño en el epitelio gástrico comparado con las cepas *m2*. Otras investigaciones en el Este Asiático, sugieren que es imposible explicar las diferencias en la incidencia de cáncer gástrico entre países del sur y norte de Asia por genotipos *cagA* y *vacA* *s*, pero si es posible por genotipos *vacA m* (109, 311). El incremento en el daño epitelial puede explicarse por una mayor producción de citotoxina por parte de las cepas *s1/m1* en comparación con la cepa *s1/m2* (306). Por lo anterior, el alelo *m1* el cual mostró asociación con la presencia de atrofia gástrica podría ser un marcador clave para identificar individuos en riesgo de desarrollar lesiones precursoras de cáncer gástrico en la población de la ciudad de Cali.

6.3.2 Variabilidad en el extremo 3' del gen *cagA* de *H. pylori* en individuos con tuberculosis latente

El PCR-EPIYA confirmó la presencia del gen *cagA* en solo 67.6 % de las cepas de *H. pylori* coinfectantes presentes en individuos LTBI, mostrando una baja sensibilidad en comparación con el PCR *cagA* (95.8 % de positividad *cagA*). Estos hallazgos coinciden con un estudio previo realizado en población dispéptica en Túquerres-Colombia en donde se comparó la proporción de amplificación del PCR-EPIYA y PCR *cagA* para la detección del islote de patogenicidad *cag* en aislados que crecieron en diluciones seriadas de amoxicilina y claritromicina, y se encontró una menor proporción de detección para el PCR-EPIYA (234), diferencias que se atribuyeron a una degradación aleatoria del ADN bacteriano en algunas muestras que dificultó la amplificación de fragmentos de gran tamaño (>200 pb). En el presente estudio, las muestras que no amplificaron por PCR-EPIYA, si amplificaron para PCR *vacA m*, en el que se generaron amplicones de 401/476 pb dependiendo del alelo, descartando la fragmentación del ADN. Estos hallazgos contrastan con las

observaciones de Panayotopoulou *et al* (121) quien sugiere que la ausencia de amplificación del PCR-EPIYA puede identificar con precisión los casos *cagA*-, indicando que una caracterización previa del estado *cagA* de los aislados no es necesaria.

Una ventaja del PCR-EPIYA es que permite caracterizar el número de repeticiones EPIYA que alberga la proteína CagA. En este estudio, la mayoría de cepas *cagA*+ presentes en individuos con atrofia y sin atrofia (57.1 % vs 40.6 %, respectivamente) contenían una proteína CagA con 4 (595 pb) motivos EPIYA dispuestos muy probablemente en la combinación ABCC, y la colonización con múltiples cepas *cagA*+ fue baja. Coincidiendo parcialmente con los resultados encontrados por Acosta *et al* (312) en aislados obtenidos de individuos con diferentes manifestaciones gástricas de Bogotá-Colombia donde se observó que el 1.9 % tenía 2 motivos EPIYA, 62.3 % 3 motivos EPIYA, 33.1 % 4 motivos EPIYA y 2.8 % 5 motivos EPIYA. No obstante, al comparar la proporción de cepas occidentales con 4 motivos EPIYA depositadas en el GenBank y los resultados encontrados, evidenció que la presencia de cepas con 4 repeticiones EPIYA fue mayor en población colombiana. El número de repeticiones EPIYA, específicamente del tipo C se ha asociado con la presencia de lesiones precursoras y cáncer gástrico (112).

En este trabajo, el incremento en repeticiones EPIYA no se asoció con la presencia de atrofia, un resultado que podría en parte estar condicionado por el bajo número de individuos con esta condición. Una investigación reciente en población colombiana mostró que la variación en los motivos EPIYA presentes en la proteína CagA no está directamente asociada con el resultado de la enfermedad, y no hay asociación entre el número de motivos EPIYA-C y la enfermedad (312). Resultados similares se han reportado en población iraní en donde no se encontró correlación entre el número de motivos EPIYA y las manifestaciones clínicas asociadas a la infección por *H. pylori* (313). Esta ausencia de asociación puede deberse a factores genéticos del hospedero y ambientales que podrían estar influenciando el desarrollo de lesiones precursoras y cáncer gástrico en combinación con el tipo y número de motivos EPIYA en la proteína CagA en cada población.

Comúnmente el número y tipo de motivos EPIYA presentes en aislados de *H. pylori cagA*+, es determinado por secuenciación. Sin embargo, el PCR-EPIYA permite predecir en la mayoría de casos el número de repeticiones EPIYA y sus combinaciones. Panayotopoulou *et al* (121) verificó la precisión de las predicciones concernientes a 3 o 4 motivos EPIYA por secuenciación en 93 casos de 101 aislados *cagA*+ analizados, encontrando que en todos los casos el tamaño del amplificado de PCR-EPIYA pudo predecir el número y tipo de motivos EPIYA presentes. En el caso de los amplificados de 5 y 6 repeticiones EPIYA encontrados en el presente estudio, la secuenciación es necesaria para establecer la combinación de los motivos EPIYA.

En general, el PCR-EPIYA tiene una sensibilidad limitada para la detección del estado *cagA* y predicción del número, y tipo de motivos EPIYA. Sin embargo, es un método simple que involucra un único paso de amplificación y además facilita la identificación de subclones *cagA*⁺ con divergente número de motivos EPIYA dentro de la misma cepa. De acuerdo con los resultados obtenidos, se hace necesario confirmar la detección del gen *cagA* por PCR *cagA*-específico.

6.3.3 Inflamación, severidad de la lesión y virulencia de *H. pylori*

La infección por *H. pylori* y la inflamación crónica asociada son determinantes claves en el inicio y progresión de las lesiones precursoras de cáncer gástrico. *H. pylori* induce una respuesta inflamatoria en las células del epitelio gástrico que propicia el reclutamiento de células inflamatorias al sitio de la infección (314). La severidad de la inflamación depende de factores específicos de virulencia, la densidad bacteriana y la respuesta inmune del hospedero. Su contribución relativa permanece en controversia (107).

En este estudio, el nivel de inflamación y la puntuación histopatológica en la escala de Correa estuvo directamente asociada con la virulencia de *H. pylori*. El 84.2 % de los individuos con inflamación severa portaban cepas de alta virulencia (*cagA*⁺; *vacA* s1/m1). Igualmente, el puntaje promedio en la escala de Correa fue mayor en individuos coinfectados por cepas de alta virulencia en comparación con los individuos coinfectados por cepas de baja virulencia. Resultados que concuerdan con otros estudios como el de Soltermann *et al* (315) en 47 pacientes suizos con metaplasia intestinal y 73 controles donde observó que el genotipo de alta virulencia (*cagA*⁺; *vacA* s1) se correlacionó con la presencia de metaplasia antral, intensa inflamación en antro y cuerpo gástrico, y formación de úlceras. El genotipo (*vacA* m1) se correlacionó con una intensa inflamación solo en cuerpo gástrico. En contraste, las cepas de baja virulencia (*cagA*⁻; *vacA* s2/m2) raramente se encontraron en estas condiciones clínicas. En otro estudio, en población colombiana, Nogueira *et al* (267) observó una clara asociación entre el genotipo virulento (*cagA*⁺; *vacA* s1/m1) con una alta densidad de *H. pylori*, alto grado de infiltración de linfocitos y neutrófilos, atrofia, metaplasia y daño epitelial. Si bien en el presente estudio, todos los individuos con atrofia portaban genotipos de alta virulencia, la prevalencia de genotipos virulentos también fue alta en individuos con gastritis no atrófica. Sugiriendo que, aunque el nivel de inflamación aumenta el riesgo de enfermedad no parece influenciar cual tipo se va a desarrollar.

Una posible explicación a este fenómeno, es que no todos los factores de virulencia de *H. pylori* incrementan el riesgo de enfermedad al incrementar el nivel de inflamación en la mucosa gástrica. Tal es el caso de la proteína VacA, la cual tiene múltiples efectos sobre las células epiteliales que resultan en daño celular más que en la liberación de citocinas proinflamatorias (107). En apoyo de esta hipótesis, se observó en este estudio que sólo el genotipo *vacA* m está asociado con atrofia gástrica. Esto puede deberse al alto nivel de producción de citotoxina por parte de

las cepas *vacA* s1/m1 comparado con las cepas *vacA* s1/m2 (306). Estudios previos (267, 316), son consistentes con nuestros hallazgos al observar una relación entre el nivel de producción de citotoxina y la severidad de la atrofia, confirmando que el mosaicismo de la región *s* y *m* del gen *vacA* juega un papel importante en la cadena de eventos que lleva a cáncer gástrico.

6.3.4 Efecto de la coinfección por *H. pylori* en la respuesta inmune a *M.tuberculosis*

La alta prevalencia de *H. pylori* (>80 %) en poblaciones como la nuestra donde la TB es endémica sugiere que la interacción patógeno-hospedero para estas infecciones ha evolucionado de manera conjunta. Poco se sabe acerca del entrecruzamiento de estas infecciones crónicas (20, 33). En este estudio, en general los individuos con infección tuberculosa latente presentaron altos niveles de IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2 e IP-10 en respuesta a antígenos micobacterianos, como también altos niveles de la citocina reguladora IL-10. En contraste, los niveles de marcadores Th2 como IL-13 fueron bajos, e indetectables para IL-5 e IL-4. Este predominante perfil Th1 es producto del reconocimiento antigénico de los péptidos micobacterianos por células T de memoria y linfocitos T vírgenes durante un periodo prolongado (72 h) que resultó en activación celular y el desarrollo de funciones efectoras. También puede estar influenciados por factores específicos del hospedero (polimorfismos en genes que codifican citocinas inflamatorias) o factores ambientales (infección por micobacterias no tuberculosas u otros agentes infecciosos a los cuales la población ha estado previamente expuesta). Mientras, la débil respuesta Th2 observada puede explicarse por los rigurosos criterios del estudio para excluir condiciones médicas concomitantes (ej. Alergias) y por la ausencia de helmintos coinfectantes en las heces.

Una respuesta Th1 mediada por el IFN- γ es esencial para controlar la infección por *M. tuberculosis*, pero no suficiente (75). Se observó que la coinfección por *H. pylori* disminuyó la respuesta del IFN- γ , IL-2 e IP-10 frente antígenos específicos de *M. tuberculosis*. Dada la amplia variabilidad genómica de *H. pylori* en relación a sus factores de virulencia (*cagA* y *vacA*), se consideró su impacto sobre la respuesta inmune observada. Encontrando que el compromiso de la respuesta Th1 estaba vinculado con la coinfección por cepas de alta virulencia *cagA*+/; *vacA* s1/m1 y *cagA*+/; *cagA*-; *vacA* s1/m1 las cuales fueron altamente prevalentes en esta población, 14 % (10/71) y 41 % (29/71) respectivamente. La falta de significancia estadística en las asociaciones puede parcialmente ser explicada por la presencia común de infección mixta en los participantes que favorece la recombinación inter-genómica entre cepas o variantes clonales de la misma cepa modificando potenciales moléculas inmuno-estimuladoras (perdida completa o parcial del islote *cag*, cambio del número de repeticiones EPIYA o alelos *vacA*) para minimizar su interacción con el hospedero (28, 102), y así causar menor daño. Estos resultados contrastan con las observaciones de Perry *et al* (20) quien en un estudio transversal en población hispana radicada en Estados Unidos con infección tuberculosa latente

encontró que la infección simultánea por *H. pylori* se asoció con un incremento en la respuesta del IFN- γ , y citocinas tipo Th1 (IL-2, IP-10 y TNF- α) en respuesta antígenos micobacterianos.

El análisis de componentes principales (ACP), mostró una solución de 3 componentes. El primer componente incluyó IFN- γ , IL-2, IL-12p70 e IL-13. Estas citocinas a excepción del IL-13, participan en la activación y diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes hacia el subgrupo Th1 explicando su correlación (296). La correlación con IL-13 no sorprende, un estudio previo en recién nacidos vacunados con BCG en Gambia donde la prevalencia de helmintos es baja (0-3 %), detectó niveles de IL-13 en respuesta a antígenos micobacterianos (317). Igualmente, algunos estudios han observado que el incremento en los niveles de IL-13 en combinación con otros analitos permite distinguir individuos PPD+ de individuos PPD- (318, 319). El segundo componente incluyó IL-10, TNF- α e IL-1 β . Su correlación puede explicarse dado que estas citocinas son sintetizadas principalmente por la misma fuente (macrófagos activados). La producción de IL-1 β por estas células es dependiente de la acción del TNF- α . En cuanto a la síntesis de IL-10 por parte de los macrófagos, esta podría estar actuando en un mecanismo de retroalimentación negativa inhibiendo las funciones de TNF- α e IL-1 β (296). El tercer componente incluyó la IL-17 e IP-10, correlación que puede parcialmente atribuirse a la función efectora de la IL-17 que estimula la producción de quimiocinas y citocinas al actuar sobre células endoteliales y monocitos. De hecho, se han demostrado que IL-17F es capaz de inducir la expresión de IP-10 en células de epitelio bronquioalveolar (320). Cabe destacar que IP-10 está involucrada en el mejoramiento de la respuesta Th1 (321), y es una quimiocina secretada por múltiples células principalmente en respuesta al IFN- γ (322, 323), por lo que su reducción podría explicarse en parte por los bajos niveles del IFN- γ observados en individuos LTBI coinfectados por *H. pylori*.

Estos perfiles de agrupación de citocinas son similares a los obtenidos por Perry *et al* (33) mediante un ACP en un estudio reciente donde analizó 38 adultos LTBI refugiados en los Estados Unidos procedentes de países endémicos para TB, considerando la coinfección por *H. pylori* y/o helmintos. El primer componente generado incluyó IFN- γ , IL-2, IP-10, IL-5 e IL-13, el segundo componente incluyó IL-10 y TNF- α , y el tercer componente incluyó IL-17. En particular, la correlación IL-13 e IFN- γ fue constante sugiriendo que es dependiente de la interacción LTBI y la infección por *H. pylori*. Las diferencias entre ambos estudios, pueden atribuirse a que Perry y colaboradores no evaluaron IL12p70, mientras en este estudio no se incluyó para el análisis IL-5 por presentar niveles por debajo del límite de detección (<3.2 pg/mL), y ningún individuo presentó coinfección por helmintos.

En la representación gráfica de los dos primeros componentes, solo 6 individuos LTBI, de los cuales 2 presentaban coinfección por cepas de alta virulencia de *H. pylori* fueron dominantes en el eje del IFN- γ . En contraste, 11 individuos LTBI de los cuales 6 presentaban coinfección por cepas exhibiendo una mezcla de genotipos

de baja, intermedia, y alta virulencia fueron dominantes en el eje de IL-10. Los individuos LTBI coinfectados por *H. pylori* presentaron un menor puntaje en el componente de citocinas correlacionadas con el IFN- γ en comparación con los individuos LTBI sin coinfección. Mientras no se observaron diferencias entre los puntajes de los individuos pertenecientes a ambos grupos en el componente de citocinas correlacionadas con la IL-10. Esto demuestra que la respuesta del IFN- γ y las citocinas correlacionadas no fue dominante en la población con tuberculosis latente, y la coinfección con *H. pylori* llevó a una reducción en esta respuesta. Estas citocinas juegan un papel clave en la inmunidad a TB (24), por lo que su reducción podría suponer un riesgo en la progresión a TB.

Biselli *et al* (324) en un estudio para identificar biomarcadores que permitan discriminar entre individuos con LTBI y TB, empleó PBMCs estimulados con ESAT-6/CFP-10 por 72 h, y observó que los individuos LTBI y pacientes con TB tenían niveles significativamente mayores de IFN- γ en comparación con los controles sanos, aunque la producción de IFN- γ no mostró diferencias entre ambos grupos. Mientras los niveles de IL-2 fueron significativamente mayores en individuos LTBI que los observados en pacientes TB y controles. Sun *et al* (325) en otro estudio similar de biomarcadores empleando PBMCs estimulados con antígenos micobacterianos encontraron altos niveles de IFN- γ e IL-2 en individuos con LTBI y TB comparado con los controles, pero al comparar la respuesta del IFN- γ entre individuos infectados por *M. tuberculosis* esta fue significativamente mayor en el grupo con TB. En contraste, los individuos LTBI secretaron niveles significativamente mayores de IL-2.

Estos datos demuestran la capacidad de la IL-2 para discriminar entre individuos con LTBI y pacientes con TB, y sugieren que las células T secretoras de IFN- γ predominan durante la enfermedad activa. Sin embargo, ninguna de estas dos citocinas debería usarse sola como marcador diagnóstico. En cambio, el uso de la razón de citocinas IL-2/IFN- γ tras 72 h de estimulación con ESAT-6/CFP-10 ha mostrado un fuerte poder discriminatorio (sensibilidad 87.7 % y especificidad 86.1 %) en el diagnóstico de las diferentes etapas de la infección por *M. tuberculosis*, encontrándose bajos valores de esta razón en pacientes tuberculosos (323, 325).

El papel de IL-12 e IP-10 como biomarcadores del estado de la infección por *M. tuberculosis* no está claro, La manna *et al* (319) encontró un incremento significativo en la producción de IL-12p40 en respuesta a antígenos micobacterianos (CFP-10, ESAT-6 y TB7.7) al comparar individuos con infección por *M. tuberculosis* (LTBI y TB) y controles PPD-. Mientras, la producción de esta citocina no mostró diferencias entre individuos LTBI y pacientes tuberculosos. Wang *et al* (326) no observó ninguna diferencia en los niveles de producción de IL-12p70 en respuesta a ESAT-6/CFP entre individuos LTBI, pacientes TB y controles. En cuanto a IP-10, su incremento tras la estimulación con ESAT-6/CFP-10 ha sido empleado en varios estudios como un biomarcador alternativo para la detección de individuos con TB que en combinación con el IFN- γ mejora la precisión diagnóstica (322, 326). Sin

embargo, los niveles de IP-10 en respuesta antígenos micobacterianos no pueden distinguir entre LTBI y TB (325-327). En contraste, los niveles basales de IP-10 han mostrado un incremento significativo en individuos LTBI en comparación con pacientes TB y controles sanos (323, 325), sugiriendo un posible papel protector en el curso de la infección por *M. tuberculosis* en individuos LTBI.

Por otra parte, la respuesta manejada por IL-10, TNF- α e IL-1 β fue dominante en individuos con y sin coinfección por *H. pylori*. TNF- α e IL-1 β son citocinas asociadas con inflamación sistémica (296). Explicando en parte los niveles ligeramente aumentados de TNF- α sérico observado en ambos grupos. Esta respuesta inflamatoria, posiblemente esté controlada por complejas redes reguladoras mediadas a través de la IL-10. El impacto de la virulencia bacteriana sobre las puntuaciones obtenidas para cada componente no fue tan claro, y podría estar condicionado por la presencia de múltiples cepas de *H. pylori* con diferente grado de virulencia en los individuos coinfectados.

Aunque el papel de *H. pylori* en la respuesta a *M. tuberculosis* permanece en controversia. En el presente estudio se proponen dos modelos para explicar la asociación entre la infección por *H. pylori* y el incremento en el riesgo de TB. El primer modelo se adaptó a partir de una propuesta realizada por Eberhardt *et al* (152) para explicar la asociación entre la infección por *H. pylori* y la progresión del VIH. *H. pylori* persiste en la mucosa gástrica de cara a una robusta respuesta inmune celular. La citotoxina vacuolizante (VacA) interfiere con la maduración de las células dendríticas y la presentación de antígenos mediada por el CMH clase II (128), e inhibe la proliferación de linfocitos T bloqueando la transcripción de los genes que codifican para IL-2 y su receptor IL-2R (102), comprometiendo la activación local y posiblemente sistémica de las células T CD4⁺, lo cual podría tener un efecto en la susceptibilidad a TB (**Figura 24A**) y en el curso clínico de otras infecciones. En apoyo al modelo, en este estudio se observó un compromiso en la respuesta del IFN- γ , IL-2 e IP-10 frente a antígenos micobacterianos en los individuos coinfectados por *H. pylori*, y ésta se asoció con cepas de alta virulencia. También otras investigaciones han observado que *H. pylori* puede inhibir la respuesta inmune frente infecciones virales concomitantes (151, 152).

En el segundo modelo, alternativamente, los linfocitos T reguladores (Tregs) inducidos por *H. pylori* a nivel local y sistémico, pueden mediante un efecto “espectador” mediado por citocinas reducir la respuesta Th1 y Th17 sistémica frente antígenos no relacionados, afectando la inmunidad del hospedero contra *M. tuberculosis* (**Figura 24B**). Soportando esta hipótesis, se han observado células Treg proliferando local y sistémicamente en pacientes con tuberculosis (328), y que la eliminación *in vitro* de células Tregs en cultivos de PBMCs incrementa la producción de IFN- γ seguido de la vacunación BCG entre niños coinfectados (329).

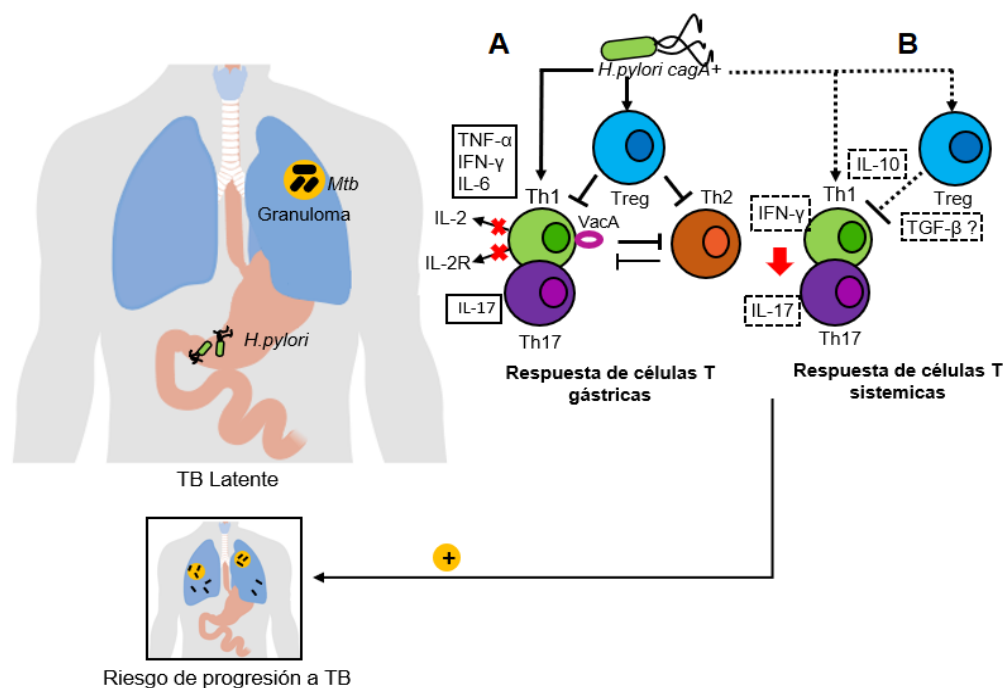


Figura 24. Modelos hipotéticos para explicar el efecto de la infección por *H. pylori* en individuos con infección tuberculosa latente. **A.** Modelo 1 dependiente de la acción efectora de VacA. **B.** Modelo 2 dependiente del efecto inmuno-regulatorio de los linfocitos Tregs inducidos. Las líneas continuas indican las rutas inmunológicas principales. Las líneas discontinuas y las cajas punteadas representan rutas inmunológicas hipotéticas. El signo (+) sugiere un aumento en el riesgo de progresión a TB. *Mtb*, *Mycobacterium tuberculosis*; TB, tuberculosis; IL, interleucina.

6.3.5 Limitaciones y fortalezas del estudio

Algunas limitaciones del estudio incluyen su diseño transversal que no permitió evaluar la dirección de la asociación entre la coinfección por *H. pylori* y la reducida respuesta del IFN- γ , IL-2 e IP-10 frente antígenos micobacterianos. El tamaño limitado de la muestra en los individuos *H. pylori*-positivos con atrofia ($n=7$), y en los individuos con genotipos de alta, moderada y baja virulencia de *H. pylori* empleados para los estudios inmunológicos dificultó las comparaciones entre grupos llevando a un bajo poder estadístico. La presencia común de múltiples cepas de *H. pylori* exhibiendo una combinación de diferentes genotipos en los individuos participantes pudo afectar la fuerza de las asociaciones, considerando que estas cepas pueden recombinar para minimizar su interacción con el hospedero alterando la respuesta inmune. No se empleó un grupo control de individuos negativos para las dos infecciones crónicas (*M. tuberculosis* y *H. pylori*) en las comparaciones. No obstante, como se evaluó la respuesta inmune específica frente antígenos de *M. tuberculosis*, es de esperar que los individuos sin previa sensibilización a *M. tuberculosis* mostraran niveles bajos o indetectables de las citocinas analizadas, lo que se ha evidenciado en otras investigaciones (33, 330).

Pese a estas limitaciones, este es un estudio único que aborda la compleja interacción entre *M. tuberculosis* y *H. pylori* en un escenario en donde la exposición a múltiples infecciones es frecuente, y además considera el papel de la virulencia de *H. pylori* sobre la respuesta inmune específica a *M. tuberculosis*. Otra fortaleza de este estudio es el riguroso tamizaje de los participantes que llevó a la exclusión de muchos individuos, pero redujo la heterogeneidad inmunológica asociada a otras enfermedades y consumo de medicamentos, orientado al análisis de la respuesta inmune en individuos “sanos”.

Finalmente, en este estudio, se consideró el efecto del tiempo (48, 72 96 y 120 h) en la producción de los diferentes analitos en respuesta a antígenos micobacterianos, seleccionando el tiempo óptimo para todos los ensayos (72 h), esto refuerza la confiabilidad de los resultados.

6.3.6 Conclusión y recomendaciones

La coinfección por *H. pylori* en individuos con infección tuberculosa latente conlleva a una reducción en la respuesta del IFN- γ , IL-2 e IP-10 frente antígenos de *M. tuberculosis*, que parece ser dependiente de la virulencia de *H. pylori*. Demostrando que la respuesta inmune a un microorganismo específico es multifactorial, y aunque está en gran medida determinada por la genética del hospedero, es fuertemente influenciada por factores ambientales (incluyendo otros microorganismos) y puede ser influenciada por el propio microorganismo. La interacción entre la infección por *H. pylori* y *M. tuberculosis* proporciona un modelo informativo para investigar el fino balance de la respuesta inmune en países en desarrollo con implicaciones importantes para el diagnóstico, pronóstico y desarrollo de vacunas contra la tuberculosis.

Nuevos estudios necesitan ser orientados a evaluar la respuesta inmune frente antígenos micobacterianos antes y después del tratamiento antibiótico para *H. pylori*, en espera de una reversibilidad de los niveles de citocinas comprometidos. Igualmente, estudios de corte longitudinal podrían evaluar si la coinfección con cepas de alta virulencia de *H. pylori* incrementan el riesgo de TB, con especial enfoque en el papel de la citotoxina VacA y sus variantes alélicas. De confirmarse estos hallazgos, y considerando que la infección por *H. pylori* se adquiere en la infancia y persiste por décadas incrementando el riesgo úlcera péptica y cáncer gástrico, se justificaría el diagnóstico y erradicación de *H. pylori* en todo individuo con infección tuberculosa latente. Lo anterior plantea la posibilidad de manipular la microbiota para modular el riesgo de enfermedad por *M. tuberculosis*, y posiblemente a otros patógenos comunes. Por otra parte, es importante examinar la utilidad de la IL-2 e IP-10 como biomarcadores para discriminar LTBI y TB en nuestra población.

7 CONCLUSIONES

Los resultados encontrados en esta investigación mediante análisis epidemiológicos, y de microbiología e inmunología en individuos con tuberculosis latente con y sin coinfección por *H. pylori*, permiten concluir que:

1. La prevalencia de LTBI en población sin comorbilidades asociadas, y medida empleando dos diferentes umbrales PPD (≥ 10 mm y ≥ 15 mm) es moderada (25.3 % y 13.2 %, respectivamente) en comparación con la prevalencia del 11 % estimada en población general para la región de las Américas.
2. La positividad y el diámetro de la induración en la PPD se asoció con la edad, el nivel de educación, el género, la zona de residencia, la situación laboral, el consumo de alcohol y el IMC.
3. La prevalencia de *H. pylori* en individuos con LTBI es elevada (83 %) en comparación con la prevalencia de *H. pylori* estimada para Sur América (69.4 %). No obstante, la prevalencia de lesiones preneoplásicas como atrofia gástrica es baja (9.6 %).
4. La presencia de atrofia gástrica se asoció con la edad, el género, el hacinamiento, el consumo de alcohol, el sobrepeso, y la historia de cáncer gástrico familiar, conocidos factores de riesgo que predisponen a cáncer gástrico distal.
5. La frecuencia de genotipos de alta virulencia en la población es elevada, siendo más marcada en individuos con atrofia (7/7; 100 %) en comparación con los individuos sin atrofia (32/64; 50 %). Los marcadores *cagA* y *vacA* no mostraron asociación con el tipo de gastritis. En contraste, *vacA m1* se asoció significativamente con la presencia de atrofia gástrica.
6. La coinfección por *H. pylori* en individuos con infección tuberculosa latente se asoció con una reducción en la respuesta del IFN- γ , IL-2 e IP-10 frente antígenos de *M. tuberculosis*, que parece ser dependiente de la virulencia de *H. pylori*.

8 PERSPECTIVAS

Los seres humanos están colonizados por complejas comunidades microbianas sitio-específicas que están implicadas en salud y enfermedad de formas aún poco exploradas (20). La dinámica microbiana y el balance en su composición y abundancia puede ser alterada bajo condiciones específicas, resultando en una disbiosis que favorece la proliferación de organismos patógenos, implicados en respuestas inmunes patológicas y enfermedad. Estos cambios en los perfiles microbianos pueden ser resultado de factores específicos del hospedero (respuestas inflamatorias y disponibilidad de nutrientes para los microorganismos) y factores ambientales (infecciones crónicas de mucosas).

Los estudios de colonización microbiana a nivel gastro-intestinal han mostrado la importancia del microbioma en la estimulación de la respuesta innata y adaptativa mediante la liberación de productos microbianos y citocinas inmuno-moduladoras por parte de las células inmunes residentes tras el reconocimiento de los microorganismos comensales y patógenos. En este contexto, *H. pylori* un patógeno crónico que se adquiere temprano en la infancia, y estimula fuertes respuestas Th1/Th17 e induce altos niveles de Tregs a nivel local y sistémico puede tener un papel dominante modificando la respuesta inmune a otras infecciones e influenciando la diversidad y la abundancia de las comunidades microbianas en diferentes órganos del hospedero como el intestino, y posiblemente el pulmón. No se descarta que estas alteraciones estén condicionadas por factores independientes como la edad del hospedero, el genotipo bacteriano, y otros factores aún no identificados.

Comprender cómo la complejidad de las exposiciones microbianas influye en la inmunidad del hospedero, puede tener importantes implicaciones para el desarrollo de vacunas e intervenciones terapéuticas. Por lo que es prioritario caracterizar la composición de la microbiota gástrica e intestinal de individuos con infección tuberculosa latente con y sin coinfección por *H. pylori*, y evaluar el impacto de la erradicación de *H. pylori* sobre los perfiles microbianos. Este conocimiento podría permitir el diseño de nuevas estrategias para identificar individuos en alto riesgo de progresión a TB, y así optimizar las estrategias de prevención.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Thèze J. Bystander Effects. In: Delves PJ, editor. *Encyclopedia of Immunology* (Second Edition). Oxford: Elsevier; 1998. p. 396-8.
2. Cerda L J, Villaroel Del P L. Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Rev Chil Pediatr*. 2008;79:54-8.
3. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74.
4. Mondragón M. Uso de la correlación de Spearman en un estudio de intervención en fisioterapia. *Mov Cient*. 2014;8(1):98-104.
5. Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME. Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001;356(1411):983-9.
6. Brogden KA, Guthmiller JM, Taylor CE. Human polymicrobial infections. *Lancet*. 2005;365(9455):253-5.
7. Cox FE. Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology*. 2001;122 Suppl:S23-38.
8. Lawn SD. AIDS in Africa: the impact of coinfections on the pathogenesis of HIV-1 infection. *J Infect*. 2004;48(1):1-12.
9. Resende Co T, Hirsch CS, Toossi Z, Dietze R, Ribeiro-Rodrigues R. Intestinal helminth co-infection has a negative impact on both anti-Mycobacterium tuberculosis immunity and clinical response to tuberculosis therapy. *Clin Exp Immunol*. 2007;147(1):45-52.
10. Muturi EJ, Mbogo CM, Mwangangi JM, Ng'ang'a ZW, Kabiru EW, Mwandawiro C, et al. Concomitant infections of Plasmodium falciparum and Wuchereria bancrofti on the Kenyan coast. *Filaria J*. 2006;5:8.
11. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Canavate C, Dedet JP, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(2):334-59.
12. Pancharoen C, Thisyakorn U. Coinfections in dengue patients. *Pediatr Infect Dis J*. 1998;17(1):81-2.
13. Griffiths EC, Pedersen AB, Fenton A, Petchey OL. The nature and consequences of coinfection in humans. *J Infect*. 2011;63(3):200-6.
14. Pedersen AB, Fenton A. Emphasizing the ecology in parasite community ecology. *Trends Ecol Evol*. 2007;22(3):133-9.
15. Sternberg ED, Lefevre T, Rawstern AH, de Roode JC. A virulent parasite can provide protection against a lethal parasitoid. *Infect Genet Evol*. 2011;11(2):399-406.
16. Petney TN, Andrews RH. Multiparasite communities in animals and humans: frequency, structure and pathogenic significance. *Int J Parasitol*. 1998;28(3):377-93.
17. Brooker S, Hotez PJ, Bundy DA. The global atlas of helminth infection: mapping the way forward in neglected tropical disease control. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(7):e779.
18. Pullan R, Brooker S. The health impact of polyparasitism in humans: are we under-estimating the burden of parasitic diseases? *Parasitology*. 2008;135(7):783-94.
19. Perry S, Hussain R, Parsonnet J. The impact of mucosal infections on acquisition and progression of tuberculosis. *Mucosal Immunol*. 2011;4(3):246-51.
20. Perry S, de Jong BC, Solnick JV, Sanchez MdIL, Yang S, Lin PL, et al. Infection with Helicobacter pylori Is Associated with Protection against Tuberculosis. *PLoS One*. 2010;5(1):e8804.

21. Ferebee SH, Mount FW, Murray FJ, Livesay VT. A controlled trial of isoniazid prophylaxis in mental institutions. *Am Rev Respir Dis.* 1963;88:161-75.
22. Hussain R, Talat N, Shahid F, Dawood G. Longitudinal tracking of cytokines after acute exposure to tuberculosis: association of distinct cytokine patterns with protection and disease development. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14(12):1578-86.
23. Demissie A, Wassie L, Abebe M, Aseffa A, Rook G, Zumla A, et al. The 6-kilodalton early secreted antigenic target-responsive, asymptomatic contacts of tuberculosis patients express elevated levels of interleukin-4 and reduced levels of gamma interferon. *Infect Immun.* 2006;74(5):2817-22.
24. Lalor MK, Floyd S, Gorak-Stolinska P, Ben-Smith A, Weir RE, Smith SG, et al. BCG vaccination induces different cytokine profiles following infant BCG vaccination in the UK and Malawi. *J Infect Dis.* 2011;204(7):1075-85.
25. Hur YG, Gorak-Stolinska P, Lalor MK, Mvula H, Floyd S, Raynes J, et al. Factors affecting immunogenicity of BCG in infants, a study in Malawi, The Gambia and the UK. *BMC Infect Dis.* 2014;14:184.
26. Rook GAW, Dheda K, Zumla A. Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(8):661-7.
27. Blaser MJ, Chen Y, Reibman J. Does *Helicobacter pylori* protect against asthma and allergy? *Gut.* 2008;57(5):561-7.
28. Atherton JC, Blaser MJ. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J Clin Invest.* 2009;119(9):2475-87.
29. Stromberg E, Edebo A, Lundin BS, Bergin P, Brisslert M, Svennerholm AM, et al. Down-regulation of epithelial IL-8 responses in *Helicobacter pylori*-infected duodenal ulcer patients depends on host factors, rather than bacterial factors. *Clin Exp Immunol.* 2005;140(1):117-25.
30. Lundgren A, Suri-Payer E, Enarsson K, Svennerholm AM, Lundin BS. *Helicobacter pylori*-specific CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells suppress memory T-cell responses to *H. pylori* in infected individuals. *Infect Immun.* 2003;71(4):1755-62.
31. Maizels RM. Infections and allergy - helminths, hygiene and host immune regulation. *Curr Opin Immunol.* 2005;17(6):656-61.
32. Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol.* 2001;1(1):69-75.
33. Perry S, Chang AH, Sanchez L, Yang S, Haggerty TD, Parsonnet J. The immune response to tuberculosis infection in the setting of *Helicobacter pylori* and helminth infections. *Epidemiol Infect.* 2013;141(06):1232-43.
34. Woeltje KF, Kilo CM, Johnson K, Primack J, Fraser VJ. Tuberculin skin testing of hospitalized patients. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997;18(8):561-5.
35. Torres MA, Passaro DJ, Watanabe J, Parsonnet J, Small P, Miyagu J, et al. No association between *Helicobacter pylori* and *Mycobacterium tuberculosis* infections among gastrointestinal clinic attendees in Lima, Peru. *Epidemiol Infect.* 2003;130(1):87-91.
36. Philippou N, Roussos A, Tsimpoukas F, Anastasakou E, Mavrea S, Tsimogianni A. *Helicobacter pylori* infection in patients with active pulmonary tuberculosis before the initiation of antituberculosis treatment. *Ann Gastroenterol.* 2003;16:49-52.
37. Mitchell HM, Li YY, Hu PJ, Liu Q, Chen M, Du GG, et al. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in southern China: identification of early childhood as the critical period for acquisition. *J Infect Dis.* 1992;166(1):149-53.

38. Risco D, Serrano E, Fernández-Llario P, Cuesta JM, Gonçalves P, García-Jiménez WL, et al. Severity of Bovine Tuberculosis Is Associated with Co-Infection with Common Pathogens in Wild Boar. *PLoS One*. 2014;9(10):e110123.
39. Gonzalez J, Juarez S. Técnicas de detección genética en el diagnóstico rápido de las micobacteriosis: utilidad y estrategia de aplicación servicio de Microbiología. Universidad de Barcelona.; 2003.
40. Rogall T, Wolters J, Flohr T, Bottger C. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Int J Syst Bacteriol*. 1990;40(4):323-30.
41. Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts D, Bottger C. Two-laboratory study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol*. 1996;34(2):296-303.
42. Sommers H, McClatchy J. Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. In: Cumitech 16 MJ, editor. American Society for Microbiology. Washington D.C1983.
43. Eisenach K, Cave M, Crawford J. PCR detection of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Application (D.H. Persing TFS, F.C. Tenoué, and T.J. White), editor. American Medical Society. Washington, D.C1993. p. 191–6.
44. Jorgensen MB, Nielsen DM. Diagnosis and treatment of granulomatous mastitis. *Am J Med*. 1992;93(1):97-101.
45. Huynh KK, Joshi SA, Brown EJ. A delicate dance: host response to mycobacteria. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(4):464-72.
46. Houben RM, Dodd PJ. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. *PLoS medicine*. 2016;13(10):e1002152.
47. WHO. Latent tuberculosis infection: updated and consolidated guidelines for programmatic management. Geneva: World Health Organization. 2018.
48. Pieters J. *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: maintaining a balance. *Cell Host Microbe*. 2008;3(6):399-407.
49. Russell DG, Barry CE, Flynn JL. Tuberculosis: What We Don't Know Can, and Does, Hurt Us. *Science* 2010;328(5980):852-6.
50. Rafi W, Ribeiro-Rodrigues R, Ellner JJ, Salgame P. Coinfection-helminthes and tuberculosis. *Curr Opin HIV AIDS*. 2012;7(3):239-44.
51. Ernst JD. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(8):581-91.
52. Gideon HP, Flynn JL. Latent tuberculosis: what the host "sees"? *Immunol Res*. 2011;50(2-3):202-12.
53. Koul A, Arnoult E, Lounis N, Guillemont J, Andries K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature*. 2011;469(7331):483-90.
54. Kaufmann SH, McMichael AJ. Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nat Med*. 2005;11:S33-44.
55. Chan J, Flynn J. The immunological aspects of latency in tuberculosis. *Clin Immunol*. 2004;110(1):2-12.
56. Flynn JL, Chan J, Lin PL. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal Immunol*. 2011;4(3):271-8.
57. Bosedasgupta S, Pieters J. Striking the right balance determines TB or not TB. *Front Immunol*. 2014;5.
58. Muñoz L, Stagg HR, Abubakar I. Diagnosis and Management of Latent Tuberculosis Infection. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2015;5(11):a017830.

59. ATS. Targeted Tuberculin Testing and Treatment of Latent Tuberculosis Infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(supplement_3):S221-S47.
60. WHO. Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018.
61. WHO. Global tuberculosis report 2016. Geneva: World Health Organization; 2016.
62. PAHO. Tuberculosis in the Americas. Washington, D.C: PAHO; 2018.
63. Sivigila. Una mirada hacia el comportamiento

de la tuberculosis en Colombia, 2018 (Semana epidemiológica número 36). Bogota: Instituto Nacional de Salud; 2018.

64. Castiblanco CA, Llerena Polo C. Tuberculosis en Colombia: análisis de la situación epidemiológica, año 2006. *Infectio*. 2008;12:159-73.
65. Sivigila. Informe de evento Tuberculosis, Colombia. Bogota: Instituto Nacional de Salud; 2017.
66. Lesmes Duque M, Reina L. Informe anual 2016 Vigilancia en Salud Publica. Cali: Gobernacion del Valle del Cauca; 2016.
67. De la Pava E, Salguero B, Alzate A. Modelo matemático del riesgo anual de infección tuberculosa en Cali. *Rev Panam Salud Publica*. 2002;11(3):166-71.
68. Hassan MI, Diab AE. Detection of latent tuberculosis infection among laboratory personnel at a University Hospital in Eastern Saudi Arabia using an interferon gamma release assay. *Journal of infection and public health*. 2014;7(4):289-95.
69. Holguin JA, Murillo de Apraez S, Bolanos CJ. Boletín Epidemiológico 2012 y 2013 (primer semestre). Cali: Alcaldía de Santiago de Cali; 2013.
70. Realpe T, Correa N, Rozo JC, Ferro BE, Gomez V, Zapata E, et al. Population Structure among Mycobacterium tuberculosis Isolates from Pulmonary Tuberculosis Patients in Colombia. *PLoS One*. 2014;9(4):e93848.
71. Lin PL, Flynn JL. Understanding Latent Tuberculosis: A Moving Target. *J Immunol*. 2010;185(1):15-22.
72. Rothfuchs AG, Bafica A, Feng CG, Egen JG, Williams DL, Brown GD, et al. Dectin-1 interaction with Mycobacterium tuberculosis leads to enhanced IL-12p40 production by splenic dendritic cells. *J Immunol*. 2007;179(6):3463-71.
73. Hossain MM, Norazmi MN. Pattern recognition receptors and cytokines in Mycobacterium tuberculosis infection--the double-edged sword? *Biomed Res Int*. 2013;2013:179174.
74. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:93-129.
75. Demissie A, Abebe M, Aseffa A, Rook G, Fletcher H, Zumla A, et al. Healthy Individuals That Control a Latent Infection with Mycobacterium tuberculosis Express High Levels of Th1 Cytokines and the IL-4 Antagonist IL-4δ2. *J Immunol*. 2004;172(11):6938-43.
76. 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.
77. Hussain R, Kaleem A, Shahid F, Dojki M, Jamil B, Mehmood H, et al. Cytokine profiles using whole-blood assays can discriminate between tuberculosis patients and healthy endemic controls in a BCG-vaccinated population. *J Immunol Methods*. 2002;264(1-2):95-108.
78. Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF, Vassalli P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell*. 1989;56(5):731-40.

79. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, et al. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*. 1995;2(6):561-72.
80. Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwieterman WD, et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor α -neutralizing agent. *N Engl J Med*. 2001;345(15):1098-104.
81. Elliott AM, Hodsdon WS, Kyosiimire J, Quigley MA, Nakiyingi JS, Namujju PB, et al. Cytokine responses and progression to active tuberculosis in HIV-1-infected Ugandans: a prospective study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004;98(11):660-70.
82. Moran-Mendoza O, Marion SA, Elwood K, Patrick D, FitzGerald JM. Risk factors for developing tuberculosis: a 12-year follow-up of contacts of tuberculosis cases. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2010;14(9):1112-9.
83. Talat N, Perry S, Parsonnet J, Dawood G, Hussain R. Vitamin D Deficiency and Tuberculosis Progression. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(5):853-5.
84. Blumberg HM, Burman WJ, Chaisson RE, Daley CL, Etkind SC, Friedman LN, et al. American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: treatment of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(4):603-62.
85. Jacobs M, Togbe D, Fremond C, Samarina A, Allie N, Botha T, et al. Tumor necrosis factor is critical to control tuberculosis infection. *Microbes Infect*. 2007;9(5):623-8.
86. Barry CE, Boshoff HI, Dartois V, Dick T, Ehrt S, Flynn J, et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nat Rev Micro*. 2009;7(12):845-55.
87. Reece ST, Kaufmann SHE. Rational design of vaccines against tuberculosis directed by basic immunology. *Int J Med Microbiol*. 2008;298(1–2):143-50.
88. Babu S, Nutman TB. Helminth-Tuberculosis Co-infection: An Immunologic Perspective. *Trends Immunol*. 2016;37(9):597-607.
89. Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. 2008;134(1):306-23.
90. Gerrits MM, van Vliet AH, Kuipers EJ, Kusters JG. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet Infect Dis*. 2006;6(11):699-709.
91. Tiwari SK, Khan AA, Ahmed KS, Ahmed I, Kauser F, Hussain MA, et al. Rapid diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients using salivary secretion: a non-invasive approach. *Singapore Med J*. 2005;46(5):224-8.
92. Clayton CL, Kleanthous H, Coates PJ, Morgan DD, Tabaqchali S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992;30(1):192-200.
93. Vaira D, Menegatti M, Ricci C, Gatta L, Berardi S, Miglioli M. Accurate Diagnosis of *Helicobacter pylori*: Stool Tests. *Gastroenterology Clinics of North America*. 2000;29(4):917-23.
94. Talebi Bezmin Abadi A. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Using Invasive and Noninvasive Approaches. *Journal of pathogens*. 2018;2018:9064952.
95. Oh S, Kim N, Yoon H, Choi YJ, Lee JY, Park KJ, et al. Risk factors of atrophic gastritis and intestinal metaplasia in first-degree relatives of gastric cancer patients compared with age-sex matched controls. *J Cancer Prev*. 2013;18(2):149-60.
96. Moncayo JI, Santacruz JJ, Álvarez AL, Franco B, López MA, Ángel A, et al. Comparación de métodos diagnósticos en la infección por *Helicobacter pylori* en Quindío, Colombia. *Colombia Médica*. 2006;37:203-12.

97. Merrell DS, Falkow S. Frontal and stealth attack strategies in microbial pathogenesis. *Nature*. 2004;430(6996):250-6.
98. Greenberg ER, Anderson GL, Morgan DR, Torres J, Chey WD, Bravo LE, et al. 14-day triple, 5-day concomitant, and 10-day sequential therapies for *Helicobacter pylori* infection in seven Latin American sites: a randomised trial. *Lancet*. 2011;378(9790):507-14.
99. Argent RH, Zhang Y, Atherton JC. Simple method for determination of the number of *Helicobacter pylori* CagA variable-region EPIYA tyrosine phosphorylation motifs by PCR. *J Clin Microbiol*. 2005;43(2):791-5.
100. Nahar S, Kibria KM, Hossain ME, Sultana J, Sarker SA, Engstrand L, et al. Evidence of intra-familial transmission of *Helicobacter pylori* by PCR-based RAPD fingerprinting in Bangladesh. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28(7):767-73.
101. Peek RM, Jr., Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(1):28-37.
102. Monack DM, Mueller A, Falkow S. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(9):747-65.
103. Azevedo NF, Guimaraes N, Figueiredo C, Keevil CW, Vieira MJ. A new model for the transmission of *Helicobacter pylori*: role of environmental reservoirs as gene pools to increase strain diversity. *Crit Rev Microbiol*. 2007;33(3):157-69.
104. Bravo L, Cortés A, Carrascal E, Correa P, Ordóñez N. Seroprevalencia de anticuerpos anti-*Helicobacter pylori* en donantes de sangre de regiones colombianas con diferencias en la mortalidad por cáncer gástrico. *Colomb Med*. 2000;31(3):122-30.
105. Bravo L, Cortés A, Carrascal E, Jaramillo R, García L, Bravo P, et al. *Helicobacter pylori*: patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. *Colomb Med*. 2003;34(3):124-31.
106. Ek C, Whary MT, Ihrig M, Bravo LE, Correa P, Fox JG. Serologic evidence that ascaris and toxoplasma infections impact inflammatory responses to *Helicobacter pylori* in Colombians. *Helicobacter*. 2012;17(2):107-15.
107. Robinson K, Argent RH, Atherton JC. The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2007;21(2):237-59.
108. Correa P, Fontham ET, Bravo JC, Bravo LE, Ruiz B, Zarama G, et al. Chemoprevention of gastric dysplasia: randomized trial of antioxidant supplements and anti-*helicobacter pylori* therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(23):1881-8.
109. Yamaoka Y, Kato M, Asaka M. Geographic differences in gastric cancer incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains. *Intern Med*. 2008;47(12):1077-83.
110. Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol*. 2004;5(11):1166-74.
111. Philpott DJ, Belaid D, Troubadour P, Thiberge JM, Tankovic J, Labigne A, et al. Reduced activation of inflammatory responses in host cells by mouse-adapted *Helicobacter pylori* isolates. *Cell Microbiol*. 2002;4(5):285-96.
112. Sicinschi LA, Correa P, Peek RM, Camargo MC, Piazzuelo MB, Romero-Gallo J, et al. CagA C-terminal variations in *Helicobacter pylori* strains from Colombian patients with gastric precancerous lesions. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(4):369-78.
113. Umehara S, Higashi H, Ohnishi N, Asaka M, Hatakeyama M. Effects of *Helicobacter pylori* CagA protein on the growth and survival of B lymphocytes, the origin of MALT lymphoma. *Oncogene*. 2003;22(51):8337-42.

114. Argent RH, Zhang Y, Atherton JC. Simple Method for Determination of the Number of *Helicobacter pylori* CagA Variable-Region EPIYA Tyrosine Phosphorylation Motifs by PCR. *J Clin Microbiol.* 2005;43(2):791-5.
115. Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, et al. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(12):5791-5.
116. Atherton JC, Blaser MJ. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J Clin Invest.* 2009;119(9):2475-87.
117. Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(9):688-94.
118. Azuma T, Yamakawa A, Yamazaki S, Fukuta K, Ohtani M, Ito Y, et al. Correlation between Variation of the 3' Region of the cagA Gene in *Helicobacter pylori* and Disease Outcome in Japan. *J Infect Dis.* 2002;186(11):1621-30.
119. Yamaoka Y, El-Zimaity HMT, Gutierrez O, Figura N, Kim JK, Kodama T, et al. Relationship between the cagA 3' repeat region of *Helicobacter pylori*, gastric histology, and susceptibility to low pH. *Gastroenterology.* 1999;117(2):342-9.
120. Quiroga AJ, Huertas A, C6mbita AL, Bravo MM. Variation in the number of EPIYA-C repeats in CagA protein from Colombian *Helicobacter pylori* strains and its ability middle to induce hummingbird phenotype in gastric epithelial cells. *Biom6dica.* 2010;30:251-8.
121. Panayotopoulou EG, Sgouras DN, Papadakos K, Kalliaropoulos A, Papatheodoridis G, Mentis AF, et al. Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA protein in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 2007;45(2):488-95.
122. Higashi H, Yokoyama K, Fujii Y, Ren S, Yuasa H, Saadat I, et al. EPIYA Motif Is a Membrane-targeting Signal of *Helicobacter pylori* Virulence Factor CagA in Mammalian Cells. *J Biol Chem.* 2005;280(24):23130-7.
123. Jones KR, Joo YM, Jang S, Yoo YJ, Lee HS, Chung IS, et al. Polymorphism in the CagA EPIYA motif impacts development of gastric cancer. *J Clin Microbiol.* 2009;47(4):959-68.
124. Vilaichone R-K, Mahachai V, Tumwasorn S, Wu J-Y, Graham DY, Yamaoka Y. Molecular Epidemiology and Outcome of *Helicobacter pylori* Infection in Thailand: a Cultural Cross Roads. *Helicobacter.* 2004;9(5):453-9.
125. Azuma T, Yamakawa A, Yamazaki S, Ohtani M, Ito Y, Muramatsu A, et al. Distinct Diversity of the cag Pathogenicity Island among *Helicobacter pylori* Strains in Japan. *J Clin Microbiol.* 2004;42(6):2508-17.
126. Vega AE, Cortinas TI, Puig ON, Silva HJ. Molecular characterization and susceptibility testing of *Helicobacter pylori* strains isolated in western Argentina. *Int J Infect Dis.* 2010;14 Suppl 3:e85-92.
127. Polk DB, Peek RM, Jr. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(6):403-14.
128. Boncristiano M, Paccani SR, Barone S, Olivieri C, Patrussi L, Ilver D, et al. The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J Exp Med.* 2003;198(12):1887-97.
129. Ricci V, Sommi P, Fiocca R, Romano M, Solcia E, Ventura U. *Helicobacter pylori* vacuolating toxin accumulates within the endosomal-vacuolar compartment of cultured gastric cells and potentiates the vacuolating activity of ammonia. *J Pathol.* 1997;183(4):453-9.

130. Molinari M, Salio M, Galli C, Norais N, Rappuoli R, Lanzavecchia A, et al. Selective inhibition of li-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J Exp Med*. 1998;187(1):135-40.
131. Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Eshagh Hosseini M, et al. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology*. 2007;133(3):926-36.
132. Ermak TH, Giannasca PJ, Nichols R, Myers GA, Nedrud J, Weltzin R, et al. Immunization of mice with urease vaccine affords protection against *Helicobacter pylori* infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II-restricted responses. *J Exp Med*. 1998;188(12):2277-88.
133. George JT, Boughan PK, Karageorgiou H, Bajaj-Elliott M. Host anti-microbial response to *Helicobacter pylori* infection. *Molecular immunology*. 2003;40(7):451-6.
134. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(2):133-46.
135. Torok AM, Bouton AH, Goldberg JB. *Helicobacter pylori* induces interleukin-8 secretion by Toll-like receptor 2- and Toll-like receptor 5-dependent and -independent pathways. *Infect Immun*. 2005;73(3):1523-31.
136. Smith MF, Jr., Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biol Chem*. 2003;278(35):32552-60.
137. Schmausser B, Andrulis M, Endrich S, Lee SK, Josenhans C, Muller-Hermelink HK, et al. Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection. *Clin Exp Immunol*. 2004;136(3):521-6.
138. Lee SK, Stack A, Katzowitsch E, Aizawa SI, Suerbaum S, Josenhans C. *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. *Microbes Infect*. 2003;5(15):1345-56.
139. Ernst PB, Gold BD. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54:615-40.
140. Meyer F, Wilson KT, James SP. Modulation of innate cytokine responses by products of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*. 2000;68(11):6265-72.
141. Allen LA, Schlesinger LS, Kang B. Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages. *The Journal of experimental medicine*. 2000;191(1):115-28.
142. Rittig MG, Shaw B, Letley DP, Thomas RJ, Argent RH, Atherton JC. *Helicobacter pylori*-induced homotypic phagosome fusion in human monocytes is independent of the bacterial vacA and cag status. *Cell Microbiol*. 2003;5(12):887-99.
143. Ramarao N, Gray-Owen SD, Meyer TF. *Helicobacter pylori* induces but survives the extracellular release of oxygen radicals from professional phagocytes using its catalase activity. *Mol Microbiol*. 2000;38(1):103-13.
144. Gobert AP, McGee DJ, Akhtar M, Mendz GL, Newton JC, Cheng Y, et al. *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(24):13844-9.
145. Eaton KA, Mefford M, Thevenot T. The role of T cell subsets and cytokines in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* gastritis in mice. *J Immunol*. 2001;166(12):7456-61.

146. Bamford KB, Fan X, Crowe SE, Leary JF, Gourley WK, Luthra GK, et al. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology*. 1998;114(3):482-92.
147. Lehmann FS, Terracciano L, Carena I, Baeriswyl C, Drewe J, Tornillo L, et al. In situ correlation of cytokine secretion and apoptosis in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2002;283(2):G481-8.
148. Robinson K, Kenefeck R, Pidgeon EL, Shakib S, Patel S, Polson RJ, et al. *Helicobacter pylori*-induced peptic ulcer disease is associated with inadequate regulatory T cell responses. *Gut*. 2008;57(10):1375-85.
149. Mitchell HM, Ally R, Wade A, Wiseman M, Segal I. Major differences in the IgG subclass response to *Helicobacter pylori* in the first and third worlds. *Scand J Gastroenterol*. 2002;37(5):517-22.
150. Gebert B, Fischer W, Weiss E, Hoffmann R, Haas R. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science*. 2003;301(5636):1099-102.
151. Shirai M, Arichi T, Nakazawa T, Berzofsky JA. Persistent infection by *Helicobacter pylori* down-modulates virus-specific CD8⁺ cytotoxic T cell response and prolongs viral infection. *J Infect Dis*. 1998;177(1):72-80.
152. Eberhardt KA, Sarfo FS, Dompok A, Kuffour EO, Geldmacher C, Soltan M, et al. *Helicobacter pylori* Coinfection Is Associated With Decreased Markers of Immune Activation in ART-Naive HIV-Positive and in HIV-Negative Individuals in Ghana. *Clin Infect Dis*. 2015;61(10):1615-23.
153. McCune A, Lane A, Murray L, Harvey I, Nair P, Donovan J, et al. Reduced risk of atopic disorders in adults with *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2003;15(6):637-40.
154. Sanaka M, Kuyama Y, Iwasaki M, Hanada Y, Tsuchiya A, Haida T, et al. No difference in seroprevalences of *Helicobacter pylori* infection between patients with pulmonary tuberculosis and those without. *J Clin Gastroenterol*. 1998;27(4):331-4.
155. Tsang KW, Lam S-K, Lam W-K, Karlberg J, Wong BC, Hu WH, et al. High Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Active Bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158(4):1047-51.
156. Chofnas I, Love RWJ. Postgastrectomy state and tuberculosis. *Arch Surg*. 1966;92(5):704-6.
157. Boman K. Tuberculosis occurring after gastrectomy. *Acta chirurgica Scandinavica*. 1956;110(6):451-7.
158. Elias D, Britton S, Aseffa A, Engers H, Akuffo H. Poor immunogenicity of BCG in helminth infected population is associated with increased in vitro TGF-beta production. *Vaccine*. 2008;26(31):3897-902.
159. del Corral H, París SC, Marín ND, Marín DM, López L, Henao HM, et al. IFN γ Response to *Mycobacterium tuberculosis*, Risk of Infection and Disease in Household Contacts of Tuberculosis Patients in Colombia. *PLoS One*. 2009;4(12):e8257.
160. Mahecha GKH, Arboleda YM, Vanegas CPV, Zuluaga FM. Factores asociados al desarrollo de tuberculosis en contactos domiciliarios de pacientes con tuberculosis, Medellín 2015. *CES Salud Pública*. 2017;8(1):48-60.
161. DANE. Ficha Metodológica Déficit de Vivienda. Censo general 2005. Bogotá: Departamento Administrativo Nacional de Estadística; 2008.
162. OMS. Informes Técnicos 916. Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas Ginebra; 2003.

163. Rieder HL, Chadha VK, Nagelkerke NJ, van Leth F, van der Werf MJ. Guidelines for conducting tuberculin skin test surveys in high-prevalence countries. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011;15 Suppl 1:S1-25.
164. MinSalud. Norma Técnica para la vacunación según el programa ampliado de inmunizaciones-PAI Colombia: Ministerio de Salud.
165. Abubakar I, Drobniewski F, Southern J, Sitch AJ, Jackson C, Lipman M, et al. Prognostic value of interferon- γ release assays and tuberculin skin test in predicting the development of active tuberculosis (UK PREDICT TB): a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(10):1077-87.
166. MinSalud. Circular externa 007. Actualización de los lineamientos para el manejo programático de tuberculosis y lepra en Colombia. . Bogotá, D.C: Ministerio de Salud; 2015.
167. MinSalud. Actualización de los lineamientos para el manejo programático de tuberculosis y lepra en Colombia. Normas técnicas y guías de atención. 2015;Circular externa No.007(Anexo 3):27.
168. Belo C, Naidoo S. Prevalence and risk factors for latent tuberculosis infection among healthcare workers in Nampula Central Hospital, Mozambique. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):408.
169. Borroto S, Gamez D, Diaz D, Martinez Y, Ferrer AI, Velasquez Y, et al. Latent tuberculosis infection among health care workers at a general hospital in Santiago de Cuba. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011;15(11):1510-4, i.
170. Alvarez-Leon EE, Espinosa-Vega E, Santana-Rodriguez E, Molina-Cabrillana JM, Perez-Arellano JL, Caminero JA, et al. Screening for tuberculosis infection in spanish healthcare workers: Comparison of the QuantiFERON-TB gold in-tube test with the tuberculin skin test. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009;30(9):876-83.
171. Chen C, Zhu T, Wang Z, Peng H, Kong W, Zhou Y, et al. High Latent TB Infection Rate and Associated Risk Factors in the Eastern China of Low TB Incidence. *PLoS One.* 2015;10(10):e0141511.
172. Yap P, Tan KHX, Lim WY, Barkham T, Tan LWL, Chen MI, et al. Prevalence of and risk factors associated with latent tuberculosis in Singapore: A cross-sectional survey. *Int J Infect Dis.* 2018;72:55-62.
173. Martinez L, Arman A, Haveman N, Lundgren A, Cabrera L, Evans CA, et al. Changes in tuberculin skin test positivity over 20 years in periurban shantytowns in Lima, Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;89(3):507-15.
174. Ncayiyana JR, Bassett J, West N, Westreich D, Musenge E, Emch M, et al. Prevalence of latent tuberculosis infection and predictive factors in an urban informal settlement in Johannesburg, South Africa: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis.* 2016;16(1):661.
175. Alzate A, Crespo MDP, Carrasquilla G, Corral R, Sanchez N, Muñoz A. Purified Protein Derivative (PPD) and HIV Infection in Cali, Colombia. *JAIDS.* 1993;6(6):630.
176. Barbosa A, Peña O, Valderrama-Aguirre A, Restrepo H. Factores de Riesgo para Tuberculosis en Trabajadores de Servicios de Urgencias, en dos Niveles de Atención en Salud. *Revista Colombiana de Salud Ocupacional.* 2015;4(2):30-3.
177. do Prado TN, Riley LW, Sanchez M, Fregona G, Peres RL, Gonçalves L, et al. Prevalence and risk factors for latent tuberculosis infection among primary health care workers in Brazil. *Cad Saúde Pública.* 2017;33(12):1-13.
178. Kargi A, Ilgazli AH, Yildiz F, Boyaci H, Basyigit IE. Latent tuberculosis infection in healthcare workers at a tertiary care center. *Biomedical Research.* 2017;28(2):657-62.

179. Basera TJ, Ncayiyana J, Engel ME. Prevalence and risk factors of latent tuberculosis infection in Africa: a systematic review and meta-analysis protocol. *BMJ Open*. 2017;7(7):e012636.
180. Stout JE, Wu Y, Ho CS, Pettit AC, Feng P-J, Katz DJ, et al. Evaluating latent tuberculosis infection diagnostics using latent class analysis. *Thorax*. 2018;73(11):1062.
181. van Zyl-Smit RN, Zwerling A, Dheda K, Pai M. Within-subject variability of interferon-gamma assay results for tuberculosis and boosting effect of tuberculin skin testing: a systematic review. *PLoS One*. 2009;4(12):e8517.
182. Chegou NN, Heyckendorf J, Walzl G, Lange C, Ruhwald M. Beyond the IFN-gamma horizon: biomarkers for immunodiagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Respir J*. 2014;43(5):1472-86.
183. Schablon A, Beckmann G, Harling M, Diel R, Nienhaus A. Prevalence of latent tuberculosis infection among health care workers in a hospital for pulmonary diseases. *Journal of occupational medicine and toxicology (London, England)*. 2009;4:1-.
184. Rueda ZV, Arroyave L, Marin D, Lopez L, Keynan Y, Giraldo MR, et al. High prevalence and risk factors associated with latent tuberculous infection in two Colombian prisons. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2014;18(10):1166-71.
185. Wang L, Turner MO, Elwood RK, Schulzer M, FitzGerald JM. A meta-analysis of the effect of Bacille Calmette Guerin vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax*. 2002;57(9):804-9.
186. Mahomed H, Hawkrigde T, Verver S, Geiter L, Hatherill M, Abrahams DA, et al. Predictive factors for latent tuberculosis infection among adolescents in a high-burden area in South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011;15(3):331-6.
187. Farhat M, Greenaway C, Pai M, Menzies D. False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006;10(11):1192-204.
188. Gao L, Lu W, Bai L, Wang X, Xu J, Catanzaro A, et al. Latent tuberculosis infection in rural China: baseline results of a population-based, multicentre, prospective cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(3):310-9.
189. Lee SJ, Lee SH, Kim YE, Cho YJ, Jeong YY, Kim HC, et al. Risk factors for latent tuberculosis infection in close contacts of active tuberculosis patients in South Korea: a prospective cohort study. *BMC Infect Dis*. 2014;14:566.
190. Rhines AS. The role of sex differences in the prevalence and transmission of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2013;93(1):104-7.
191. Kizza FN, List J, Nkwata AK, Okwera A, Ezeamama AE, Whalen CC, et al. Prevalence of latent tuberculosis infection and associated risk factors in an urban African setting. *BMC infectious diseases*. 2015;15:165-.
192. Cook VJ, Sun SJ, Tapia J, Muth SQ, Arguella DF, Lewis BL, et al. Transmission network analysis in tuberculosis contact investigations. *J Infect Dis*. 2007;196(10):1517-27.
193. Boccia D, Hargreaves J, Ayles H, Fielding K, Simwinga M, Godfrey-Faussett P. Tuberculosis infection in Zambia: the association with relative wealth. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80(6):1004-11.
194. Klovdahl AS, Graviss EA, Yaganehdoost A, Ross MW, Wanger A, Adams GJ, et al. Networks and tuberculosis: an undetected community outbreak involving public places. *Social science & medicine (1982)*. 2001;52(5):681-94.

195. Verhagen LM, Hermans PW, Warris A, de Groot R, Maes M, Villalba JA, et al. Helminths and skewed cytokine profiles increase tuberculin skin test positivity in Warao Amerindians. *Tuberculosis (Edinb)*. 2012;92(6):505-12.
196. Oni T, Gideon HP, Bangani N, Tsekela R, Seldon R, Wood K, et al. Smoking, BCG and Employment and the Risk of Tuberculosis Infection in HIV-Infected Persons in South Africa. *PLOS ONE*. 2012;7(10):e47072.
197. Silva DR, Munoz-Torrico M, Duarte R, Galvao T, Bonini EH, Arbex FF, et al. Risk factors for tuberculosis: diabetes, smoking, alcohol use, and the use of other drugs. *Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*. 2018;44(2):145-52.
198. Rehm J, Samokhvalov AV, Neuman MG, Room R, Parry C, Lonnroth K, et al. The association between alcohol use, alcohol use disorders and tuberculosis (TB). A systematic review. *BMC public health*. 2009;9:450.
199. Happel KI, Nelson S. Alcohol, immunosuppression, and the lung. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2005;2(5):428-32.
200. Bagasra O, Howedy A, Kajdacsy-Balla A. Macrophage function in chronic experimental alcoholism. I. Modulation of surface receptors and phagocytosis. *Immunology*. 1988;65(3):405-9.
201. Dorio RJ, Forman HJ. Ethanol inhibition of signal transduction in superoxide production by rat alveolar macrophages. A proposed mechanism for ethanol related pneumonia. *Annals of clinical and laboratory science*. 1988;18(3):190-4.
202. Antony VB, Godbey SW, Hott JW, Queener SF. Alcohol-induced inhibition of alveolar macrophage oxidant release in vivo and in vitro. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 1993;17(2):389-93.
203. Dehne NE, Mendenhall CL, Roselle GA, Grossman CJ. Cell-mediated immune responses associated with short term alcohol intake: time course and dose dependency. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 1989;13(2):201-5.
204. Szabo G, Mandrekar P, Catalano D. Inhibition of superantigen-induced T cell proliferation and monocyte IL-1 beta, TNF-alpha, and IL-6 production by acute ethanol treatment. *J Leukoc Biol*. 1995;58(3):342-50.
205. Crews FT, Bechara R, Brown LA, Guidot DM, Mandrekar P, Oak S, et al. Cytokines and alcohol. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2006;30(4):720-30.
206. Pruett SB, Schwab C, Zheng Q, Fan R. Suppression of innate immunity by acute ethanol administration: a global perspective and a new mechanism beginning with inhibition of signaling through TLR3. *J Immunol*. 2004;173(4):2715-24.
207. Latif O, Peterson JD, Waltenbaugh C. Alcohol-mediated polarization of type 1 and type 2 immune responses. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2002;7:a135-47.
208. Theruvathu JA, Jaruga P, Nath RG, Dizdaroglu M, Brooks PJ. Polyamines stimulate the formation of mutagenic 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts from acetaldehyde. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(11):3513-20.
209. Fang JL, Vaca CE. Development of a 32P-postlabelling method for the analysis of adducts arising through the reaction of acetaldehyde with 2'-deoxyguanosine-3'-monophosphate and DNA. *Carcinogenesis*. 1995;16(9):2177-85.
210. Soh AZ, Chee CBE, Wang Y-T, Yuan J-M, Koh W-P. Alcohol drinking and cigarette smoking in relation to risk of active tuberculosis: prospective cohort study. *BMJ Open Respir Res*. 2017;4(1):e000247.

211. Narasimhan P, MacIntyre CR, Mathai D, Wood J. High rates of latent TB infection in contacts and the wider community in South India. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2017;111(2):55-61.
212. WHO. Global status report on alcohol and health. Geneva: World Health Organization. 2018:1-478.
213. Lonnroth K, Jaramillo E, Williams BG, Dye C, Raviglione M. Drivers of tuberculosis epidemics: the role of risk factors and social determinants. *Social science & medicine* (1982). 2009;68(12):2240-6.
214. Ministry of Health. Guidelines for Tuberculosis Control in New Zealand 2010. Wellington: Ministry of Health; 2010.
215. Moran-Mendoza O, Marion SA, Elwood K, Patrick DM, FitzGerald JM. Tuberculin skin test size and risk of tuberculosis development: a large population-based study in contacts. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007;11(9):1014-20.
216. Cao D, Zhang Z, Yang Z, Ma S, Sun Z, Duan H, et al. The association between tuberculin skin test result and active tuberculosis risk of college students in Beijing, China: a retrospective cohort study. *BMC Infectious Diseases*. 2019;19(1):619.
217. Shero KC, Legesse M, Medhin G, Belay M, Bjune G, Abebe F. Re-assessing tuberculin skin test (TST) for the diagnosis of tuberculosis (TB) among African migrants in Western Europe and USA. *Journal of Tuberculosis Research*. 2014;2(01):4.
218. Hanrahan CF, Golub JE, Mohapi L, Tshabangu N, Modisenyane T, Chaisson RE, et al. Body mass index and risk of tuberculosis and death. *AIDS*. 2010;24(10):1501-8.
219. Lonnroth K, Williams BG, Cegielski P, Dye C. A consistent log-linear relationship between tuberculosis incidence and body mass index. *Int J Epidemiol*. 2010;39(1):149-55.
220. Patra J, Jha P, Rehm J, Suraweera W. Tobacco Smoking, Alcohol Drinking, Diabetes, Low Body Mass Index and the Risk of Self-Reported Symptoms of Active Tuberculosis: Individual Participant Data (IPD) Meta-Analyses of 72,684 Individuals in 14 High Tuberculosis Burden Countries. *PLOS ONE*. 2014;9(5):e96433.
221. Lin HH, Wu CY, Wang CH, Fu H, Lonnroth K, Chang YC, et al. Association of Obesity, Diabetes, and Risk of Tuberculosis: Two Population-Based Cohorts. *Clin Infect Dis*. 2018;66(5):699-705.
222. Kim SJ, Ye S, Ha E, Chun EM. Association of body mass index with incident tuberculosis in Korea. *PLOS ONE*. 2018;13(4):e0195104.
223. Meckenstock R, Therby A. [Modifications of immunity in obesity: The impact on the risk of infection]. *La Revue de medecine interne*. 2015;36(11):760-8.
224. Stofkova A. Leptin and adiponectin: from energy and metabolic dysbalance to inflammation and autoimmunity. *Endocrine regulations*. 2009;43(4):157-68.
225. Mancuso P. Obesity and respiratory infections: does excess adiposity weigh down host defense? *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2013;26(4):412-9.
226. Saag LA, LaValley MP, Hochberg NS, Cegielski JP, Pleskunas JA, Linas BP, et al. Low body mass index and latent tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2018;22(4):358-65.
227. Schaible UE, Kaufmann SH. Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts. *PLoS medicine*. 2007;4(5):e115.
228. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol*. 1996;20(10):1161-81.

229. Rugge M, Correa P, Dixon MF, Hattori T, Leandro G, Lewin K, et al. Gastric dysplasia: the Padova international classification. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(2):167-76.
230. Mera R, Fontham ET, Bravo LE, Bravo JC, Piazuelo MB, Camargo MC, et al. Long term follow up of patients treated for *Helicobacter pylori* infection. *Gut*. 2005;54(11):1536-40.
231. Mera RM, Bravo LE, Camargo MC, Bravo JC, Delgado AG, Romero-Gallo J, et al. Dynamics of *Helicobacter pylori* infection as a determinant of progression of gastric precancerous lesions: 16-year follow-up of an eradication trial. *Gut*. 2017.
232. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon AT, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut*. 2017;66(1):6-30.
233. Figueroa M, Cortés A, Pazos A, Bravo L. Sensibilidad in vitro a amoxicilina y claritromicina de *Helicobacter pylori* obtenido de biopsias gástricas de pacientes en zona de bajo riesgo para cáncer gástrico. *Biomédica*. 2012;32(1).
234. Bustamante-Rengifo JA, Matta AJ, Pazos A, Bravo LE. In vitro effect of amoxicillin and clarithromycin on the 3' region of *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates. *World J Gastroenterol*. 2013;19(36):6044-54.
235. Kornetsky S. The Clinical Investigation Policy and Procedure Manual: Research Blood Drawing Guidelines. Boston: Children's Hospital Boston; 2012.
236. Greenberg ER, Anderson GL, Morgan DR, Torres J, Chey WD, Bravo LE, et al. 14-day triple, 5-day concomitant, and 10-day sequential therapies for *Helicobacter pylori* infection in seven Latin American sites: a randomised trial. *Lancet*. 2011;378(9790):507-14.
237. de Sablet T, Piazuelo MB, Shaffer CL, Schneider BG, Asim M, Chaturvedi R, et al. Phylogeographic origin of *Helicobacter pylori* is a determinant of gastric cancer risk. *Gut*. 2011;60(9):1189-95.
238. El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Schoenberg JB, et al. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology*. 2003;124(5):1193-201.
239. Kim N, Park YS, Cho SI, Lee HS, Choe G, Kim IW, et al. Prevalence and risk factors of atrophic gastritis and intestinal metaplasia in a Korean population without significant gastroduodenal disease. *Helicobacter*. 2008;13(4):245-55.
240. Lee JY, Kim N. Diagnosis of *Helicobacter pylori* by invasive test: histology. *Annals of translational medicine*. 2015;3(1):10-.
241. Siavoshi F, Saniee P, Khalili-Samani S, Hosseini F, Malakutikhah F, Mamivand M, et al. Evaluation of methods for *H. pylori* detection in PPI consumption using culture, rapid urease test and smear examination. *Ann Transl Med*. 2015;3(1):11.
242. Karnes WE, Jr., Samloff IM, Siurala M, Kekki M, Sipponen P, Kim SW, et al. Positive serum antibody and negative tissue staining for *Helicobacter pylori* in subjects with atrophic body gastritis. *Gastroenterology*. 1991;101(1):167-74.
243. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*. 2017;153(2):420-9.
244. Cortés A, Carmona F, Carrascal E. *Helicobacter pylori* en biopsias de mucosa gástrica. *Colomb Med*. 1987;18:101-9.
245. Carmona F, Cortés A. Búsqueda bacteriológica e histológica de *Campylobacter pyloris* en mucosa gástrica. *Biomedica*. 1988;8(1):28-36.
246. Montañó JI, Dossman X, Herrera JA, Bromet A, Moreno CH. *Helicobacter pylori* and psychosocial stress in patients with chronic gastritis. *Colomb Med*. 2006;37:1-6.

247. Nahar S, Kibria K, Hossain M, Sultana J, Sarker S, Engstrand L, et al. Evidence of intra-familial transmission of *Helicobacter pylori* by PCR-based RAPD fingerprinting in Bangladesh. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28(7):767-73.
248. Blaser MJ, Chen Y, Reibman J. Does *Helicobacter pylori* protect against asthma and allergy? *Gut*. 2008;57(5):561-7.
249. Kouitcheu LB, Noundjeu ML, Leundji H. Potential risk factors and prevalence of *Helicobacter pylori* infection among adult patients with dyspepsia symptoms in Cameroon. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):278.
250. Monno R, De Laurentiis V, Trerotoli P, Roselli AM, Ierardi E, Portincasa P. *Helicobacter pylori* infection: association with dietary habits and socioeconomic conditions. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. 2019.
251. Ghasemi HR, Ghobakhlou M, Akbari P, Dehghan A, Seif Rabiei MA. Correlation between the Intensity of *Helicobacter pylori* Colonization and Severity of Gastritis. *Gastroenterology Research and Practice*. 2017;2017:5.
252. Seid A, Demsiss W. Feco-prevalence and risk factors of *Helicobacter pylori* infection among symptomatic patients at Dessie Referral Hospital, Ethiopia. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):260.
253. Vesga FJ, Moreno Y, Ferrus MA, Ledesma-Gaitan LM, Campos C, Trespalacios AA. Correlation among fecal indicator bacteria and physicochemical parameters with the presence of *Helicobacter pylori* DNA in raw and drinking water from Bogota, Colombia. *Helicobacter*. 2019:e12582.
254. Moreno Y, Ferrus MA. Specific detection of cultivable *Helicobacter pylori* cells from wastewater treatment plants. *Helicobacter*. 2012;17(5):327-32.
255. Santiago P, Moreno Y, Ferrus MA. Identification of Viable *Helicobacter pylori* in Drinking Water Supplies by Cultural and Molecular Techniques. *Helicobacter*. 2015;20(4):252-9.
256. Lu Y, Redlinger TE, Avitia R, Galindo A, Goodman K. Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated municipal wastewater. *Applied and environmental microbiology*. 2002;68(3):1436-9.
257. Vesga FJ, Moreno Y, Ferrus MA, Campos C, Trespalacios AA. Detection of *Helicobacter pylori* in drinking water treatment plants in Bogota, Colombia, using cultural and molecular techniques. *International journal of hygiene and environmental health*. 2018;221(4):595-601.
258. Cheng Y, Macera CA, Davis DR, Blair SN. Physical activity and peptic ulcers. Does physical activity reduce the risk of developing peptic ulcers? *The Western journal of medicine*. 2000;173(2):101-7.
259. Campbell P, Sloan M, Kreiger N. Physical activity and stomach cancer risk: The influence of intensity and timing during the lifetime. *Eur J Cancer*. 2007;43:593-600.
260. Ahn JJ, Ghandour RA, McKiernan JM. New agents for bacillus Calmette-Guerin-refractory nonmuscle invasive bladder cancer. *Current opinion in urology*. 2014;24(5):540-5.
261. Shephard RJ. Cancers of the esophagus and stomach: potential mechanism behind the beneficial influence of physical activity. *Clin J Sport Med*. 2017;27:415-21.
262. Forner M, Collazos M, Barriga C. Effect of age on adherence and chemotaxis capacities of peritoneal macrophages. Influence of physical activity stress. *Mech Ageing Dev*. 1994;75:179-89.
263. Brandau S, Suttman H. Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: a success story with room for improvement. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2007;61(6):299-305.

264. Sipponen P, Marshall BJ. Gastritis and gastric cancer. Western countries. *Gastroenterol Clin North Am.* 2000;29(3):579-92, v-vi.
265. Zhang C, Yamada N, Wu Y-L, Wen M, Matsuhisa T, Matsukura N. Comparison of *Helicobacter pylori* infection and gastric mucosal histological features of gastric ulcer patients with chronic gastritis patients. *World journal of gastroenterology.* 2005;11(7):976-81.
266. Kim N, Park RY, Cho SI, Lim SH, Lee KH, Lee W, et al. *Helicobacter pylori* infection and development of gastric cancer in Korea: long-term follow-up. *J Clin Gastroenterol.* 2008;42(5):448-54.
267. Nogueira C, Figueiredo C, Carneiro F, Gomes AT, Barreira R, Figueira P, et al. *Helicobacter pylori* genotypes may determine gastric histopathology. *The American journal of pathology.* 2001;158(2):647-54.
268. Leung WK, Chan MC, To KF, Man EP, Ng EK, Chu ES, et al. *H. pylori* genotypes and cytokine gene polymorphisms influence the development of gastric intestinal metaplasia in a Chinese population. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(4):714-20.
269. Gold BD. New approaches to *helicobacter pylori* infection in children. *Current Gastroenterology Reports.* 2001;3(3):235-47.
270. Eshmuratov A, Nah JC, Kim N, Lee HS, Lee HE, Lee BH, et al. The correlation of endoscopic and histological diagnosis of gastric atrophy. *Dig Dis Sci.* 2010;55(5):1364-75.
271. Tian Y, Wan H, Lin Y, Xie X, Li Z, Tan G. Androgen receptor may be responsible for gender disparity in gastric cancer. *Med Hypotheses.* 2013;80(5):672-4.
272. Joo Y-E, Park H-K, Myung D-S, Baik G-H, Shin J-E, Seo G-S, et al. Prevalence and risk factors of atrophic gastritis and intestinal metaplasia: a nationwide multicenter prospective study in Korea. *Gut and liver.* 2013;7(3):303-10.
273. Bianchini F, Kaaks R, Vainio H. Overweight, obesity, and cancer risk. *The Lancet Oncology.* 2002;3(9):565-74.
274. MacInnis RJ, English DR, Hopper JL, Giles GG. Body size and composition and the risk of gastric and oesophageal adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 2006;118(10):2628-31.
275. O'Doherty MG, Freedman ND, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. A prospective cohort study of obesity and risk of oesophageal and gastric adenocarcinoma in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Gut.* 2012;61(9):1261-8.
276. Yang P, Zhou Y, Chen B, Wan HW, Jia GQ, Bai HL, et al. Overweight, obesity and gastric cancer risk: results from a meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cancer.* 2009;45(16):2867-73.
277. Levi Z, Kark JD, Twig G, Katz L, Leiba A, Derazne E, et al. Body mass index at adolescence and risk of noncardia gastric cancer in a cohort of 1.79 million men and women. *Cancer.* 2018;124(2):356-63.
278. Inoue M, Tsugane S. Insulin resistance and cancer: epidemiological evidence. *Endocrine-related cancer.* 2012;19(5):F1-8.
279. Shin CM, Kim N, Yang HJ, Cho SI, Lee HS, Kim JS, et al. Stomach cancer risk in gastric cancer relatives: interaction between *Helicobacter pylori* infection and family history of gastric cancer for the risk of stomach cancer. *J Clin Gastroenterol.* 2010;44(2):e34-9.
280. Rokkas T, Sechopoulos P, Pistiolas D, Margantinis G, Koukoulis G. *Helicobacter pylori* infection and gastric histology in first-degree relatives of gastric cancer patients: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2010;22(9):1128-33.

281. El-Omar EM, Oien K, Murray LS, El-Nujumi A, Wirz A, Gillen D, et al. Increased prevalence of precancerous changes in relatives of gastric cancer patients: critical role of *H. pylori*. *Gastroenterology*. 2000;118(1):22-30.
282. Praud D, Rota M, Rehm J, Shield K, Zatonski W, Hashibe M, et al. Cancer incidence and mortality attributable to alcohol consumption. *Int J Cancer*. 2016;138(6):1380-7.
283. Secretan B, Straif K, Baan R, Grosse Y, El Ghissassi F, Bouvard V, et al. A review of human carcinogens--Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *The Lancet Oncology*. 2009;10(11):1033-4.
284. Tramacere I, Negri E, Pelucchi C, Bagnardi V, Rota M, Scotti L, et al. A meta-analysis on alcohol drinking and gastric cancer risk. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2012;23(1):28-36.
285. Han X, Xiao L, Yu Y, Chen Y, Shu H-H. Alcohol consumption and gastric cancer risk: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Oncotarget*. 2017;8(47):83237-45.
286. Wyatt TA, Kharbanda KK, McCaskill ML, Tuma DJ, Yanov D, DeVasure J, et al. Malondialdehyde-acetaldehyde-adducted protein inhalation causes lung injury. *Alcohol (Fayetteville, NY)*. 2012;46(1):51-9.
287. Meadows GG, Wallendal M, Kosugi A, Wunderlich J, Singer DS. Ethanol induces marked changes in lymphocyte populations and natural killer cell activity in mice. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 1992;16(3):474-9.
288. Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(1):7-19.
289. El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Schoenberg JB, et al. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology*. 2003;124(5):1193-201.
290. Alagoz S, Turkay C, Yonem O. The relationship between *Helicobacter pylori* intensity and histopathological findings in cases with chronic gastritis and duodenal ulcer. *Turk J Gastroenterol*. 2002;13(2):98-102.
291. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet*. 1975;2(7924):58-60.
292. van Doorn LJ, Figueiredo C, Rossau R, Jannes G, van Asbroeck M, Sousa JC, et al. Typing of *Helicobacter pylori* *vacA* Gene and Detection of *cagA* Gene by PCR and Reverse Hybridization. *J Clin Microbiol*. 1998;36(5):1271-6.
293. van Doorn LJ, Figueiredo C, Rossau R, Jannes G, van Asbroeck M, Sousa JC, et al. Typing of *Helicobacter pylori* *vacA* Gene and Detection of *cagA* Gene by PCR and Reverse Hybridization. *J Clin Microbiol*. 1998;36(5):1271-6.
294. Sicinschi LA, Correa P, Peek RM, Camargo MC, Delgado A, Piazuelo MB, et al. *Helicobacter pylori* Genotyping and Sequencing Using Paraffin-Embedded Biopsies from Residents of Colombian Areas with Contrasting Gastric Cancer Risks. *Helicobacter*. 2008;13(2):135-45.
295. Kabamba ET, Tuan VP, Yamaoka Y. Genetic populations and virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Infect Genet Evol*. 2018;60:109-16.
296. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunologia celular y molecular*. 6 E, editor. Barcelona: Elseiver; 2008. 539 p.
297. Babu S, Bhat SQ, Kumar NP, Jayantasri S, Rukmani S, Kumaran P, et al. Human Type 1 and 17 Responses in Latent Tuberculosis Are Modulated by Coincident Filarial Infection through Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 and Programmed Death-1. *J Infect Dis*. 2009;200(2):288-98.
298. Weiss G, Goodnough L. Anemia of Chronic Disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1011-23.

299. Affifi A, Clark V. Principal components analysis. In: Computer Aided Multivariate Analysis. New York: Chapman & Hall; 1990.
300. Martínez Ortega RM, Tuya Pendás LC, Martínez Ortega M, Pérez Abreu A, Cánovas AM. El coeficiente de correlación de los rangos de Spearman caracterización. Rev Haban Cienc Méd. 2009;8:0-.
301. Correa P, van Doorn LJ, Bravo JC, Ruiz B, Bravo LE, Realpe JL. Unsuccessful treatment results in survival of less virulent genotypes of *Helicobacter pylori* in Colombian patients. Am J Gastroenterol. 2000;95(2):564-6.
302. Rudi J, Rudy A, Maiwald M, Kuck D, Sieg A, Stremmel W. Direct determination of *Helicobacter pylori* vacA genotypes and cagA gene in gastric biopsies and relationship to gastrointestinal diseases. Am J Gastroenterol. 1999;94(6):1525-31.
303. Con SA, Takeuchi H, Valerín AL, Con-Wong R, Con-Chin GR, Con-Chin VG, et al. Diversity of *Helicobacter pylori* cagA and vacA Genes in Costa Rica: Its Relationship with Atrophic Gastritis and Gastric Cancer. Helicobacter. 2007;12(5):547-52.
304. Melo-Narváez MC, Rojas-Rengifo DF, Jiménez-Soto LF, Delgado MP, Mendoza de Molano B, Vera-Chamorro JF, et al. Genotipificación de cagA y de la región intermedia de vacA en cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes adultos colombianos y su asociación con enfermedades gástricas. Rev Colomb Gastroenterol. 2018;33(2):103-10.
305. Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between *Helicobacter pylori* iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries. J Clin Microbiol. 1999;37(7):2274-9.
306. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Jr., Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. J Biol Chem. 1995;270(30):17771-7.
307. Evans DG, Queiroz DM, Mendes EN, Evans DJ, Jr. *Helicobacter pylori* cagA status and s and m alleles of vacA in isolates from individuals with a variety of H. pylori-associated gastric diseases. J Clin Microbiol. 1998;36(11):3435-7.
308. Kidd M, Lastovica AJ, Atherton JC, Louw JA. Heterogeneity in the *Helicobacter pylori* vacA and cagA genes: association with gastroduodenal disease in South Africa? Gut. 1999;45(4):499-502.
309. van Doorn LJ, Schneeberger PM, Nouhan N, Plaisier AP, Quint WG, de Boer WA. Importance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA status for the efficacy of antibiotic treatment. Gut. 2000;46(3):321-6.
310. Atherton JC. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. Gut. 1997;40(6):701-3.
311. El Khadir M, Alaoui Boukhris S, Benajah D-A, El Rhazi K, Ibrahimi SA, El Abkari M, et al. VacA and CagA Status as Biomarker of Two Opposite End Outcomes of *Helicobacter pylori* Infection (Gastric Cancer and Duodenal Ulcer) in a Moroccan Population. PLOS ONE. 2017;12(1):e0170616.
312. Acosta N, Quiroga A, Delgado P, Bravo MM, Jaramillo C. *Helicobacter pylori* CagA protein polymorphisms and their lack of association with pathogenesis. World J Gastroenterol. 2010;16(31):3936-43.
313. Shokrzadeh L, Baghaei K, Yamaoka Y, Dabiri H, Jafari F, Sahebekhtiari N, et al. Analysis of 3'-end variable region of the cagA gene in *Helicobacter pylori* isolated from Iranian population. Journal of gastroenterology and hepatology. 2010;25(1):172-7.
314. Wang F, Meng W, Wang B, Qiao L. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. Cancer Letters. 2014;345(2):196-202.

315. Soltermann A, Koetzer S, Eigenmann F, Komminoth P. Correlation of *Helicobacter pylori* virulence genotypes *vacA* and *cagA* with histological parameters of gastritis and patient's age. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2007;20(8):878-83.
316. Fox JG, Correa P, Taylor NS, Thompson N, Fontham E, Janney F, et al. High prevalence and persistence of cytotoxin-positive *Helicobacter pylori* strains in a population with high prevalence of atrophic gastritis. *Am J Gastroenterol.* 1992;87(11):1554-60.
317. Burl S, Adetifa UJ, Cox M, Touray E, Ota MO, Marchant A, et al. Delaying bacillus Calmette-Guerin vaccination from birth to 4 1/2 months of age reduces postvaccination Th1 and IL-17 responses but leads to comparable mycobacterial responses at 9 months of age. *J Immunol.* 2010;185(4):2620-8.
318. Sutherland JS, de Jong BC, Jeffries DJ, Adetifa IM, Ota MOC. Production of TNF- α , IL-12(p40) and IL-17 Can Discriminate between Active TB Disease and Latent Infection in a West African Cohort. *PLOS ONE.* 2010;5(8):e12365.
319. La Manna MP, Orlando V, Li Donni P, Sireci G, Di Carlo P, Cascio A, et al. Identification of plasma biomarkers for discrimination between tuberculosis infection/disease and pulmonary non tuberculosis disease. *PLoS One.* 2018;13(3):e0192664.
320. Kawaguchi M, Kokubu F, Huang S-K, Homma T, Odaka M, Watanabe S, et al. The IL-17F signaling pathway is involved in the induction of IFN- γ -inducible protein 10 in bronchial epithelial cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2007;119(6):1408-14.
321. Azzurri A, Sow OY, Amedei A, Bah B, Diallo S, Peri G, et al. IFN- γ -inducible protein 10 and pentraxin 3 plasma levels are tools for monitoring inflammation and disease activity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes and Infection.* 2005;7(1):1-8.
322. Petruccioli E, Scriba TJ, Petrone L, Hatherill M, Cirillo DM, Joosten SA, et al. Correlates of tuberculosis risk: predictive biomarkers for progression to active tuberculosis. *Eur Respir J.* 2016;48(6):1751.
323. Wang S, Diao N, Lu C, Wu J, Gao Y, Chen J, et al. Evaluation of the Diagnostic Potential of IP-10 and IL-2 as Biomarkers for the Diagnosis of Active and Latent Tuberculosis in a BCG-Vaccinated Population. *PLOS ONE.* 2012;7(12):e51338.
324. Biselli R, Mariotti S, Sargentini V, Sauzullo I, Lastilla M, Mengoni F, et al. Detection of interleukin-2 in addition to interferon-gamma discriminates active tuberculosis patients, latently infected individuals, and controls. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(8):1282-4.
325. Sun Q, Wei W, Sha W. Potential Role for *Mycobacterium tuberculosis* Specific IL-2 and IFN- γ Responses in Discriminating between Latent Infection and Active Disease after Long-Term Stimulation. *PloS one.* 2016;11(12):e0166501-e.
326. Wang S, Li Y, Shen Y, Wu J, Gao Y, Zhang S, et al. Screening and identification of a six-cytokine biosignature for detecting TB infection and discriminating active from latent TB. *J Transl Med.* 2018;16(1):206-.
327. Ruhwald M, Bodmer T, Maier C, Jepsen M, Haaland MB, Eugen-Olsen J, et al. Evaluating the potential of IP-10 and MCP-2 as biomarkers for the diagnosis of tuberculosis. *Eur Respir J.* 2008;32(6):1607.
328. Guyot-Revol V, Innes JA, Hackforth S, Hinks T, Lalvani A. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(7):803-10.

329. Wammes LJ, Hamid F, Wiria AE, de Gier B, Sartono E, Maizels RM, et al. Regulatory T cells in human geohelminth infection suppress immune responses to BCG and Plasmodium falciparum. Eur J Immunol. 2010;40(2):437-42.
330. Frahm M, Goswami ND, Owzar K, Hecker E, Mosher A, Cadogan E, et al. Discriminating between latent and active tuberculosis with multiple biomarker responses. Tuberculosis (Edinb). 2011;91(3):250-6.

10 ANEXOS

ANEXO 1. Cuestionario estandarizado para adquisición de información de los participantes

HOSPITAL UNIVERSITARIO DEL VALLE EVARISTO GARCIA ESE
UNIVERSIDAD DEL VALLE
HOSPITAL SAN JUAN DE DIOS
HOSPITAL VERDE CAÑAVERALEJO-ESE LADERA
HOSPITAL JOAQUIN PAZ BORRERO-ESE NORTE

Efecto de la coinfección por *Helicobacter pylori* y/o helmintos sobre la respuesta inmune específica a *Mycobacterium tuberculosis* en individuos con infección tuberculosa latente

La Universidad del Valle, desea llevar a cabo un estudio en el que se incluirán adolescentes y adultos de ambos géneros con edades en un rango de 14 a 65 años residentes de la ciudad de Cali, con el objeto de estudiar el efecto de la coinfección por *Helicobacter pylori* y helmintos sobre la respuesta inmune a *M. tuberculosis* en individuos con infección tuberculosa latente.

Las preguntas de este cuestionario pretenden conocer el entorno donde usted vive y algunos aspectos relacionados con su alimentación y su salud. Su participación en el estudio es voluntaria. Si usted decide participar, y más adelante cambia de opinión, puede retirarse del estudio cuando quiera. Recuerde que la información que usted nos proporcione será muy útil para ayudar a otras personas.

Por favor no deje de responder ninguna pregunta. Busque la opción que más se acerque a su realidad. Este es un documento anónimo y la información es confidencial, es decir que nadie conocerá sus respuestas.

De antemano le agradecemos su valiosa participación.

I. DATOS GENERALES

1. Código del estudio: ☐☐☐☐☐

2. Sexo: F ☐ M ☐

3. Fecha de nacimiento: Día: Mes: Año:

4. Edad (Años cumplidos):

5. Dirección de residencia: _____ Teléfono: _____

6.1 Dirección de un familiar: _____ Teléfono: _____

7. Ciudad: _____ : Barrio: _____ Estrato: _____

8. Comuna: _____ Número de años en los que ha vivido en la zona: _____

9. Peso (Kgs): _____ 10. Talla (cms): _____

11. Nivel Educativo: ☐ Primaria ☐ Secundaria ☐ Técnico ☐ Pregrado

12. Seguridad Social: ☐ Contributivo ☐ Subsidiado ☐ Vinculado ☐ No afiliado

13. Servicio que ordenó procedimiento: _____

14. Ocupación actual:

- | | |
|-------------------------------|--------------------------|
| 1. Empleado | ☐ |
| 2. Trabajador independiente | ☐ |
| 3. Pensionado | ☐ |
| 4. Incapacitado para trabajar | ☐ |
| 5. Desempleado | ☐ |
| 6. Ama de casa | ☐ |

II. ANTECEDENTES RELACIONADOS CON SU SALUD:

15. Patológicos:

15.1 Cáncer ☐ Sí ☐ No 15.2 Diabetes ☐ Sí ☐ No 15.3 Coagulopatía ☐ Sí ☐ No

15.4 Enfermedad renal crónica ☐ Sí ☐ No 15.5 Hepatopatía ☐ Sí ☐ No

15.6 Asma ☐ Sí ☐ No 15.7 EPOC ☐ Sí ☐ No 15.8 Cardiopatía ☐ Sí ☐ No

15.9 Várices esofágicas ☐ Sí ☐ No 15.10 VIH (+) ☐ Sí ☐ No

15.11 Tuberculosis ☐ Sí ☐ No 15.12 Enfermedad Psiquiátrica ☐ Sí ☐ No

15.11 Otro ☐Cuál: _____

16 Quirúrgicos:

16.1 Gastrectomía parcial o total ☐ Sí ☐ No

16.2 Cirugía cardíaca: ☐ Sí ☐ No 16.3 Cirugía estética (<3 meses): ☐ Sí ☐ No

16.4 Otra cirugía ☐ Sí ☐ No 16.5Cuál: _____

17. Farmacológicos:

17.1 Warfarina (Anticoagulante) ☐ Sí ☐ No 16.2 Aspirina ☐ Sí ☐ No

16.3 Ibuprofeno – AINE Hace menos de 1 semana: ☐ Sí ☐ No

Por más de dos días ☐ Sí ☐ No

16.4 Inmunosupresores (Azatioprina, ciclosporina, micofenolato, corticosteroides, sirolimus)

Sí ☐ No ☐

17 Antimicrobianos ☐ Si ☐ No

17.1 Macrólidos (Eritromicina, milocamicina, roxitromicina, claritromicina, Josamicina, azitromicina) ☐

17.2 Imidazoles (Clotrimazol, miconazol y ketoconazol) ☐ 17.3 Penicilinas ☐ 17.4

Cefalosporinas (Cefuroxima, cefamandol, cefonicida, ceforanida, cefoxitina, cefmetazola) ☐

17.5 Tetraciclinas (Metaciclina, doxiciclina, minociclina, limeciclina, rolitetraciclina, tigeciclina) ☐ 17.6

Antituberculosos (Isoniazida, etambutol, pirazinamida) ☐

17.7 Metronidazol ☐ 17.8 Albendazol ☐ 17.9. Mebendazol ☐ 17. 11 Praziquantel ☐

17.12 Ivermectina ☐ 17.13 Trimetropim ☐ 17.14 Antipalúdico (Cloroquina, artemisina,etc) ☐

17.15 Otro ☐ Cuál: _____

17.16 Hace Cuánto? Más de 1 mes ☐ Hace menos de 1 mes ☐ Cuántos días _____

18. Ha recibido tratamiento para una bacteria que se relacione con la gastritis ☐ Si ☐ No

18.1 Antiácidos (Milanta, bicarbonato de sodio, hidróxido de aluminio, hidróxido de magnesio) ☐

18.2 IBP (Omeprazol, lansoprazol, esomeprazol, rabeprazol, pantoprazol) ☐ 18.3

Antagonista-H₂ (Ranitidina y famotidina, cimetidina, nizatidina) ☐ 18.4 Otro

Cuál: ☐

18. 5 Hace más de 3 meses ☐ 18.6 Hace menos de 3 meses ☐

18.7 Por cuánto tiempo: más de una semana ☐ 18.8 Menos de 1 semana ☐

III. INFORMACION FAMILIAR & HABITOS DE VIDA

19. ¿Cuántas personas viven en su casa? |__||__|

20. ¿De qué material es la mayor parte del piso de su casa?

20.1 Tierra ☐ 20.2 Cemento ☐ 20.3 Baldosa ☐ 20.4 Madera ☐

21. ¿Cuántos cuartos tiene su vivienda sin contar pasillos, baños y cocina? |__||__|

22. Número de personas por cuarto? |__||__|

23. ¿Cuál es origen del agua que usted toma?

23.1 Acueducto ☐ 23.2 Pozo ☐ 23.3 Otro ☐ Cual? _____ 23.4 No sabe ☐

24. ¿Cómo es el drenaje de su casa?

24.1 Conectado al drenaje de la calle ☐ 24.2 Conectado a un pozo séptico ☐

24.3 Desagüe a un río o lago ☐ 24.4 No tienen drenaje ☐ 24.5 No sabe ☐

25. ¿En su casa tienen?

25.1 Televisor ☐ 25.2 Equipo de sonido ☐ 25.3 Estufa a gas ☐ 25.4 Nevera ☐

25.5 Lavadora ☐ 25.6 Vehículo (Moto, carro, camioneta) ☐

27. Ha fumado al menos una vez tabaco o alguno de los productos derivados del tabaco en los últimos 6 meses:

27.1 ☐ Si ☐ No ☐ No recuerda

28. ¿Fuma usted ahora? ☐ Si ☐ No

29. Está usted expuesto al humo de tabaco proveniente de algún miembro de su familia o compañero de trabajo que fuma: Si ☐ No ☐

30. Cuantos días a la semana consume usted alguna bebida alcohólica

31. Si la respuesta anterior fue afirmativa, por favor describa la cantidad y tipo de licor (cerveza, aguardiente, ron, whiskey) que consume

31.1 Un vaso pequeño (50 mL) ☐ Tipo:

31.2 Un vaso mediano (100 mL) ☐ Tipo:

31.3 Un vaso grande (250 mL) ☐ Tipo:

31.4 Media botella (350 mL) ☐ Tipo:

31.5 Botella (700-750 mL) ☐ Tipo:

32. Realiza actividad física ☐ Si ☐ No

32.1 Una vez por semana ☐ 32.2 >3 veces por semana ☐ 32.3 Diariamente ☐ 32.4 Nunca ☐

V. HABITOS ALIMENTICIOS

33. ¿Cuál es la frecuencia normal de consumo de los siguientes alimentos o bebidas a la semana?

	Unidad	Alimento	Consumo semanal?	
			SI	NO
33.1	1 vaso	Leche		
33.2	1 porción	Pan		
33.3	1 porción	Pasta		
33.4	1 porción	Arroz		
33.5	1 porción	Avena, trigo, cereales, maíz		
33.6	1 porción	Carne roja (res ó cerdo)		
33.7	1 porción	Carne salada ó nitrada (res ó cerdo)		
33.8	1 porción	Pollo		
33.9	1 porción	Pescado		
33.10	1 porción	Mariscos (Camarones, ostras, pulpo, caracoles, etc)		
33.11	1 porción	Embutidos (jamón, salchichón, salami, salchichas)		
33.12	1 unidad	Huevo		
33.13	1 porción	Queso		
33.14	1 porción	Granos (frijoles, lentejas, garbanzos, alverja)		
33.15	1 porción	Vegetales (excluya el consumo de plátanos verdes o maduros, papa, yuca u otros tubérculos)?		
33.16	1 unidad	Frutas cítricas (naranjas, toronjas, limones, mandarinas, kiwi, etc)		

34. Cómo considera usted su consumo de sal:

34.1 Bajo ☐ 34.2 Moderado ☐ 34.3 Alto ☐

35. Cada cuanto adiciona sal a los alimentos que están listos para comer:

35.1 Siempre ☐ 35.2 Casi siempre ☐ 35.3 Algunas veces ☐ 35.4 Nunca ☐

VI. HISTORIAL MEDICO

35. Presencia de cicatriz BCG (Vacuna tuberculosis)

35.1 Si ☐ 35.2 No ☐

36. Algún miembro de su familia sufre o ha sufrido de cáncer gástrico:

36.1 Si ☐ 36.2 No ☐ 36.3 No sabe ☐

Por favor indique el parentesco: _____

37. En este momento sufre usted de algún tipo de enfermedad:

37.1 Si ☐ 37.2 No ☐ 37.3 No sabe ☐

38. Si la respuesta anterior fue si, por favor indique cual(s)

38.1 _____

38.2 _____

38.3 _____

39. Número de veces que ha visitado al médico en los últimos 5 Años: |__| |__|

40. Razones por las cuales lo ha visitado:

40.1 _____

40.2 _____

40.3 _____

40.4 _____

41. Observaciones:

42. Fecha de la encuesta: Día: |__| |__| Mes: |__| |__| Año: |__| |__| |__| |__|

43. Nombre del encuestador: _____

ANEXO 2. Formato de consentimiento informado

HOSPITAL UNIVERSITARIO DEL VALLE EVARISTO GARCIA ESE
UNIVERSIDAD DEL VALLE
HOSPITAL SAN JUAN DE DIOS
HOSPITAL VERDE CAÑAVERALEJO-ESE LADERA
HOSPITAL JOAQUIN PAZ BORRERO-ESE NORTE

Efecto de la coinfección por *Helicobacter pylori* y/o helmintos sobre la respuesta inmune específica a *Mycobacterium tuberculosis* en individuos con infección tuberculosa latente

Señor (a) _____ CC _____ usted ha sido invitado (a) a participar en la presente investigación, la cual ha sido diseñada para evaluar el efecto de la coinfección por *Helicobacter pylori* (bacteria que infecta el estómago) y/o helmintos (parásitos intestinales) sobre la respuesta inmune a *Mycobacterium tuberculosis* en individuos con infección latente (es decir que están infectados por la bacteria *M. tuberculosis*, pero no están enfermos) de la ciudad Cali, una población donde la frecuencia de casos de tuberculosis es de 55 personas por cada 100.000 habitantes superior al promedio nacional que es de 34 personas por cada 100.000 habitantes, el 70 % de las personas están infectadas crónicamente por *Helicobacter pylori* y un 30 % de sus habitantes presentan colonización por algún tipo de helminto intestinal. Ha sido invitado (a), porque usted está programado para una endoscopia (examen interno) en el estómago por indicación de su médico tratante, quien ha considerado que debe estar en seguimiento por sospecharse una infección por *Helicobacter pylori* y lesiones en el estómago, y además presentó positividad en la prueba cutánea de la tuberculina con una induración (un área palpable, elevada y endurecida) ≥ 10 mm que indica que usted ha estado expuesto y posiblemente está infectado latentemente por *Mycobacterium tuberculosis* por vivir en una ciudad de alto riesgo de tuberculosis, pero no presenta síntomas de tuberculosis porque la infección no está activa. Durante la investigación no habrá intervención por parte de los investigadores, quienes se limitarán a observar si hay o no infección por *Mycobacterium tuberculosis*, igualmente infección de la mucosa gástrica por *H. pylori* e infestación por helmintos intestinales, análisis que toman alrededor de un mes, tiempo durante el cual estará participando de este estudio. Las personas no participantes en esta investigación son aquellos pacientes quienes voluntariamente no desean participar, y aquellos pacientes quienes no llenan los requisitos detallados abajo.

Se incluirán en el estudio 190 personas entre adolescentes y adultos de ambos sexos con edades en un rango de 14 a 65 años de cualquier grupo étnico residentes de la ciudad de Cali, con síntomas de dispepsia (una sensación de malestar en la parte superior del abdomen o el vientre durante o después de comer), programados para la realización de una endoscopia digestiva y con un resultado positivo en la prueba de la tuberculina (PPD), con integridad de sus facultades mentales y que firmen el formato de consentimiento o asentimiento del menor. Se excluirán pacientes con cáncer, diabetes, enfermedades respiratorias, enfermedad avanzada del hígado, corazón, VIH+/SIDA, con desordenes de coagulación sanguínea o bajo administración de medicamentos con anticoagulantes. Pacientes que hayan usado antibióticos, inhibidores de bomba de protones y/o bismuto dentro de los 3 meses previos a la endoscopia, historia de tratamiento específico contra *Helicobacter pylori* o tuberculosis, actual o reciente (< 3 meses), tratamiento prescrito para

alergias, malaria, o parásitos intestinales, al igual que pacientes con gastrectomía previa. También se excluirán los individuos quienes tengan resultados clínicos de laboratorio fuera de los rangos normales o positividad para el virus de hepatitis B o C, y mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.

Usted tendrá que contestar una encuesta con algunas preguntas para confirmar su elegibilidad que puede tomarle entre 10 a 15 minutos, si tiene alguna duda durante su desarrollo puede pedir aclaración a la enfermera o al coordinador de trabajo de campo. Si los exámenes que le realicen confirman que está infectado latentemente (infección no activa) por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, se le realizará un seguimiento para descartar otras coinfecciones frecuentes en la población como lo es la infección por *Helicobacter pylori* para la cual se le practicará una endoscopia que será realizada por el Dr. Jesús Arbey Hoyos un gastroenterólogo experimentado que ha trabajado durante los últimos 20 años como especialista en la Unidad de Gastroenterología del Hospital Universitario del Valle, el procedimiento consiste en pasar un tubo a través de la boca y la garganta hasta el estómago, para examinar el interior del estómago, en algunas personas puede ocasionar molestias pero no es un procedimiento doloroso. Durante la endoscopia, se colectará además de las 4 biopsias habituales, 6 biopsias adicionales (fragmentos del revestimiento interno del estómago del tamaño de medio grano de lenteja). Adicionalmente, se tomará una muestra de materia fecal para la identificación de parásitos intestinales y una muestra de sangre colectada en 3 tubos. El volumen de sangre a extraer considerando la edad y peso del individuo es de 18 mL en adolescentes y adultos, estos valores no exceden el 1 % de su volumen total sanguíneo, y permitirá determinar el tipo de defensa inmune contra las infecciones que se le diagnostiquen. Todas las muestras serán analizadas por personal experto en los laboratorios de la sección de bacteriología y parasitología del Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle de Cali.

Este es un estudio de investigación que ayudará a los médicos a entender mejor como la coinfección por *Helicobacter pylori* y helmintos frecuentes en poblaciones de países en desarrollo, pueden alterar la respuesta inmune a *Mycobacterium tuberculosis* posiblemente favoreciendo o retardando su progresión a tuberculosis, conocimiento que puede en un futuro servir para diseñar estrategias adecuadas de prevención o tratamiento que contribuya a disminuir el número de casos de tuberculosis a nivel local, nacional e internacional. Las muestras recogidas, serán usadas para propósitos de esta investigación, o eventualmente de las investigaciones que se deriven con fines científicos. Los resultados obtenidos en este estudio serán puestos a disposición de su médico tratante, quien definirá y direccionará el tratamiento, el cual estará a cargo de su sistema de aseguramiento.

Existe un pequeño riesgo de sangrado excesivo y de perforar el estómago (riesgo menor de 1 en 10.000) durante el desarrollo de la endoscopia como resultado de tomar muestras adicionales, riesgo que será minimizado por la experiencia del gastroenterólogo. En cuanto a la prueba cutánea de la tuberculina, igualmente, existe un pequeño riesgo de enrojecimiento e inflamación grave del brazo en personas que hayan tenido previamente una prueba positiva a la PPD y que se hagan la prueba nuevamente, esta reacción también se puede presentar en unas cuantas personas que no hayan sido examinadas antes, en caso de ocurrir se realizará un tratamiento específico de acuerdo a los procedimientos médico-quirúrgicos vigentes en el Hospital participante. Así mismo, durante la extracción de sangre aunque es un procedimiento habitual, podría formarse un hematoma (hinchazón) producto del desbordamiento de la sangre en el tejido, durante o después de la punción,

acompañado de dolor, en este caso se procederá a retirar inmediatamente el torniquete y la aguja, y después, realizar una compresión local durante dos minutos a acompañado de compresas frías para aliviar el dolor, igualmente, para prevenir la lesión de algún nervio, se evitará la inserción rápida o profunda de la aguja. La posibilidad de desarrollar un proceso infeccioso, aunque baja será minimizada mediante el uso de algodón mojado en alcohol etílico, junto con un corto intervalo entre la retirada del protector de la aguja y la venopunción, el parche adhesivo se abrirá únicamente en el momento de la aplicación en la piel del paciente y se mantendrá por lo menos 15 minutos después de la extracción, los costos de estos procedimientos serán asumidos con presupuesto del grupo de investigación. La participación en el estudio es voluntaria. Usted puede rehusarse a participar o retirarse del estudio en cualquier momento sin poner en riesgo, su tratamiento médico en esta institución en el presente o en el futuro.

Si nuevos descubrimientos tienen lugar durante el curso de la investigación que puede alterar el deseo de los participantes de continuar, dicha información será proporcionada al participante. Los resultados del estudio pueden ser proporcionados a la agencia que lo auspicia. Los resultados del estudio pueden ser publicados. La privacidad de los participantes en todos los casos será protegida y no será identificado en ninguna forma. No hay ningún costo por la toma de muestras adicionales, ni por la prueba intradérmica de la tuberculina o el procedimiento diagnóstico de endoscopia. Como el procedimiento de endoscopia está indicado por su médico tratante, el costo de las visitas médicas, procedimientos médicos y otros eventuales procedimientos derivados de los hallazgos de la endoscopia correrán a cargo del participante o de la aseguradora a la que este afiliado. Los gastos adicionales para evaluar las biopsias de mucosa gástrica; los estudios microbiológicos y moleculares, así como el diagnóstico e identificación de parásitos intestinales, indicados en el protocolo de la investigación serán cubiertos por el presupuesto del estudio.

El participante autoriza, el almacenamiento de sus datos de forma confidencial y su contacto para futuros estudios similares, previa aprobación del Comité de Ética de la Universidad del Valle. En cualquier caso, su participación es voluntaria. Si el participante no está de acuerdo con que se guarden sus datos y sus muestras debe marcar la siguiente casilla. No autorizo el uso de las muestras en futuros estudios ____ (marque con X). Si está de acuerdo o cambia de opinión en cualquier momento, por favor contactar a la Dra. Miryam Astudillo en Cali al teléfono en Cali 6670326 o 6670327 Extensión 1206 o al celular 3006096184.

El estudio ha sido discutido con usted y todas sus preguntas han sido resueltas. Entendiendo que si tiene preguntas adicionales en referencia a los derechos de los participantes, u otras inquietudes, ellas deben dirigirse a los investigadores relacionados a continuación en esta forma de consentimiento o puede contactar al Presidente del Comité de Ética de la Universidad del Valle Dra. Florencia Velasco, teléfono 5185677 de Cali o a la Investigadora Principal Dra. Miryam Astudillo, teléfono 5542494, 6670326 -27 Extensión 1206 de Cali, celular: 3006096184, o al Coinvestigador Dr. Javier Andres Bustamante, celular: 3006094440, o al Dr. Jesús Arbey Hoyos, Medico, gastroenterólogo del Hospital Universitario del Valle, celular: 3117906583.

Está de acuerdo con los términos detallados arriba y se le ha entregado una copia de esta forma de consentimiento.

Firma del participante
Cedula:

Fecha

Firma de quien obtiene el consentimiento
Cedula:

Fecha

Nombre Testigo 1
Cedula:

Nombre Testigo 2
Cedula:

El participante ha indicado que no puede leer. Se certifica que se le ha leído esta forma de consentimiento al participante y se le ha explicado que al firmar en el sitio arriba asignado, el participante ha indicado su acuerdo en participar del estudio.

Firma del lector
Cedula:

Fecha

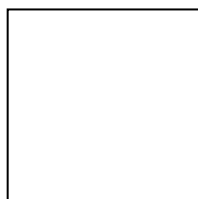
Firma del coinvestigador
Cedula:

Fecha

Nombre Testigo 1
Cedula:

Nombre Testigo 2
Cedula:

El participante ha indicado que no sabe escribir, ni firmar, para lo cual autoriza el registro de la huella dactilar de su dedo índice derecho, además de su nombre completo y número de célula que a continuación se transcribe.



Huella del participante

Nombre participante
Cedula:

Fecha

Testigo 1
Cedula:

Testigo 2
Cedula:

Nombre de quien transcribe

Fecha

ANEXO 3. Aval del comité de ética institucional al proyecto

Comité Institucional de Revisión de Ética Humana
Facultad de Salud



ACTA DE APROBACIÓN N° 008 - 015

Proyecto: EFECTO DE LA COINFECCIÓN POR HELICOBACTER PYLORI Y/O
HELMINTOS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE ESPECÍFICA A MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS EN INDIVIDUOS CON INFECCIÓN TUBERCULOSA LATENTE

Sometido por: MIRYAM ASTUDILLO HERNÁNDEZ/ MARÍA DEL PILAR CRESPO ORTIZ/JAVIER
ANDRÉS BUSTAMANTE RENGIFO/ALVARO PAZOS

Código Interno: 057 - 015 Fecha en que fue sometido: 25 05 2015

El Consejo de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, ha establecido el Comité Institucional de Revisión de Ética Humana (CIREH), el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión en 2002; y el Código de Regulaciones Federales, título 45, parte 46, para la protección de sujetos humanos, del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos 2000.

Este Comité certifica que:

1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:

- | | |
|---|---|
| ☒ Resumen del proyecto | ☒ Protocolo de investigación |
| ☒ Formato de consentimiento informado | ☒ Instrumento de recolección de datos |
| ☐ Folleto del investigador (si aplica) | ☒ Cartas de las instituciones participantes |
| ☐ Resultados de evaluación por otros comités (si aplica) | |

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité:

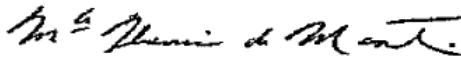
3. Según las categorías de riesgo establecidas en el artículo 11 de la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, el presente estudio tiene la siguiente **Clasificación de Riesgo**:

☐ SIN RIESGO ☐ RIESGO MÍNIMO ☒ RIESGO MAYOR DEL MÍNIMO

4. Que las **medidas** que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.
5. La forma de obtener el **consentimiento** informado de los participantes en el estudio es adecuada.
6. Este proyecto será **revisado nuevamente** en la próxima reunión plenaria del Comité, sin embargo, el Comité puede ser convocado a solicitud de algún miembro del Comité o de las directivas institucionales para revisar cualquier asunto relacionado con los derechos y el bienestar de los sujetos involucrados en este estudio.
7. **Informará** inmediatamente a las directivas institucionales:
 - a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
 - b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.
8. **Informará** inmediatamente a las directivas institucionales toda información que reciba acerca de:
 - a. Lesiones a sujetos humanos.

- Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
- b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por el Comité.
9. El presente proyecto ha sido **aprobado** por un periodo de **1 año** a partir de la fecha de aprobación. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.
10. El **investigador principal** deberá informar al Comité:
- Cualquier cambio que se proponga introducir en este proyecto. Estos cambios no podrán iniciarse sin la revisión y aprobación del Comité excepto cuando sean necesarios para eliminar peligros inminentes para los sujetos.
 - Cualquier problema imprevisto que involucre riesgos para los sujetos u otros.
 - Cualquier evento adverso serio dentro de las primeras 24 horas de ocurrido, al secretario(a) y al presidente (Anexo 1).
 - Cualquier conocimiento nuevo respecto al estudio, que pueda afectar la tasa riesgo/beneficio para los sujetos participantes.
 - cualquier decisión tomada por otros comités de ética.
 - La terminación prematura o suspensión del proyecto explicando la razón para esto.
 - El investigador principal deberá presentar un informe al final del año de aprobación. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.

Firma:



Fecha:

10 03 2016

Nombre:

MARIA FLORENCIA VELASCO

Capacidad
representativa:

PRESIDENTA

Teléfono: 5185677

CERTIFICACIÓN DE LA FACULTAD DE SALUD DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE

Por medio de la presente, certifico que la Facultad de Salud de la Universidad del Valle aprueba el proyecto arriba mencionado y respeta los principios, políticas y procedimientos de la Declaración de Helsinki de la Asamblea Médica Mundial, de la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y de la reglamentación vigente en investigación de la Universidad del Valle.

Firma:



Fecha:

10 03 2016

Nombre:

HERNÁN PIMIENTO

Capacidad representativa:

VICEDECANO DE LA FACULTAD DE SALUD

Teléfono: 5185680

ANEXO 4. Descripción de las variables empleadas en el estudio

	Variable	Definición Operacional	Tipo de variable	Nivel de Medición	Codificación para análisis	Método de recolección
Variable respuesta o dependiente	Diámetro PPD	Diámetro de la induración en respuesta a la aplicación del PPD	Cuantitativa discreta	Razón	0, 1, 2, 3, 4.... mm	Lectura de la PPD
	PPD-10	Induración ≥ 10 mm en la prueba de tuberculina	Cualitativa	Nominal dicotómica	0= < 10 mm 1= ≥ 10 mm	Lectura de la PPD
	PPD-15	Induración ≥ 15 mm en la prueba de tuberculina dependiente del estado BCG	Cualitativa	Nominal dicotómica	0= < 15 mm 1= ≥ 15 mm	Lectura de la PPD
	Infección por <i>Helicobacter pylori</i>	Presencia o ausencia de la infección por <i>H. pylori</i> según diagnóstico histológico	Cualitativa	Nominal dicotómica	0= <i>H. pylori</i> + 1= <i>H. pylori</i> -	Reporte histopatológico
	Infección por <i>Helicobacter pylori</i>	Presencia o ausencia de la infección por <i>H. pylori</i> según diagnóstico microbiológico	Cualitativa	Nominal dicotómica	0= <i>H. pylori</i> + 1= <i>H. pylori</i> -	Cultivo
	Tipo de gastritis	Clasificación histopatológica de la gastritis crónica	Cualitativa	Nominal dicotómica	0= No atrófica 1= Atrófica	Reporte histopatológico
	Puntaje histopatológico de Correa	Puntuación histopatológica que asigna valores numéricos a los diversos niveles de extensión, tipo y grado de las lesiones precancerosas (atrofia, metaplasia y displasia)	Cuantitativa discreta	Razón	1 a 6	Reporte histopatológico
	Niveles de TNF- α séricos	Producción de TNF- α en suero	Cuantitativa continua	Razón	0 a ∞ pg/mL	ELISA
Variables independientes	CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y SOCIO-ECONÓMICAS					
	Género	Género del participante reportado por el observador.	Cualitativa	Nominal	1= Masculino 2= Femenino	Encuesta
	Edad	Años de vida cumplidos reportados por participante y confirmado con la fecha de nacimiento.	Cuantitativa discreta	Razón	1= 14 a 19 años 2= 20 a 29 años 3= 30 a 39 años 4= 40 a 49 años 5= 50 a 59 años 6= 60 a 69 años	Encuesta
	Nivel social (estrato)	Estrato reportado por el entrevistado y validado con la dirección de residencia proporcionada	Cualitativa	Ordinal	1 a 6	Encuesta
	Hacinamiento	Número de personas por cuarto en el hogar del participante	Cuantitativa discreta	Razón	1= > 3 personas 2= ≤ 3 personas	Encuesta

	Variable	Definición Operacional	Tipo de variable	Nivel de Medición	Codificación para análisis	Método de recolección
	Nivel educativo	El máximo nivel de escolaridad cursado por el participante	Cualitativa	Ordinal	1= Post-secundaria 2= Secundaria 3= Primaria	Encuesta
	Situación laboral	Situación en la que se encuentran los participantes en relación con el mercado de trabajo	Cualitativa	Nominal dicotómica	1= Trabajador 2= Desempleado	Encuesta
	Zona de residencia	Zona de la ciudad donde reside actualmente el participante validado según el barrio y la dirección proporcionada	Cualitativa	Nominal	1= Norte 2= Ladera 3= Centro	Encuesta
	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS					
	Índice de masa corporal (IMC)	Razón entre el peso y la talla al cuadrado de un individuo medido por una enfermera	Cuantitativa continua	Razón	1= Delgadez 2= Sobrepeso 3= Obesidad 4= Normal	Encuesta
	Cicatriz BCG	Presencia o ausencia de la cicatriz BCG registrada por una enfermera	Cualitativa	Nominal dicotómica	1= No 2= Si	Encuesta
	PPD induración	Induración a la PPD en participantes con infección tuberculosa latente	Cuantitativa discreta	Razón	1= ≥ 15 mm 2= ≥ 10 -14 mm	Encuesta
	ESTILOS DE VIDA					
	Consumo de cigarrillo	Persona que fuma actualmente.	Cualitativa	Nominal dicotómica	1= Si 2= No	Encuesta
	Historia de tabaquismo	Persona que ha fumado en los 6 meses previos a la entrevista.	Cualitativa	Nominal dicotómica	1= Si 2= No	Encuesta
	Ejercicio	Realiza o no actividad física regular (>3 veces/semana)	Cualitativa	Nominal dicotómica	1= No 2= Si	Encuesta
	Consumo de alcohol	Número de días y cantidad consumida de alcohol en una semana	Cuantitativa discreta	Razón	1= Alto 2= Moderado 3= Bajo 4= No consumo	Encuesta
	Consumo de sal	Frecuencia de adición de sal a los alimentos	Cualitativa	Nominal	1= Siempre 2= Algunas veces 3= Nunca	Encuesta
	CARACTERÍSTICAS BACTERIANAS					

	Variable	Definición Operacional	Tipo de variable	Nivel de Medición	Codificación para análisis	Método de recolección
	Densidad de <i>H. pylori</i>	Cantidad de <i>H. pylori</i> presente en mucosa gástrica	Cualitativa	Ordinal	1= Abundante 2= Moderado 3= Escaso 4= Ausente	Reporte histopatológico
	Inflamación	Respuesta inflamatoria asociada a la infección por <i>H. pylori</i> en la mucosa gástrica	Cualitativa	Ordinal	1= Severo 2= Moderada 3= Leve 4= Ausente	Reporte histopatológico
	Virulencia de <i>H. pylori</i>	Clasificación de los genotipos basada en sus efectos a nivel celular	Cualitativa	Ordinal	1= Alta 2= Intermedia 3= Baja	Resultados moleculares
	Tipo de colonización por <i>H. pylori</i>	Presencia de uno o más genotipos coinfectantes en el mismo hospedero	Cualitativa	Nominal dicotómica	1= Mixta 2= Única	Resultados moleculares
	Número de repeticiones EPIYA	Número de motivos EPIYA presente en la proteína CagA de cada aislado de <i>H. pylori</i>	Cualitativa	Ordinal	1= 6 y 4 EPIYA 2= 5 y 4 EPIYA 3= 4 y 3 EPIYA 4= 6 EPIYA 5= 5 EPIYA 6= 4 EPIYA 7= 3 EPIYA	Resultados moleculares
	Niveles de citocinas en respuesta a CFP	Niveles de citocinas y quimiocinas (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IP-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, IFN- γ , y TNF- α) producidos por los PBMCs en respuesta antígenos de <i>M. tuberculosis</i> después de 72 de estimulación	Cuantitativa continua	Razón	0 a ∞ Log pg/mL	LUMINEX®MAP

ANEXO 5. Formato de consentimiento informado para autorización de procedimiento endoscópico

HOSPITAL UNIVERSITARIO DEL VALLE EVARISTO GARCIA ESE
UNIVERSIDAD DEL VALLE
HOSPITAL SAN JUAN DE DIOS
HOSPITAL VERDE CAÑAVERALEJO-ESE LADERA
HOSPITAL JOAQUIN PAZ BORRERO-ESE NORTE

Efecto de la coinfección por *Helicobacter pylori* y/o helmintos sobre la respuesta inmune específica a *Mycobacterium tuberculosis* en individuos con infección tuberculosa latente

Señor (a) _____ CC _____ usted ha sido invitado (a) a participar en la presente investigación, la cual ha sido diseñada para evaluar el efecto de la coinfección por *Helicobacter pylori* (bacteria que infecta el estómago) y/o helmintos (parásitos intestinales) sobre la respuesta inmune a *Mycobacterium tuberculosis* en individuos con infección latente (es decir que están infectados por la bacteria *M. tuberculosis*, pero no están enfermos) de la ciudad Cali, una población donde la frecuencia de casos de tuberculosis es de 55 personas por cada 100.000 habitantes superior al promedio nacional que es de 34 personas por cada 100.000 habitantes, el 70 % de las personas están infectadas crónicamente por *Helicobacter pylori* y un 30 % de sus habitantes presentan colonización por algún tipo de helminto intestinal. Ha sido invitado (a), porque usted ha consultado previamente su servicio de salud porque presenta síntomas crónicos como: ardor, dolor o fatiga en la boca del estómago, acompañado o no de ganas de vomitar, eructos y sensación de llenura sin mejoría alguna, y además se sospecha que usted ha estado expuesto, y posiblemente está infectado latentemente por *Mycobacterium tuberculosis* por vivir en una ciudad de alto riesgo de tuberculosis, pero no presenta síntomas de tuberculosis porque la infección no está activa.

Usted tendrá que contestar una encuesta para confirmar su elegibilidad que puede tomarle entre 10 a 15 minutos aproximadamente, si tiene alguna duda puede pedir aclaración a la enfermera o al coordinador de trabajo de campo. Adicionalmente, se le practicará una prueba cutánea de la tuberculina en la cara anterior de su antebrazo izquierdo sintiendo un ligero pinchazo, pasadas 72 h o a los 3 días siguientes deberá regresar nuevamente para la interpretación de esta prueba por parte de la enfermera del estudio. Si los resultados confirman que usted está infectado latentemente por la bacteria *M. tuberculosis*, se le realizará un seguimiento para descartar otras coinfecciones frecuentes en nuestra población.

Existe un pequeño riesgo de enrojecimiento e inflamación grave del brazo en personas que hayan tenido previamente una prueba positiva a la PPD y que se hagan la prueba nuevamente, esta reacción también se puede presentar en unas cuantas personas que no hayan sido examinadas antes, en caso de ocurrir se realizará un tratamiento específico de acuerdo a los procedimientos médico-quirúrgicos vigentes en el Hospital participante.

La participación en el estudio es voluntaria. Usted puede rehusarse a participar o retirarse del estudio en cualquier momento sin poner en riesgo, su tratamiento médico en esta institución en el presente o en el futuro. Si nuevos descubrimientos tienen lugar durante el

curso de la investigación que puede alterar el deseo de los participantes de continuar, dicha información será proporcionada al participante. Los resultados del estudio pueden ser proporcionados a la agencia que lo auspicia. Los resultados del estudio pueden ser publicados. La privacidad de los participantes en todos los casos será protegida y no será identificado en ninguna forma.

El participante autoriza, el almacenamiento de sus datos de forma confidencial y su contacto para futuros estudios similares, previa aprobación del Comité de Ética de la Universidad del Valle. En cualquier caso, su participación es voluntaria. Sí el participante no está de acuerdo con que se guarden sus datos y sus muestras debe marcar la siguiente casilla. No autorizo el uso de las muestras en futuros estudios ____ (marque con X). Si está de acuerdo o cambia de opinión en cualquier momento, por favor contactar a la Dra. Miryam Astudillo en Cali al teléfono en Cali 6670326 o 6670327 Extensión 1206 o al celular: 3006096184.

Está de acuerdo con los términos detallados arriba y se le ha entregado una copia de esta forma de consentimiento.

Firma del participante
Cedula:

Fecha

Firma de quien obtiene el consentimiento
Cedula:

Fecha

Nombre Testigo 1
Cedula:

Nombre Testigo 2
Cedula:

El participante ha indicado que no puede leer. Se certifica que se le ha leído esta forma de consentimiento al participante y se le ha explicado que al firmar en el sitio arriba asignado, el participante ha indicado su acuerdo en participar del estudio.

Firma del lector
Cedula:

Fecha

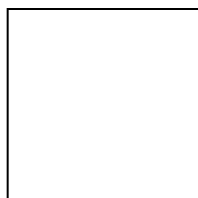
Firma del coinvestigador
Cedula:

Fecha

Nombre Testigo 1
Cedula:

Nombre Testigo 2
Cedula:

El participante ha indicado que no sabe escribir, ni firmar, para lo cual autoriza el registro de la huella dactilar de su dedo índice derecho, además de su nombre completo y número de cédula que a continuación se transcribe.



Huella del participante

Nombre participante
Cedula:

Fecha

Testigo 1
Cedula:

Testigo 2
Cedula:

Nombre de quien transcribe

Fecha

ANEXO 6. Genotipos y clasificación de la virulencia a partir de aislados de *H. pylori*

Genotipos	<i>cagA</i>		<i>vacA</i>				Total	Virulencia	Compendio	<i>n</i>
	+	-	s1	s2	m1	m2				
Colonización única										
<i>cagA</i> -; <i>vacA</i> s2/m2		-		-		+	+	Baja	Baja	2
<i>cagA</i> ++; <i>vacA</i> s1/m1	++		++		++		++++++	Alta	Alta	10
<i>cagA</i> ++; <i>vacA</i> s1/m2	++		++			+	+++++	Intermedia	Intermedia	1
<i>cagA</i> ++; <i>vacA</i> s2/m2	++			-		+	+++	Baja	Baja	1
Colonización mixta										
<i>cagA</i> -; <i>vacA</i> s1/m1		-	++		++		++++	Intermedia	Intermedia	1
<i>cagA</i> -; <i>vacA</i> s1/m2		-	++			+	+++	Baja		
<i>cagA</i> ++; <i>vacA</i> s?/m1	++				++		++++	Intermedia	Intermedia	2
<i>cagA</i> ++; <i>vacA</i> s?/m2	++					+	+++	Baja		
<i>cagA</i> ++; <i>vacA</i> s1/m1	++		++		++		++++++	Alta	Alta	29
<i>cagA</i> -; <i>vacA</i> s1/m1		-	++		++		++++	Intermedia		
<i>cagA</i> ++; <i>vacA</i> s2/m1	++			-	++		++++	Intermedia	Intermedia	2
<i>cagA</i> -; <i>vacA</i> s2/m1		-		-	++		++	Baja		
<i>cagA</i> ++; <i>vacA</i> s1/m2	++		++			+	+++++	Intermedia	Intermedia	6
<i>cagA</i> -; <i>vacA</i> s1/m2		-	++			+	+++	Baja		
<i>cagA</i> ++; <i>vacA</i> s2/m2	++			-		+	+++	Baja	Baja	17
<i>cagA</i> -; <i>vacA</i> s2/m2		-		-		+	+	Baja		

? Región *vacA* s indeterminada, + actividad celular (1+ a 3+ Baja; 4+ a 5+ Intermedia; 6+ Alta)

n: número de individuos

ANEXO 7. Parámetros hemáticos, estado del hierro, inflamación e infección parasitaria en una subpoblación de individuos LTBI con y sin coinfección por *H. pylori* (n= 30).

Característica	* <i>H. pylori</i> + (n= 16, 53 %)		§ <i>H. pylori</i> - (n= 14, 47 %)		<i>p</i>	Referencia
	Media	DS	Media	DS		
Valores sanguíneos (10³x mm³)						
Recuento de blancos	6.44	0.81	7.35	2.21	0.318*	4.3-11
Neutrófilos	3.22	0.60	4.61	1.80	0.013*	2.3-8.5
Linfocitos	2.34	0.42	2.21	0.41	0.346*	0.9-4.5
Monocitos	0.59	0.42	0.36	0.13	0.062*	0.2-0.7
Eosinófilos	0.23	0.25	0.11	0.20	0.076*	0.04-0.5
Plaquetas	253.7	41.9	274.4	52.6	0.241	150-450
Basófilos	0.09	0.00	0.06	0.06	0.177*	0-0.1
Recuento de rojos (10 ⁶ x mm ³)	4.81	0.40	4.97	0.52	0.337	4.5-6.0
Hemoglobina (g/dl)	14.0	1.46	14.2	1.90	0.745	12.5-17
VCM (f/L)	91.8	4.83	88.7	7.49	0.228*	80-94
HCM (pg/célula)	29.0	1.17	28.3	2.39	0.277	28-33
Transferrina (mg/dL)	226.4	42.3	258.2	54.4	0.082	206-381
Hierro sérico (µg/dL)	106.9	49.3	95.0	45.4	0.500	37-181
Ferritina (ng/mL)	133.5	90.9	111.6	123.7	0.318*	15-200
TNF-α sérico (pg/mL)	10.9	5.8	9.8	3.0	0.918*	0-8.1
IgE (IU/mL)	143.5	301.1	115.6	240.6	0.861*	10-179
Infecciones parasitarias	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%		
Protozoarios	8	50.0	6	42.8	0.696	
<i>Blastocystis hominis</i>	3	18.8	3	21.4	0.855	
<i>Endolimax nana</i>	0	0.0	2	14.3	---	
<i>Entamoeba histolytica</i>	3	18.8	0	0.0	---	
<i>Entamoeba coli</i>	2	12.5	2	14.3	0.886	

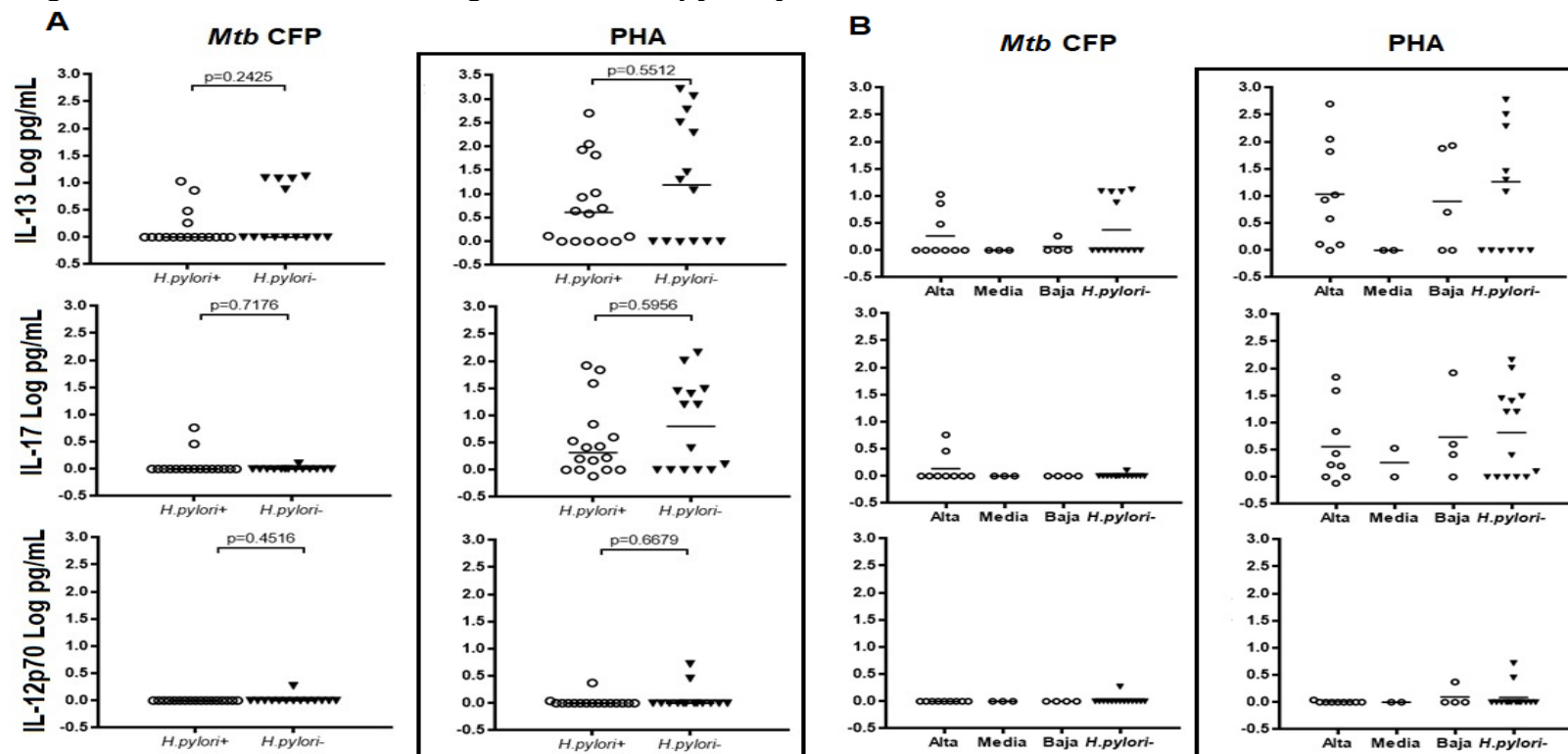
*En 1 individuo *H. pylori* + no se obtuvo muestra sanguínea para análisis

§1 individuo *H. pylori* - presentó infección mixta por *B. hominis* y *E. nana*

VCM: Volumen corpuscular medio, HCM: Hemoglobina corpuscular media

*valor *p* obtenido mediante una prueba *U* de Mann Whitney.

ANEXO 8. Niveles de producción de IL-13, IL-17 e IL-12p70 en sobrenadantes de PBMCs estimulados con antígenos de *M. tuberculosis* según estado *H. pylori* y virulencia



Respuesta de las citocinas IL-13, IL17 e IL12-p70 frente antígenos de *M. tuberculosis* en sobrenadantes de PBMCs de individuos con tuberculosis latente. **A.** según su estado para *H. pylori*, y **B.** según la virulencia de *H. pylori*, mediante un ensayo múltiple en LUMINEX®MAP, en participantes *H. pylori*-positivo (n= 17) y *H. pylori*-negativo (n= 14), y participantes con genotipos de alta (n= 9), intermedia (n= 3), y baja (n= 4) virulencia. Los valores fueron transformados por logaritmo natural para los análisis. Cada punto representa la concentración observada después de la estimulación menos la concentración observada en el sobrenadante sin estímulo. Las barras horizontales representan la media. Los valores *p* fueron obtenidos mediante una prueba U de Mann-Whitney o una prueba post-hoc de Dunn.

ANEXO 9. Análisis de componentes principales basado en la respuesta inmune frente antígenos micobacterianos en individuos LTBI y su relación con el genotipo bacteriano y número de repeticiones EPIYA presentes en las cepas de *H. pylori* coinfectantes

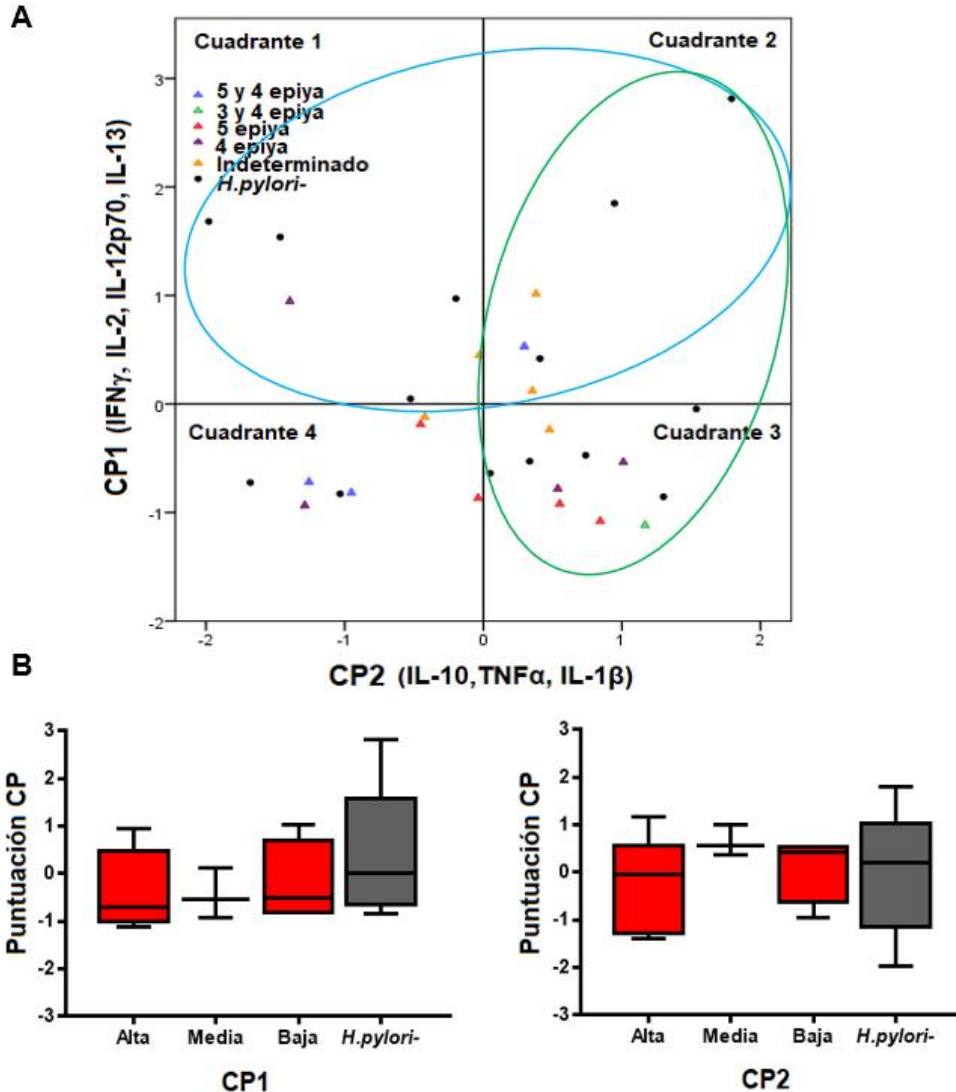


Diagrama de dispersión para los dos primeros componentes principales, ilustrando la distribución de los puntajes para 31 individuos LTBI con y sin coinfección por *H. pylori*. **A.** Diagrama de dispersión según el número de repeticiones EPIYA presentes en cepas de *H. pylori*. Triángulo violeta: 5 a 4 repeticiones; Triángulo verde: 3 a 4 repeticiones; Triángulos rojo: 5 repeticiones; Triángulo violeta: 4 repeticiones, Triángulo amarillo: repeticiones indeterminadas, y Punto negro: *H. pylori*-negativo. Las líneas de referencia denotan cuadrantes centrados en 0. **B.** Comparación del puntaje promedio de los componentes estandarizados para el tipo de virulencia bacteriana. Diferencias evaluadas mediante una prueba múltiple de Dunnnett empleando como grupo de referencia los individuos sin coinfección por *H. pylori*, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$). El círculo en azul, denota los individuos que presentaron un puntaje elevado en el eje IFN- γ mixto. El círculo en verde, denota los individuos que presentaron un puntaje elevado en el eje IL-10 mixto. CP1, componente principal 1; CP2, componente principal 2.

ANEXO 10. Constancia de divulgación en simposio institucional

Facultad de Salud



**EL SUSCRITO VICEDECANO DE INVESTIGACIONES DE LA
FACULTAD DE SALUD DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE**

HACE CONSTAR:

Que la presentación oral titulada **“PREVALENCIA Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A Tb-LATENTE EN CALI-COLOMBIA”** se presentó en el marco del XIX Simposio de Investigaciones en Salud, Octubre 24 a 26 de 2017.

Los autores de la Investigación en mención son: Javier Andrés Bustamante-Rengifo, Miryam Astudillo, Luz Ángela González, Nicole Osorio, María del Pilar Crespo, Yesica Bejarano, José Rafael Tovar

Esta constancia se hace por solicitud de los investigadores y se firma a los veinticinco días (25) del mes de Abril del 2019

WILMAR SALDARRIAGA GIL

Vicedecano de investigaciones y posgrados
Facultad de salud

ANEXO 11. Constancia de divulgación en congreso nacional



ANEXO 12. Constancia de divulgación en simposio internacional



Kansas City, KS October, 2018

Certificate of Participation

The JUNTOS Center for Advancing Latino Health acknowledges that the poster titled:

Effects of *Helicobacter pylori* infection on the specific immune response to *Mycobacterium tuberculosis* in individuals with latent tuberculosis infection

Of the authors: Javier A Bustamante-Rengifo, BSc, MSc¹⁻⁵; Luz A Gonzalez, BSc²; Nicole Osorio, BSc²; Maria V Diaz³; Luz F Sua, MD, PhD⁴; Jose R Tovar, PhD³; Miryam Astudillo, MSc¹; Maria Del Pilar Crespo, MSc, PhD¹. ¹Department of Microbiology, Universidad del Valle. ²Department of Biology, Universidad del Valle. ³Statistics, Universidad del Valle. ⁴Department of Pathology, Fundación Valle de Lili. ⁵Visiting scholar. Biostatistics. University of Kansas Medical Center.

Was presented during the “Research Day Conference” within the framework of the Hispanic and Latin Heritage Month, on October 9, 2018, at the University of Kansas Medical Center, Kansas City, KS, United States.

Mariana Ramirez, LMSW
Director
Juntos Center for Advancing Latino Health
Department of Preventive Medicine and Public Health
University of Kansas Medical Center

ANEXO 13. Constancia de divulgación en congreso internacional



Se otorga el presente certificado a:

Javier Bustamante-Rengifo (autor), Luz Gonzalez, Nicole Osorio, Maria Diaz, Luz Sua, Jose Tovar, Miryam Astudillo, Maria Del Pilar Crespo

Por haber participado como expositor en el XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología 2018
realizado del 13 al 16 de Noviembre de 2018, Santiago, Chile.

Presentando el trabajo titulado:

***Efecto de la coinfección por Helicobacter pylori sobre la respuesta inmune
específica a Mycobacterium tuberculosis en individuos con infección
tuberculosa latente***

Dra. Claudia Saavedra
Presidenta
Comité Organizador ALAM 2018

Dr. Renato Chavez
Comité Organizador
ALAM 2018

ANEXO 14. Artículo de revisión sometido en revista internacional

JOURNAL OF
MEDICAL MICROBIOLOGY

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

em
Editorial
Manager

Role: Author Username: jbustamante rengifo

Revisions Being Processed for Author Javier Andres Bustamante-Rengifo, MSc

Page: 1 of 1 (1 total revisions being processed) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Date Submission Began	Status Date	Current Status
View Submission Author Status Correspondence Send E-mail	JMM-D-18-00919R1	Effect of Helicobacter pylori and helminth coinfection on the immune response to Mycobacterium tuberculosis	03/06/2019	03/06/2019	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total revisions being processed) Display 10 results per page.

ANEXO 15. Artículo original sometido en revista internacional

Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention

SmartSubmit Manuscript Submission Service

AACR
American Association
for Cancer Research

[Manuscript Home](#) [Author Instructions](#) [Reviewer Instructions](#) [Contact](#) [Journal home](#) [Change Journal](#) [Logout](#)

Manuscript #	EPI-19-0627
Current Revision #	0
Submission Date	2019-05-30 20:26:57
Title	Evaluation of DNA and RNA Extraction Methods to Profile H. Pylori and Other Bacteria in Formalin-fixed Paraffin-embedded Gastric Biopsies
Running Title	Microbiota and H. pylori assays in FFPE gastric tissues
Manuscript Type	Research Article
Special Section	N/A
Category	Genetic and Molecular Epidemiology
Corresponding Author	Dr. Guoqin Yu (University of Kansas Medical Center)
Contributing Authors	Dr. Javier A. Bustamante-Rengifo , Mr. Bo Zhang , Dr. Javier Torres , Dr. Jacques Ravel
	Background:Extraction of DNA/RNA from FFPE stomach tissues samples for microbiota or certain bacteria assay can be technically challenging and may introduce biases. Methods:In this study, eight methods including five for DNA extraction (GeneJET FFPE DNA purification kit (M1), NucleoSpin® DNA FFPE XS (M2), Quick-DNA™ FFPE Miniprep (M3), QIAamp® DNA FFPE Tissue kit (M4), phenol-chloroform method (M5) and three for both DNA and RNA extraction (AllPrep® DNA/RNA FFPE kit (M6), TRIzol™ reagent (M7), MagMAX™ FFPE DNA/RNA Ultra kit (M8) were evaluated. The DNA/RNA yield and purity were estimated using spectrophotometry. The assay of microbiota was estimated by sequencing the 16S rRNA gene V4 or V3-V4 region. The H. pylori assay was estimated by amplifying an H. pylori housekeeping gene region.