

Inmunidad celular en pacientes anérgicos con tuberculosis pulmonar^{1,2}

David N. McMurray³ y Alvaro Echeverri-Perca⁴

EXTRACTO

Doce enfermos con tuberculosis pulmonar confirmada que repetidamente tuvieron reacciones negativas a pruebas cutáneas con 250 UI de proteína pura derivada (PPD) de tuberculina, se estudiaron utilizando pruebas de inmunidad celular *in vivo* e *in vitro*. Únicamente 2 pacientes respondieron a las pruebas cutáneas con candidina e histoplasmina y solo uno se pudo sensibilizar con aplicaciones tópicas de dimitroclobenceno (DNCB). En estos individuos anérgicos la respuesta blastogénica de los linfocitos de sangre periférica, al cultivarlos con fito-hemaglutinina, mitógeno de hierba carmín (pokeweed) y PPD, fue significativamente menor que la de los linfocitos de los pacientes controles con reacciones positivas a la tuberculina.

Durante el tratamiento con isoniazida y estreptomina, 6 de los sujetos anérgicos, cambiaron espontáneamente y se hicieron positivos a la PPD. Esta conversión se acompañó de un aumento en la respuesta blastogénica de los linfocitos al cultivarlos con PPD. La anergia a la tuberculina en estos 12 pacientes no se asoció con enfermedad progresiva y diseminada. Todos los casos respondieron exitosamente al régimen quimioterapéutico primario.

INTRODUCCION

La anergia se define como la ausencia de reacción o la reacción negativa a las pruebas cutáneas con antígenos a los cuales el paciente debe ser hipersensible. Una infección activa con tuberculosis por regla general induce una reacción de hipersensibilidad fuerte a los antígenos de micobacterias. Sin embargo, en la literatura hay varios informes de sujetos con tuberculosis activa que no respondieron a las pruebas cutáneas con PPD de tuberculi-

na¹⁻³. Son pocas las investigaciones que hayan tratado de evaluar el paciente tuberculoso en una forma integral^{4,5} y muchos de los enfermos estudiados anteriormente sufrían de tuberculosis miliar^{5,6}.

Los mecanismos celulares involucrados en la producción de una prueba cutánea positiva retardada de hipersensibilidad son bastante complejos. Hay varias etapas en la secuencia de los eventos que tienen lugar después de la inyección intradérmica de PPD y en las que una falla en la función biológica normal podría originar una reacción negativa. Estas etapas incluyen el reconocimiento del antígeno en la circulación por los linfocitos inmunológicamente comprometidos, la transformación blastogénica de estos linfocitos, la producción de factores biológicamente activos, o linfokinas, y los procesos inflamatorios no específicos. Para definir la especificidad y naturaleza de la anergia se pueden llevar a cabo varias pruebas *in vivo* e *in vitro*. Las pruebas cutáneas intradérmicas con otros antígenos comunes como la candidina y la histoplasmina se pueden utilizar para determinar la especificidad de la falta de reacción. Una sensibilización cutánea

1. Auspiciado en parte por el Centro Internacional de Investigaciones Médicas, Universidad de Tulane-COLCIENCIAS, Subvención AI-10050 del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas, Institutos Nacionales de la Salud, Servicio de Salud Pública de los EE. UU.
2. Este artículo fue publicado por los mismos autores con el título "Cell-mediated immunity in anergic patients with pulmonary tuberculosis" en *Amer Rev Resp Dis* 118: 827-834 (1978). El Dr. J. F. Murray y Ms. M. Thornton, editores de *American Review of Respiratory Disease* otorgaron gentilmente permiso a la Sra Martha de McMurray para traducirlo al castellano y publicarlo nuevamente en *Acta Médica del Valle*.
3. Dirección actual: Department of Medical Microbiology and Immunology, Texas A & M College of Medicine, College Station, Tex. 77843.
4. Fallecido. Ex-Secretario Municipal de Salud Pública de Cali, Colombia y ex-Director del Hospital Mario Correa-Renjifo.

por contacto con un irritante químico como el dinitroclorobenceno (DNCB) puede determinar la presencia de una respuesta inflamatoria intacta y la habilidad del paciente anérgico para procesar un antígeno nuevo. La transformación blastogénica de los linfocitos de la sangre periférica se ha aceptado como una prueba correlativa de la hipersensibilidad retardada *in vitro*⁸. La respuesta de los linfocitos a los mitógenos y a los antígenos *in vitro* se puede cuantificar para determinar el número y la actividad de las células circulantes que pueden participar en una reacción cutánea de hipersensibilidad retardada.

Se ha demostrado que varias otras condiciones, fuera de la tuberculosis, tienen influencia sobre la reacción de hipersensibilidad retardada a la PPD. Entre estas están el tipo de PPD y el método de aplicación⁹; la desnutrición¹⁰; la presencia de otras enfermedades en el sujeto¹¹⁻¹⁵; el uso de esteroides o drogas citotóxicas; embarazo¹⁶; y la edad avanzada¹⁷.

Las funciones inmunológicas celulares y los factores asociados en el huésped se estudiaron en un grupo de adultos colombianos con tuberculosis pulmonar activa que respondían negativamente a pruebas cutáneas repetidas con dosis altas de PPD. Estos pacientes anérgicos se compararon con controles que también sufrían de tuberculosis activa, pero cuya respuesta a la PPD era normal.

MATERIAL Y METODOS

Pacientes. Los participantes en este estudio fueron escogidos desde Septiembre de 1974 hasta Septiembre de 1975, de un grupo de 117 pacientes en el Hospital Mario Correa Renjifo en Cali, Colombia. A cada uno de los enfermos se le pidió su consentimiento antes de comenzar los procedimientos experimentales. Sólo se aceptaron en el estudio pacientes con tuberculosis pulmonar activa confirmada por exámenes broncoscópico y radiológico y por la presencia de bacilos ácido-resistentes en repetidas muestras de esputo. Todo diagnóstico dudoso se confirmó siempre con un cultivo de esputo positivo para *Mycobacterium tuberculosis*. Todos los pacientes recibieron estreptomycin (1 g) e isoniazida (800 mg) dos veces por semana. Además, 3 de ellos también se trataron con rifampin. El estado clínico de cada enfermo se evaluó frecuentemente durante el estudio haciendo extendidos de esputo, exámenes radiológicos y determinando su estado físico general como criterio para las observaciones.

Los participantes en el estudio fueron hombres y mujeres, todos adultos, con un promedio de 35 años de edad. El más joven tenía 16 años y el mayor 56 años. Todos provenían del mismo nivel socio-económico bajo. Ninguno de los pacientes había sido vacunado antes con bacilo de Calmette-Guerin (BCG). La historia clínica completa reveló que ninguno había recibido terapia inmunosupresiva (esteroides, drogas citotóxicas, o radiación) y ninguno había tenido cáncer, sarcoidosis o sarampión recientemente. Ninguna de las mujeres había estado en embarazo durante los 12 meses anteriores al estudio. El grupo de estudio consistió de 12 personas que siempre reacciona-

ban negativamente a la PPD (pacientes anérgicos) y de 11 positivas a la PPD (grupo control) que se seleccionaron por sexo y edad para compararlos con los enfermos anérgicos.

Pruebas cutáneas con tuberculina. Para las pruebas intradérmicas se inyectó PPD en la superficie volar del brazo. Se utilizó una solución Tween (R)-estabilizada de PPD (Parke-Davis, Detroit, Mich.) con 5 UT o 250 UT en cada 0.1 ml. La PPD se almacenó a 4° C y se puso en la jeringa inmediatamente antes de inyectarla.

A todos los pacientes se les aplicaron pruebas con 5 UT. El tamaño de la reacción en mm fue el diámetro promedio de la induración al cabo de 72 horas. Todo individuo con una respuesta negativa (<5 mm) a 5 UT recibió una segunda dosis de PPD de 250 UT. Los pacientes con reacciones negativas repetidas a las pruebas con PPD de 250 UT, se consideraron como anérgicos. Las pruebas intradérmicas con PPD se repitieron cada 4 a 6 semanas en todos los participantes en el estudio.

Pruebas cutáneas con otros antígenos. Tanto los pacientes tuberculosos positivos como los anérgicos recibieron pruebas cutáneas con candidina (Dermatofitina "0" -1:100, Hollister-Stier, Spokane, Wash.), histoplasmina (Parke-Davis, Detroit, Mich) y el antígeno cutáneo DNCB en intervalos de 4 a 6 semanas. De candidina e histoplasmina se inyectaron intradérmicamente 0.1 ml en la superficie volar del brazo y el diámetro promedio de la induración se midió a las 72 horas. La dosis sensibilizante de DNCB se aplicó a la superficie de la piel como una solución con 2.000 µg de DNCB en 0.1 ml de acetona. El sitio de la aplicación se examinó a las 24 horas para determinar su eritema, induración y edema. La segunda dosis, aplicada 2 semanas después, y luego cada 4 a 6 semanas, consistió de 50 µg de DNCB en 0.1 ml de acetona. Se consideró una respuesta como positiva cuando hubo induración a las 72 horas de la aplicación de la segunda dosis.

Inmunoglobulinas y composición bioquímica del suero. De cada paciente se tomó una muestra inicial de sangre venosa y luego una muestra cada 4 a 6 semanas durante el curso del estudio. Las muestras se almacenaron a -20° C. Las concentraciones de las proteínas séricas totales y de la albúmina se hicieron en el Hospital Universitario del Valle utilizando procedimientos clínicos estándar. El hierro sérico y la capacidad de captación de hierro total se determinaron utilizando el equipo para pruebas Ferro-check II (R) (Hyland-Travenol, Costa Mesa, Calif.). Las concentraciones de inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgM, e IgD), complemento C₃ y transferrina, se cuantificaron utilizando antisueros monoespecíficos y estándares obtenidos de los Laboratorios Meloy (Springfield, Va). Se utilizó la prueba de inmunodifusión radial simple en agar¹⁸.

Blastogénesis de linfocitos en sangre periférica. La sangre venosa total se mezcló con heparina sin preservativos

(Nutritional Biochemicals, Cleveland, Ohio). La prueba de transformación de linfocitos se hizo *in vitro* utilizando una versión modificada de la técnica de cultivo con sangre total de Han y Pauly¹⁹. En resumen, se mezcló 0.1 ml de sangre entera heparinizada con 3 ml de medio de tejido 199 (Difco Labs, Detroit, Mich.) y se suplementó con 10% de suero de ternero fetal en tubos estériles de polistireno de 12 por 75 mm, con tapas a presión (Falcon Plastics, Oxnard, Calif.). Se agregó fitohemaglutinina, mitógeno de hierba carmín (pokeweed), o PPD a tubos duplicados en concentraciones apropiadas, y los tubos, bien tapados, se incubaron en aire a 37° C durante 4 días. Se agregó luego timidina marcada con tritium (³H-TdR, New England Nuclear, Boston, Mass.) a una concentración de 0.8 μ Ci por ml en cada tubo, y los cultivos se homogeneizaron cuidadosamente y se incubaron durante 24 horas adicionales a 37° C. El ácido deoxirribonucleico radiomarcado se aisló utilizando la técnica descrita por Junge, et al.²⁰. Después de lavar con metanol el residuo seco se disolvió en 1 ml de hidróxido de hiamina (New England Nuclear), se mezcló con 15 ml de flúor de centelleo líquido en tolueno (Omnifluor®), New England Nuclear), y se contó durante 2 minutos con un contador de centelleo líquido Nuclear Chicago. Todos los conteos fueron corregidos para eliminar trasfondo y ahogo. Con base en el número verdadero de linfocitos en la sangre del paciente, los conteos se expresaron como 10⁶ linfocitos cultivados. Se calculó el índice de transformación de linfocitos como la relación del conteo por minuto (cpm) en el cultivo estimulado, con respecto al cpm en el cultivo control.

Anticuerpos para antígenos micobacterianos. Se buscaron anticuerpos precipitantes contra PPD en el suero de todos los pacientes, tanto anérgicos como controles, utilizando una prueba de microinmunodifusión en gel de agar. Las láminas para microscopio se cubrieron con una capa delgada de agarosa al 1% en barbital tamponado. Se cortaron 6 orificios de 3 mm alrededor de un orificio central y se retiraron los tapones de agarosa. El suero del paciente se colocó en el centro rodeado por diluciones de PPD que contenían 200, 100, 50, ó 25 μ g por ml. La PPD utilizada en esta prueba fue una preparación liofilizada que suministró la División de Medicina Geográfica de los Institutos Nacionales de Salud (E.E.UU.). Las láminas se incubaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 72 horas y luego se examinaron en busca de bandas de precipitina. Siempre se incluyó una muestra de suero control de un paciente con tuberculosis activa.

RESULTADOS

Incidencia de anergia a la tuberculina. Se hicieron pruebas con 5 UT de PPD en un total de 117 pacientes con tuberculosis pulmonar activa. En 23 (19.7%) pacientes hubo reacciones inferiores a 5 mm. Cuando se aplicaron 250 UT de PPD a estos 23 pacientes, 11 respondieron positivamente. Por tanto, la incidencia de anergia tuberculínica en esta población fue aproximadamente 10%.

El grupo de anérgicos consistió de 6 hombres y 6 mujeres de 17 a 55 años de edad (promedio 35.5 años). El grupo control de la misma edad y sexo de los pacientes anérgicos, consistió de 6 mujeres y 5 hombres de 16 a 56 años de edad (promedio 34.7 años). Se observó una mejoría clínica significativa en todos los pacientes durante el estudio, y 19 de los 23 completaron con éxito su tratamiento durante el curso de la investigación.

Estudios bioquímicos en el suero. En ambos grupos de enfermos, las concentraciones de proteínas totales y albúminas en el suero fueron algo inferiores a lo esperado en adultos normales. Las concentraciones de albúminas en el suero tuvieron una disminución aproximada de 15% en los sujetos anérgicos (2.85 \pm 0.23 por 100 ml), pero la diferencia entre los pacientes anérgicos y los controles no fue significativa.

Las concentraciones de transferrina, de hierro sérico, y la capacidad de fijación del hierro no saturado, fueron similares en ambos grupos y estuvieron dentro de rangos normales.

Factores inmunológicos humorales. Las concentraciones de 4 inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgM e IgD) y del complemento C₃ de los pacientes con reacciones positivas y negativas a la PPD aparecen en el Cuadro 1. También se incluyen las concentraciones de inmunoglobulinas en un grupo de adultos normales de una población similar en Cali²¹. En la mayoría de los pacientes las concentraciones de las 4 inmunoglobulinas estuvieron sobre los niveles normales; tanto la IgA ($p < 0.02$) como la IgG ($p < 0.05$) tenían concentraciones significativamente mayores en el grupo anérgico. Las concentraciones de complemento C₃ fueron casi idénticas en ambos grupos de pacientes. Las concentraciones de inmunoglobulinas tendieron a descender en la mayoría de los enfermos a medida que progresó su tratamiento. La prueba de inmunodifusión no reveló anticuerpos precipitantes para la PPD en los sueros de los pacientes durante el curso del estudio.

Reacciones de hipersensibilidad retardada a la PPD y otros antígenos. Los resultados de las pruebas intradérmicas con PPD, candidina e histoplasmina y la sensibilización cutánea con DNCB aparecen en el Cuadro 2. Estos resultados se obtuvieron al comienzo del estudio. Obviamente los enfermos anérgicos se seleccionaron por su falta de reacción a la tuberculina de segundo refuerzo. Las reacciones de los pacientes controles a las dosis de 5 UT y de 250 UT fueron más o menos uniformes, con un diámetro promedio de 9.8mm para 5 UT y 16.6 mm para 250 UT. La respuesta a los otros antígenos intradérmicos disminuyó de manera notoria en los pacientes anérgicos. Sólo 2 de ellos fueron positivos (>5mm) a la candidina y a la histoplasmina. La diferencia en la reacción a la candidina, entre los pacientes positivos y negativos a la PPD, fue significativa ($p < 0.05$). Sólo uno de los tuberculosos anérgicos pudo ser sensibilizado con DNCB, mientras que 10 de los 11 controles tuvieron

Cuadro 1. Factores Humorales Inmunológicos en Pacientes Tuberculosos con Reacciones Positivas y Negativas a la PPD

Variable	Pacientes PPD positivos (n = 11)		Pacientes PPD negativos (n = 12)		Valor P	Adultos colombianos normales (n = 65)	
Inmunoglobulina sérica, mg/100 ml							
IgA	243 ±	33	336 ±	32	< 0.02	201 ±	58
IgG	1581 ±	123	2102 ±	196	< 0.05	1081 ±	206
IgM	177 ±	77	207 ±	28	NS*	136 ±	48
IgD	5.4 ±	1.2	11.8 ±	3.3	NS	5.7 ±	4.2
Complemento C ₃ , mg/100 ml	117 ±	10	118 ±	11	NS	123 ±	13

Los datos aparecen como el error estándar (ES) promedio ±.

* Diferencia no significativa.

Cuadro 2. Reacciones a las Pruebas Intradérmicas y Sensibilización con DNCB en Pacientes Tuberculosos con Reacciones Positivas y Negativas a la PPD.

Antígeno cutáneo	PPD positivos (n = 11)		PPD negativos (n = 12)		Valor P
	Promedio ± ES Diámetro de la reacción (mm)	Número positivos	Promedio ± ES Diámetro de la reacción (mm)	Número positivos	
PPD (5 UT)	9.8 ± 1.0	11	0.0 ± 0.0	0	—
PPD (250 UT)	16.6 ± 1.6	11	0.8 ± 0.3	3	—
Candidina	9.6 ± 1.5	10	3.3 ± 2.3	6	< 0.05
Histoplasmina	5.8 ± 1.6	8	1.6 ± 0.5	5	NS*
DNCB, %o positivos	90.9		8.3		<0.001

* Diferencia no significativa.

ron reacciones positivas fuertes de hipersensibilidad retardada después de aplicarles la segunda dosis. Tanto los pacientes anérgicos como los controles tuvieron inflamaciones notorias indicadas por eritema y edema, 24 horas después de la aplicación de 2,000 µg de DNCB.

A todos los participantes del estudio se les aplicó la PPD en intervalos de 4 a 6 semanas mientras duró la investigación. Las reacciones de los controles se mantuvieron uniformemente positivas. Durante el estudio, 6 de los enfermos anérgicos se convirtieron espontáneamente y se hicieron positivos a la PPD. El intervalo entre el co-

mienzo de la quimioterapia y la conversión de la reacción a la PPD tuvo una variación de 8 a 24 semanas en estos 6 casos. No se observaron diferencias en el estado clínico (fiebre, tos, radiografía pulmonar, peso corporal, examen broncoscópico), entre los pacientes que se volvieron positivos y la PPD y los que se mantuvieron negativos hasta la terminación del estudio.

Transformación de linfocitos in vitro. Los resultados de la transformación blastogénica de los leucocitos periféricos sanguíneos de los pacientes tuberculosos con reacciones positivas y negativas a la PPD, se comparan en el

Cuadro 3. Blastogénesis Linfocítica in vitro* en Leucocitos de Sangre Periférica de Pacientes Tuberculosos con Reacciones Positivas y Negativas a la PPD.

Cultivos estimulados con	PPD positivos (n=11)	PPD negativos (n=12)	Valor P
Fitohemaglutinina	136 ± 8 ⁺	63 ± 10	< 0.001
Mitógeno de hierba carmín (pokeweed)	9.5 ± 0.7	6.4 ± 1.6	< 0.05
PPD	8.8 ± 0.6	4.1 ± 0.8	< 0.001

* Índice de transformación de linfocitos = $\frac{\text{cpm de } ^3\text{H en cultivo estimulado}}{\text{cpm de } ^3\text{H en cultivo control}}$

+ Los datos aparecen como error estándar promedio ±.

Cuadro 4. Cambios en la Transformación de Linfocitos* en Pacientes Anérgicos que Espontáneamente se Convirtieron a Positivos a la PPD y los que Continuaron Negativos.

Agente estimulante	Convertidos (n=6)			Negativos (n=6)		
	Inicial	Final	Valor P	Inicial	Final	Valor P
Fitohemaglutinina	54 ± 15 ⁺	102 ± 23	< 0.05	77 ± 19	143 ± 19	< 0.05
Mitógeno de hierba carmín	7.2 ± 1.9	5.7 ± 2.1	NS**	5.5 ± 3.1	6.8 ± 1.6	NS
PPD	3.9 ± 1.4	9.1 ± 2.6	< 0.05	4.4 ± 0.8	6.2 ± 0.8	NS

* Índice de transformación de linfocitos = $\frac{\text{cpm de } ^3\text{H en cultivo estimulado}}{\text{cpm de } ^3\text{H en cultivo control}}$

+ Los datos aparecen como error estándar promedio ±.

** Diferencia no significativa.

Cuadro 3. Los cultivos se estimularon con fitohemaglutinina, mitógeno de hierba carmín o PPD. Se observaron diferencias significativas entre los pacientes positivos y los negativos a la PPD con respecto a los 3 agentes estimulantes. Los linfocitos de los pacientes anérgicos respondieron con menos de la mitad de la actividad blastogénica de los linfocitos normales al estimularlos con fitohemaglutinina y PPD ($p < 0.001$), y una actividad significativamente reducida ($p < 0.05$) al cultivarlos con mitógeno de hierba carmín.

Se compararon las reacciones in vitro a la fitohemaglutinina, al mitógeno de hierba carmín, y a la PPD de los pacientes que se hicieron positivos a la PPD, con las de los pacientes que se mantuvieron negativos durante el estudio. Estos resultados se presentan en el Cuadro 4. En ambos grupos se observaron aumentos significativos en la respuesta blastogénica a la fitohemaglutinina. La respuesta al mitógeno de hierba carmín se mantuvo constante en todos los pacientes durante el estudio. Es de interés anotar que sólo los linfocitos de quienes se convir-

tieron espontáneamente en positivos a la PPD respondieron con blastogénesis *in vitro* significativamente aumentada en la presencia de PPD, mientras que el aumento en los que no se convirtieron no fue significativo.

DISCUSION

En la mayoría de las personas, la infección con *M. tuberculosis* estimula una reacción inmunológica celular específica contra los antígenos micobacterianos. La presencia de este estado inmunológico se puede demostrar con la fuerte hipersensibilidad retardada que resulta al inyectar intradérmicamente un antígeno apropiado, como la PPD. La prueba cutánea de tuberculina ha sido bien aceptada como un importante elemento diagnóstico y en algunos países se utiliza casi exclusivamente para descubrir infecciones recientes de las poblaciones en riesgo. Sin embargo, el peligro de confiar demasiado en la prueba de tuberculina se ha ilustrado en un número de estudios clínicos en los que un porcentaje variable de pacientes con tuberculosis activa no respondió a las pruebas con PPD¹⁻⁴. En nuestra población, casi 20% de los pacientes fueron negativos a la PPD intradérmica con 5 UT. Estos resultados son similares a los de Holden et al.² que hicieron intradérmico-reacciones en 115 pacientes tuberculosos con 5 UT de PPD Tween®-estabilizada, 17% de los cuales respondieron negativamente². Sin embargo, en el presente trabajo la incidencia de anergia después de las pruebas con PPD de segundo refuerzo (10%), fue considerablemente mayor que en la mayoría de las poblaciones anteriormente estudiadas. Kent y Schwartz¹ llevaron a cabo una encuesta retrospectiva, del personal naval con tuberculosis pulmonar activa y concluyeron que sólo 0.32% respondió negativamente a las pruebas con 250 UT de PPD. Zeitz et al.⁴ informaron en pacientes con tuberculosis activa una incidencia de 1.34% que no respondieron a la tuberculina de segundo refuerzo.

En los sujetos de este estudio, no parece haber relación alguna entre el estado clínico y la anergia a la tuberculina. Todos los pacientes anérgicos respondieron bien al régimen quimioterapéutico estándar de estreptomina e isoniazida 2 veces por semana. Debe anotarse que los 3 enfermos que recibieron rifampin fueron del grupo de anérgicos. Se ha demostrado que el rifampin es inmunosupresivo, aunque ciertas evidencias recientes sugieren que no afecta la reactividad cutánea a la PPD²². La falta de reacción a las pruebas con PPD no tuvo relación alguna con un pronóstico pobre en estos casos de Cali, al contrario de los pacientes con tuberculosis diseminada^{5,6}. La anergia no se redujo únicamente a los antígenos micobacterianos, pues estos enfermos también respondieron negativamente a la candidina y a la histoplasmina, y sólo uno se pudo sensibilizar con DNCB (Cuadro 2). La anergia generalizada en ellos fue similar a los resultados de otros informes^{4,5}.

La falta de reacción a las pruebas cutáneas en nuestros pacientes tuberculosos anérgicos parece estar relacionada con una disminución en la actividad blastogénica de los linfocitos T, derivados del timo en la sangre periférica.

Se observaron disminuciones significativas en las respuestas de los linfocitos a la fitohemaglutinina, al mitógeno de hierba carmín y a la PPD *in vitro* de los pacientes anérgicos (Cuadro 3). Es de interés anotar que aunque la respuesta *in vitro* a la fitohemaglutinina mejoró de modo significativo, durante el estudio, en todos los enfermos anérgicos, tan solo quienes se convirtieron espontáneamente a positivos tuvieron un aumento significativo en la respuesta de sus linfocitos a la PPD (Cuadro 4). Por tanto, la conversión a pruebas cutáneas positivas con tuberculina se relacionó con la aparición en la sangre periférica de un número aumentado de linfocitos que reaccionaron a la PPD. Rook et al.²³ han demostrado que la retención específica de los linfocitos reactivos a la PPD puede ocurrir en los ganglios linfáticos de los enfermos tuberculosos anérgicos, retirando así estos linfocitos de la circulación y disminuyendo las respuestas a la PPD tanto *in vivo* como *in vitro*. Los datos de esta investigación fueron consistentes con esa hipótesis, aunque en estos enfermos no se examinó la reactividad de las células de los ganglios linfáticos.

Zeitz et al.⁴ también informaron una blastogénesis reducida de los linfocitos *in vitro* a la fitohemaglutinina y la PPD, con una mejoría significativa en ambos parámetros después de un tratamiento satisfactorio. Thestrup-Pedersen²⁴ observó una supresión temporal en la transformación de los linfocitos por la fitohemaglutinina en los sujetos positivos a la PPD durante la semana que siguió a una prueba cutánea con PPD. En el presente estudio, sin embargo, las muestras de sangre siempre se tomaron antes de aplicar las pruebas cutáneas y luego, 4 a 6 semanas después de ellas. Por otra parte, Kvetny²⁵ encontró un aumento en el número de linfocitos T por el método de roseta en pacientes con tuberculosis severa, no tratada, que tenían reacciones positivas a la PPD. Desafortunadamente, las capacidades funcionales de estos linfocitos no se examinaron *in vitro*. Verma et al.²⁶ encontraron una respuesta blastogénica significativa a la PPD en niños con reacciones negativas a una inyección de 1 UT de PPD. Sin embargo, el uso de tuberculina de primer refuerzo en dicho estudio no es evidencia suficiente de un estado anérgico verdadero.

Aunque las concentraciones de proteínas en el suero total eran casi idénticas en ambos grupos de pacientes, todos tenían un estado benigno de hipergamaglobulinemia, confirmando los resultados de estudios anteriores⁴. Los pacientes negativos a la PPD mostraban concentraciones de IgA e IgG significativamente elevadas (Cuadro 1). Esta observación es contraria a los datos de Zeitz et al.⁴, quienes no encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de inmunoglobulinas en el suero de tuberculosos positivos y negativos a la PPD. Se ha sugerido que la hipergamaglobulinemia representa un estímulo no específico de síntesis o secreción de inmunoglobulinas en vez de concentraciones altas de anticuerpos específicos contra los antígenos micobacterianos²⁷. La causa de esta estimulación en la tuberculosis puede ser la actividad mitogénica de proteínas circulantes parecidas a la tuberculina, producidas *in vivo* por *M. tuberculosis* viable. Se ha demostrado en ratones y curies²⁸ que la PPD

es un mitógeno de células B, aunque presumiblemente también actúa sobre células T específicamente sensibilizadas. Los incrementos significativos observados en las concentraciones de inmunoglobulinas en nuestros pacientes anérgicos, confirman los resultados de 2 estudios recientes que sugieren que la inmunidad celular disminuida en presencia de una producción aumentada de inmunoglobulinas en pacientes tuberculosos, se debe a cambios correspondientes en las poblaciones circulantes de las células T y B^{29, 30}.

Se ha demostrado que la sensibilidad a la tuberculina se altera tanto en niños como en adultos desnutridos. En un estudio de adultos de Nigeria con tuberculosis esputo-positiva, Harrison et al.¹⁰ encontraron que las reacciones disminuidas a la PPD se correlacionaban con las concentraciones de albúmina y transferrina en el suero y concluyeron que la desnutrición desmejora la respuesta inmunológica celular en general. Aunque en el presente caso todos los enfermos tenían concentraciones subnormales de proteínas séricas totales, y los pacientes anérgicos tenían concentraciones disminuidas de albúmina sérica, no hubo evidencia de que la desnutrición severa contribuyera al estado anérgico.

Se ha supuesto que algunos tipos de anergia pueden deberse a un defecto en la respuesta inflamatoria no específica de la piel³¹. El DNCB es un irritante primario que induce una inflamación fuerte, además de proporcionar un estímulo inmunológico. En los pacientes anérgicos se observaron respuestas inflamatorias normales, pero no se hallaron evidencias de inmunización, lo que sugiere que estos 2 fenómenos no deben estar necesariamente correlacionados. Estos resultados significan que la falta de respuesta al DNCB se debe quizá a la ausencia de una población de linfocitos comprometidos apropiadamente en vez de una falla en la producción de una reacción cutánea visible.

Aún está por identificar la causa exacta de la anergia generalizada que se observó en estos pacientes tuberculosos. Parece estar relacionada con la función de los linfocitos de la sangre periférica, especialmente la subpoblación que reacciona en presencia de la PPD. Se deben examinar más a fondo las deficiencias nutricionales moderadas y el papel que juegan las enfermedades infecciosas subclínicas, particularmente las virales, como factores que predisponen a dicho estado. La pertinencia clínica del estado anérgico, es también dudosa. Si se usa como criterio la respuesta clínica a la quimioterapia de rutina, estos pacientes anérgicos no estaban comprometidos de manera significativa. Se debe tener en mente que la anergia a la tuberculina puede indicar un pronóstico pobre en ciertos pacientes tuberculosos, como los afectados por tuberculosis miliar, en inmunodeficiencias primarias, o en tuberculosis complicada con neoplasma o terapia inmunosupresiva concomitantes. Cuando se identifique un paciente tuberculoso anérgico, es imperativo llevar a cabo estudios más detallados para determinar su competencia inmunológica y para descubrir otras enfermedades, que pueden influir sobre su estado anérgico.

RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. M. Martínez, Director del Centro de Salud de Villa Colombia en Cali, por su colaboración en el seguimiento de los pacientes ambulatorios. También expresan su gratitud a la Sta. Héliida Barbosa por su ayuda con las pruebas cutáneas y la toma de muestras de sangre, a la Sra. Ana Carlina de Aly por su asistencia en varias pruebas de laboratorio y a la Sra. Marta McMurray por su interés en la preparación del manuscrito final y en su traducción al castellano.

SUMMARY

Twelve adults with confirmed pulmonary tuberculosis who failed to respond to repeated skin tests with 250 TU of second-strength purified protein derivative of tuberculin were studied using *in vivo* and *in vitro* tests of cell-mediated immunity. All but 2 of the patients failed to respond to skin tests with candidin and histoplasmin, and only one could be sensitized with topical applications of dinitrochlorobenzene. The blastogenic response of peripheral blood lymphocytes from these anergic patients, when cultured in the presence of phytohemagglutinin, pokeweed mitogen, and purified protein derivative, was significantly less than that of lymphocytes from tuberculin-positive control patients. During the course of therapy with isoniazid and streptomycin, 6 of the anergic patients converted spontaneously and reacted positively to purified protein derivative. This skin-test conversion was accompanied by a significant increase in the blastogenic response of lymphocytes from the converted patients when cultured with purified protein derivative. Tuberculin anergy in these 12 patients was not associated with progressive, disseminated disease. All patients responded successfully to the primary chemotherapeutic regimen.

REFERENCIAS

1. Kent, D.C. y Schwartz, R. Active pulmonary tuberculosis with negative tuberculin skin reactions. *Am Rev Respir Dis* 95: 411, 1967.
2. Holden, M., Dubin, M. R. y Diamond, P. H. Frequency of negative intermediate-strength tuberculin sensitivity in patients with active tuberculosis. *N Engl J Med* 285: 1506, 1971.
3. Howard, W. L., Flopfenstein, M. D., Steinger, W. J. y Woodruff, C. E. The loss of tuberculin sensitivity in certain patients with active pulmonary tuberculosis. *Chest* 57: 530, 1970.
4. Zeitz, S. J., Ostrow, J. H. y Van Arsdell, P. P. Humoral and cellular immunity in the anergic tuberculosis patient. *J Allergy Clin Immunol* 53: 20, 1974.
5. Waxman, J. y Lockshin, M. *In vitro* and *in vivo* cellular immunity in anergic miliary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 107: 661, 1973.
6. Grieco, M. H. y Chmel, H. Acute disseminated tuberculosis as a diagnostic problem. *Am Rev Respir Dis* 109: 554, 1974.
7. Catalona, W. J., Taylor, P. T., Rabson, A. S. y Chretien, P. B. A method for dinitrochlorobenzene contact sensitization. *N Engl J Med* 286: 399, 1972.
8. Kerby, G. R. Correlation of tuberculin skin reaction with in

- vitro lymphocyte transformation. *Am Rev Respir Dis* 97: 904, 1968.
9. Edwards, P. Q. Tuberculin negative, *N Engl J Med* 286: 373, 1972.
 10. Harrison, B. C. W., Tugwell, P. y Fawcett, I. W. Tuberculin reaction in adult Nigerians with sputum-positive pulmonary tuberculosis. *Lancet* 1: 421, 1975.
 11. Eltringham, J. R. y Kaplan, H. S. Impaired delayed-hypersensitivity responses in 154 patients with untreated Hodgkin's disease. *Natl Cancer Inst Monogr* 36: 107, 1973.
 12. Mangi, R. J., Dwyer, J. M., Gee, B. y Kantor, F. S. The immunological competence of subjects with sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* 18: 505, 1974.
 13. Haider, S., Coutinho, M. de L. y Emond, R. T. D.: Tuberculin anergy and infectious mononucleosis. *Lancet* 2: 74, 1973.
 14. Starr, S. y Berkovich, S. Effect of measles, gamma globulin-modified measles and vaccine measles on the tuberculin test. *N Engl J Med* 270: 386, 1974.
 15. Wesley, A. G., Parent, M. A., Schonland, M., Henderson, L. y O'Dowd, P. B. Immunological studies in children with chronic pulmonary infection. *S Afr Med J* 50: 465, 1976.
 16. Wilson, E. A., Thelin, T. J. y Dilts, P. V. Tuberculosis complicated by pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 115: 526, 1973.
 17. Girard, J. P., Paychere, J., Cuevas, J. y Fernandes, B. Cell-mediated immunity in an ageing population. *Clin Exp Immunol* 27: 85, 1977.
 18. Mancini, G., Carbonera, A. O. y Heremans, J. R. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *J Immunochem* 2: 235, 1965.
 19. Han, T. y Pauly, J. Simplified whole blood method for evaluating in vitro lymphocyte reactivity of laboratory animals. *Clin Exp Immunol* 11: 137, 1972.
 20. Junge, U., Hoekstra, J., Wolfe, L. y Deinhardt, F. Microtechnique for quantitative evaluation of in vitro lymphocyte transformation. *Clin Exp Immunol* 7: 431, 1970.
 21. McMurray, D. N., Reyes, M. A., Rey, H. y Casazza, L. J. Niveles de inmunoglobulinas en el suero de recién nacidos y niños normales en Cali. *Acta Med Valle* 8: 6, 1977.
 22. Goldstein, R. A., Ang, U. H., Foellmer, J. W. y Janicki, B. W. Rifampin and cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 113: 197, 1976.
 23. Rook, G. A. W., Carswell, J. W. y Stanford, J. L. Preliminary evidence of the trapping of antigen-specific lymphocytes in the lymphoid tissue of "anergic" tuberculosis patients. *Clin Exp Immunol* 26: 129, 1976.
 24. Thestrup-Pedersen, K. Temporary suppression of lymphocyte transformation after tuberculin skin testing. *Immunology* 27: 965, 1974.
 25. Kvetny, J. T-lymphocyte determination in tuberculosis. *Scand J Respir Dis* 58: 181, 1977.
 26. Verma, I. C., Gupta, M. L. y Chai, O. P. Evaluation of in vitro lymphoblastoid transformation in the presence of purified protein derivative as a diagnostic test of tuberculosis. *Indian Pediatr* 9: 339, 1974.
 27. Moticka, E. J. The non-specific stimulation of immunoglobulin secretion following specific stimulation of the immune system. *Immunology* 27: 410, 1974.
 28. Sultzter, B. M. y Nilsson, N. S. PPD tuberculin: A B-cell mitogen. *Nature* 240: 198, 1972.
 29. Bhatnagar, R., Malaviya, A. N., Narayanan, S., Rajgopalan, M., Kumar, R. y Bharadwaj, O. P. Spectrum of immune response abnormalities in different clinical forms of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 115: 207, 1977.
 30. Lenzini, L., Rottoli, P. y Rottoli, L. The spectrum of human tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 27: 230, 1977.
 31. Johnson, M. W., Maibach, H. I. y Salmon, S. E. Skin reactivity in patients with cancer: Impaired delayed hypersensitivity or faulty inflammatory response? *N Engl J Med* 284: 1255, 1971.