

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Programa de Doctorat en Medicina

Departament de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Patrons de progressió de la tuberculosi pulmonar en model experimental animal amb macacos mitjançant l'avaluació per tomografia computada

Isabel Nogueira Mañas

Tesi doctoral presentada per obtenir el grau de Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona

Directors:

Dr. Pere Joan Cardona Iglesias

Dr. Ricard Pérez Andrés

Dr. Jordi Bechini Bernad

Tutora:

Dra. Maria Cristina Tural Llacher

Badalona, 2023

Dedicatòria

Li dedico aquest treball als meus fills, la Teresa i el Pep, i al meu company a la vida, el Vico.

A la meva mare i al meu pare.

Agraïments

Aquest treball no hagués estat possible sense moltes persones que hi han col·laborat, feinejat, dedicat i recolzat. A tot el temps invertit. A les il·lusions i entusiasme quan ho aconseguíem i a les fatigues quan hem ensopegat i hem continuat endavant.

Així doncs, agrair especialment a:

Sally Sharpe i Andrew White. Sense ells i el seu equip aquest treball, simplement, mai hauria existit. Gràcies per la confiança dipositada en la Unitat de Tuberculosi Experimental i en mi mateixa. Per la cessió de les imatges de TC i per l'aportació de valuós coneixement.

Martí Català Sabaté. Brillant enginyer i estadístic. Per saber comprendre què necessitàvem i saber transmetre com ho havíem d'analitzar.

Pere-Joan Cardona Iglesias. Científic excepcional, encoratjador, entusiasta. Pou infinit de coneixement i de bones sorpreses. Avanti.

Ricard Pérez Andrés. Estructurador d'idees, solucionador de problemes, concís, sempre disposat.

Jordi Bechini Bernad. Organitzador i gestor en les accions, bon coneixedor de la feina ben feta.

Patricia Cuadras Collsamata. Consellera i consultora indispensable, companya de fatigues, sempre amb un somriure.

Els meus fills, la Teresa i el Pep, per la paciència. I també el meu propi temps personal, de lleure i de dormir. Per ser els grans damnificats en aquesta història, en aquesta cursa de llarg recorregut.

La meva família, per ser una muntanya sense fi de recolzament i ser-hi sempre. En especial al meu company l'Albert Vico Oton, la meva mare Daria Mañas Segura i els meus sogres, la Tere Oton Copete i el Jose Ramon Vico Idáñez. El meu pare Gelasio Nogueira Esmoris, que estaria ben orgullós de veure'm aquí.

Ramon Nogueira Mañas. Per preguntar-me sovint si ja he publicat i, sobretot, per oferir-se i ajudar-me quan l'he necessitat. I la Teresa G Zapata, pel carinyo i per mantenir-me connectada al món i les últimes tendències .

Cristina Vilaplana Massaguer. Per enfocar, concretar i concentrar idees. Pel seu riure.

Jordi Tor Aguilera, per aparèixer quan el busques. I Cristina Tural Llacher, per deixar-se engrescar tan fàcilment.

Als col·legues i amics de Radiologia, sobretot de la Secció de Tòrax, pel suport i per suplir-me quan desapareixia de la cadira: Ignasi Guasch Arriaga, Víctor Margelí Cervera, Carles Gómez Zaragoza i Renato Drummond da Silva.

A tots els amics i amigues que m'han escoltat les penes i les alegries, que m'han animat a seguir endavant i que, especialment, m'han obligat a sortir a sopar i relaxar-me.

A tota la meva (extensa) família. Que em fan sentir estimada, m'acompanyen i em fan més fàcil seguir avançant.

Finalment, a tots els membres del tribunal, per la seva ràpida resposta i acceptació, així com dedicació: Antoni Rosell Gratacós, Salvador Pedraza Gutiérrez, Joan Pau Millet Vilanova, Isabel Bielsa Marsol i Roger Paredes Deiros.

Llistat d'acrònims

AUC: *area under curve* o àrea per sota de la corva

BCG: *Bacille Calmette-Guérin*

CFU: *colony-forming unit* o unitats formadores de colònies.

ESAT-6: Early Secreted Antigenic Target 6 kDa

¹⁸F-FDG: flúor-18 fluordesoxiglucosa

IFN- γ : interferó gamma

IGRA: *Interferon Gamma Release Assay*

NPH: *non-human primates* o primates no humans.

OMS: Organització Mundial de la Salut

PET-CT: positron-emission-tomography computed-tomography

PPD: *purified protein derivative* o derivat de proteïna purificada.

RM: ressonància magnètica

SARS-CoV-2: *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* o síndrome respiratòria aguda greu coronavirus 2.

SUV: *standardized uptake values*

TC: tomografia computada

Th: limfòcits CD4+ T *helper* o ajudants

VIH: virus de la immunodeficiència humana

CUV: *unvaccinated cynomolgus* o cynomolgus no vacunats

CIDV: *intradermic BCG-vaccinated cynomolgus* o cynomolguts amb vacuna BCG intradèrmica

RUV: *unvaccinated rhesus* o rhesus no vacunats

RAEV: *aerosol BCG-vaccinated rhesus* o rhesus amb vacuna BCG aerosolitzada

RIDV: *intradermic BCG-vaccinated rhesus* o rhesus amb vacuna BCG intradèrmica

Índex de figures

Figura 1. Taxa d'incidència estimada de tuberculosi, 2021. Extret de <i>Global Tuberculosis Report 2021, World Health Organization (1)</i>	6
Figura 2. Tendència global de la notificació de casos de tuberculosi diagnosticada, 2015-2021. Extret de <i>Global Tuberculosis Report 2021, World Health Organization (1)</i>	7
Figura 3. Retrat del Dr Robert Koch (1843-1910). Extret del llibre de JB Huber, <i>Consumption: Its relation to man and its civilization: Its prevention and cure</i> . Philadelphia, JP Lippincott, 1906	8
Figura 4. Bacils de <i>M. tuberculosis</i> amb tinció de Ziehl-Neelsen	10
Figura 5. Cicle infectiu de <i>M. tuberculosis</i> , extret de Cardona (2018) (35).	12
Figura 6. Model de Bombolles per la progressió de la tuberculosi activa, extret de Prats et al. (2016).	15
Figura 7. Imatges histològiques de la formació i maduració dels granulomes tuberculosos en minipig, extret de Gil et al. (2010)(72). A l'esquerra amb tinció d'hematoxilina-eosina i a la dreta amb tricròmic de Masson, usant magnificació x100. Els granulomes A-D es troben en la fase I, i els granulomes E-F en fase II. Les línies discontinües i les fletxes verdes mostren els septes interlobulillars.	17
Figura 8. Algorisme per diagnòstic de infecció tuberculosa latent i exclusió de tuberculosi en estudi de contactes en persones (excloent <5 anys, VIH+ i altres grups de risc). Extret de <i>Plan para la Prevención y Control de la Tuberculosis en España del Ministerio de Sanidad, 2019 (90)</i>	20
Figura 9. <i>TB vaccine pipeline TBVI</i> . Esquema de les principals candidates a vacuna tuberculosa publicada per <i>TuBerculosis Vaccine Initiative</i> (que es coneix com <i>Pipeline of vaccines from TBVI</i>), amb última revisió a octubre del 2021.	27
Figura 10. Imatge de TC axial amb finestra de pulmó (humà). Condensació pulmonar tuberculosa que afecta els lòbuls superior i mig drets.	32
Figura 11. Imatge de TC axial amb finestra de pulmó (humà). Afectació tuberculosa activa amb nòdul pulmonar de major mida i micronòduls adjacents situats a la perifèria del segment posterior del lòbul superior dret. Micronòdul contralateral al segment superior del lòbul inferior esquerre en contacte amb la cissura.	33

Figura 12. Radiografia convencional toràcica amb projecció frontal postero-anterior (humà). Lesió cavitada de paret gruixuda a camp pulmonar mig dret i opacitats nodulars adjacents compatible amb tuberculosi activa.	33
Figura 13. Imatge de TC axial amb finestra de pulmó (humà). Condensació dreta i nòdul esquerre que mostren cavitació central, situades a ambdós lòbuls superiors. Addicionalment s'observen micronòduls a la perifèries de les dues lesions.	34
Figura 14. Imatges TC de tòrax en finestra de pulmó de la mateixa persona amb reconstruccions axial (esquerra) i coronal (dreta). S'hi identifiquen abundants micronòduls pulmonars sòlids bilaterals de distribució aleatòria en tuberculosi miliar.	34
Figura 15. Imatge de TC axial (1) i coronal (2) amb finestra de pulmó (humà). Canvis fibronodulars tuberculosos de clar predomini a àpex pulmonar esquerre, on s'observen pèrdua de volum global pulmonar, caverna apical, bronquièctasis, distorsió de l'arquitectura pulmonar, alguns tractes irregulars i ocasionals micronòduls biapicals.	35
Figura 16. Imatge TC coronal amb finestra de mediastí (humà). S'observen múltiples micronòduls calcificats a ambdós camps pulmonars superiors i mitjos.	36
Figura 17. La mateixa imatge TC axial, una amb finestra de pulmó (dreta) i una altra amb finestra de mediastí (esquerra) en humà. Es mostra el lòbul superior dret on s'observen canvis fibronodulars amb bronquièctasis, distorsió de l'arquitectura pulmonar i tractes lineals irregulars. Destaquen abundants calcificacions nodulars grolleres de diverses mides que s'identifiquen amb major claredat amb la finestra de mediastí.	36
Figura 18. Imatge TC axial amb finestra de pulmó (humà). Múltiples focus bilaterals de "arbre en brot" que corresponen a pneumònia broncocèntrica. A la dreta es mostra un arbre en gemmació a la primavera, imatge que representa el signe de "arbre en brot".	37
Figura 19. Imatge TC axial amb finestra de pulmó (humà). Extensa afectació tuberculosa al pulmó dret amb bronquièctasis per tracció sobretot al lòbul mig i nòduls cavitats al lòbul inferior dret.	38
Figura 20. Imatge TC sagital del pulmó dret (humà) amb finestra de pulmó. S'observa que el lòbul superior presenta una disminució difusa de la densitat i vasos globalment disminuïts de calibre, compatible amb atrapament aeri per bronquiolitis obliterant o síndrome de Swayer-James-McLeod d'origen post-tuberculós. Addicionalment s'identifiquen petits granulomes calcificats apicals.	38

Figura 21. Imatge TC axial amb contrast endovenós en finestra de mediastí (mateixa persona), a nivell immediatament caudal a l'arc aòrtic (esquerra) i nivell subcarinal (dreta). S'observen múltiples adenopaties augmentades de mida que mostren centre hipodens i realç perifèric; a la primera imatge estan localitzades a regió paratraqueal esquerra i subaòrtiques amb ocupació de la finestra aorto-pulmonar i a la segona imatges se situen a regió subcarinal, hilars i lobars inferiors.....	39
Figura 22. Imatge TC coronal amb finestra de mediastí (humà). S'observen algunes adenopaties grollerament calcificades a regió mediastínica subcarinal i hilar bilateral.....	40
Figura 23. Imatge TC axial amb contrast endovenós en finestra de mediastí (humà). A l'hemitòrax dret s'objectiva vessament pleural de contingut homogeni amb interfase pleuropulmonar lobulada i lleu realç amb engruiximent de les fulles pleurals, compatible amb empiema tuberculós.	41
Figura 24. Imatge TC coronal en finestra de pulmó (humà). Caverna tuberculosa biapical, amb demostració de fístula broncopulmonar esquerra.	41
Figura 25. Radiografia de tòrax en projecció frontal postero-anterior (esquerra) i TC toràcic amb contrast endovenós a nivell de les bases pulmonars en finestra de mediastí (esquerra) del mateix pacient. S'observa extens engruiximent calcificat pleural basal dret compatible amb paquipleuritis calcificada post-tuberculosa.	42
Figura 26. Imatge TC axial adquirida amb contrast endovenós en finestra de mediastí. Extensa afectació tuberculosa dreta on destaca lesió nodular de densitat similar als vasos sanguinis compatible amb pseudoaneurisme pulmonar o de Rasmussen; va ser tractat amb embolització intraarterial percutània (no es mostra). A més s'observa extensa condensació pulmonar del lòbul inferior dret i lleu empiema pleural amb realç i engruiximent de les fulles pleurals tractat amb drenatge percutani.	43
Figura 27. Imatge TC axial en finestra de pulmó al mateix nivell adquirits amb 12 mesos de diferència (humà). La imatge de l'esquerra mostra una caverna tuberculosa. A la imatge de la dreta, la cavitat es troba ocupada per material arrodonit que deixa una fina làmina de gas amb la paret de la caverna (signe de "la mitja lluna aèria") i és compatible amb micetoma.....	44
Figura 28. Esquema de l'anatomia del pulmó dret en <i>Macaca</i> espècie. Extret de <i>An Atlas of Primate Gross Anatomy</i> (240).	48
Figura 29. Esquema de l'anatomia del pulmó dret en <i>Macaca</i> espècie. Extret de <i>An Atlas of Primate Gross Anatomy</i> (240).	49

Figura 30. Esquema dels segments broncopulmonars representats en l'arbre bronquial (humà). Cortesia del Dr Matt Skalski, Radiopaedia.org, rID: 23285	50
Figura 31. Septes interlobulillars en anatomia patològica macroscòpica de pulmons humans. ...	51
Figura 32. Septes interlobulillars en imatges TC de pulmons humans.....	51
Figura 33. Esquema temporal de l'adquisició de les TC.	61
Figura 34. Exemple de l'estudi volumètric tridimensional dels pulmons i de l'arbre traqueobronquial principal (en la primera TC adquirida a un cynomolgus vacunat).	64
Figura 35. Representació dels segments broncopulmonars en macaco, sobre reconstruccions axials amb finestra de pulmó en imatges axials de la primera TC adquirida a un rhesus vacunat inhalatòriament, realitzat per Dr. Martí Català i Isabel Nogueira.....	65
Figura 36. Exemple de condensació pulmonar amb avaluació temporal de lesió a língula inferior (segment 15) de RUV03.....	68
Figura 37. Exemple de valoració tridimensional d'una consolidació en reconstruccions multiplanars axial, sagital i coronal (d'esquerra a dreta).....	68
Figura 38. Exemple de cavitació.	69
Figura 39. Exemple de distància pleural.....	69
Figura 40. Exemple de micronòduls associats.....	70
Figura 41. Exemple de micronòduls aïllats.....	71
Figura 42. Exemple de beines broncovasculares (cercles blaus) i cissures (fletxes) en les imatges TC axials en finestra de pulmó del TC a les 3 setmanes de RIDV02.	75
Figura 43. Gràfiques de dispersió del volum pulmonar.	76
Figura 44. Imatges TC axials consecutives en finestra de pulmó, a nivell de camps superiors. Evolució de la tuberculosi activa progressiva en un rhesus vacunat amb BCG intradèrmica (RIDV) a la setmana 3 (imatge A), setmana 11 (imatge B) i setmana 16 (imatge C) post-infecció.	77
Figura 45. Tuberculosi miliar en la última TC del RUV05, amb reconstruccions multiplanars axial i coronal (imatges de la dreta i esquerra respectivament) en finestra de pulmó. S'observen incomptables micronòduls pulmonars bilaterals distribuïts de forma aleatòria al parènquima pulmonar.	78
Figura 46. Diagrama <i>boxplot</i> que mostra el percentatge d'afectació tuberculosa pulmonar en cada lòbul, expressat com a fracció de volum ocupat lobar.	80

Figura 47. Imatge TC coronal en finestra de pulmó que mostra amputació del bronqui principal esquerre (fletxa vermella) en la TC de la setmana 11 de CUV07, amb pèrdua de volum al pulmó homolateral i afectació tuberculosa extensa.....	81
Figura 48. Gràfiques lineals de la distribució percentual dels micronòduls, per grups experimentals. Es mostra l'evolució dels percentatges mitjans de micronòduls per cada fase en cada grup experimental. Es ressalta amb color l'àrea sota de corba (AUC), que correspon als micronòduls associats; d'aquesta forma, l'àrea inversa es representa en blanc i correspon als micronòduls aïllats. A més, s'afegeix el nombre total de cada tipus de micronòdul.	86
Figura 49. Gràfica de dispersió que mostra el volum de les consolidacions en funció del nombre de micronòduls associats, per grups experimentals.....	89
Figura 50. Gràfica de dispersió que mostra la porció de pulmó ocupada per lesions en funció del nombre de micronòduls aïllats, per grups experimentals.....	90
Figura 51. Gràfiques de barres que mostren la fracció de condensacions cavitades distribuïdes per rangs de volum, en els rhesus.....	91
Figura 52. Esquema visual de l'afectació pulmonar tuberculosa en macacos cynomolgus i rhesus control. El símbol † indica mort prematura.....	93
Figura 53. Gràfiques de barres i línies per l'anàlisi dels macacos no vacunats. Blau: cynomolgus; Vermell: rhesus. Diferència estadística significativa s'identifica (**). Línies de color discontinúes: etapes amb pèrdua de dades. A: Quantitat de condensacions en cada macaco; línia discontinua: valor medià; línia blava: valor medià cynomolgus; línia vermella: valor medià rhesus. B: Evolució del percentatge del volum pulmonar ocupat. C: Evolució de la quantitat de micronòduls aïllats. Línia gruixuda: mitjana. D: Fracció de cavitació de les condensacions. E: Evolució de la quantitat de micronòduls associats. Línia gruixuda: mitjana	95
Figura 54. Esquema visual de l'afectació pulmonar tuberculosa en macacos cynomolgus i rhesus vacunats. El símbol † indica mort prematura.....	97
Figura 55. Gràfiques de barres i línies per l'anàlisi dels cynomolgus control (blau) i vacunats (cian). Línies de color discontinúes: etapes amb pèrdua de dades. A: Quantitat de condensacions en cada macaco; línia discontinua: valor medià; línia blava: valor medià cynomolgus; línia vermella: valor medià rhesus. B: Evolució del percentatge del volum pulmonar ocupat.....	99
Figura 56. Gràfiques de barres i línies per l'anàlisi dels rhesus control i vacunats. Vermell: control; taronja: vacuna inhalada; magenta: vacuna intradèrmica. A: Quantitat de condensacions en cada macaco; línia discontinua: valor medià; línia blava: valor medià cynomolgus; línia vermella: valor	

medià rhesus. B: Evolució del percentatge del volum pulmonar ocupat. C: Evolució de la quantitat de micronòduls aïllats. Línia gruixuda: mitjana. D: Fracció de cavitació de les condensacions. E: Evolució de la quantitat de micronòduls associats. Línia gruixuda: mitjana.....	100
Figura 57. Normalització del creixement de les condensacions per cada grup experimental.	101
Figura 58. Gràfica de barres que mostra les proporcions de lesions que contacten o no amb la pleura distribuïts per rangs de volum de les condensacions, per cada grup experimental.....	106
Figura 59. Diagrama de <i>boxplot</i> que mostra la relació entre les condensacions i el contacte pleural, per grups experimentals.....	107

Índex de taules

Taula 1. Classificació de la tuberculosi, per l' <i>American Thoracic Society</i> (ATS).....	23
Taula 2. Taula sumària de quantificació de lesions, per grups experimentals.	79
Taula 3. Lateralitat de les condensacions en els grups experimentals.....	80
Taula 4. Resum de les condensacions pulmonars i lesions transicionals, per grups experimentals.	82
Taula 5. Resum dels micronòduls per grups experimentals.	85
Taula 6 Distribució de consolidacions amb micronòduls associats i els micronòduls associats per cada consolidació, per grups experimentals.....	87
Taula 7. Taula de contingència. Diferències en la distribució de les condensacions amb o sense micronòduls associats entre els grups experimentals. Els números corresponen al valor de p amb test de Fisher.....	88
Taula 8. Quantificació de lesions totals per cada TC per grups experimentals.	96
Taula 9. Distribució de micronòduls. Nombre total i proporcions respecte el total de lesions de cada subtipus de micronòduls i per cada grup experimental.....	102
Taula 10. Taula de contingència. Diferències de la distribució dels micronòduls associats i aïllats basats en la seva proporció. Els números corresponen a valor de p amb test de Fisher.....	103
Taula 11. Anàlisi de lesions en rhesus.....	103
Taula 12. Lesions transicionals. Quantitat de lesions transicionals respecte el nombre de condensacions i percentatge en els grups experimentals exposades per etapes.	104

SUMARI

Resum	1
Abstract	4
1. INTRODUCCIÓ.....	6
1.1. La infecció tuberculosa.....	6
1.1.1. Situació actual i rellevància de la tuberculosi	6
1.1.2. Etiologia. Característiques del <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9
1.1.3. Patogènia. Desenvolupament de la infecció i models d'evolució tuberculosa	11
1.1.4. Histologia. Granuloma tuberculós: el tret distintiu de la infecció.....	15
1.1.5. Clínica, diagnòstic i tractament	18
1.2. La vacuna antituberculosa.....	24
1.2.1. Eficàcia de la BCG	24
1.2.2. La recerca continua: noves vacunes i diferents estratègies amb la BCG	25
1.3. Diagnòstic per la imatge en tuberculosi.....	30
1.3.1. Mètodes d'imatge	30
1.3.2. Semiologia de la tuberculosi en estudis d'imatge	31
1.4. Model experimental animal amb macacos	44
1.4.1. Diferències entre macacos rhesus i cynomolgus	45
1.4.2. Infecció experimental amb <i>M. tuberculosis</i>	46
1.4.3. Anatomia pulmonar dels macacos	47
1.4.4. Diagnòstic per la imatge	52
1.4.5. Eficàcia de la BCG	53
2. HIPÒTESI.....	58
3. OBJECTIUS.....	58
3.1. Objectiu principal	58
3.2. Objectius secundaris.....	58

4. MATERIAL I MÈTODES.....	59
4.1. Disseny general	59
4.2. Material.....	59
4.2.1. Animals experimentals.....	59
4.2.2. Imatges de TC.....	61
4.3. Procediment.....	63
4.4. Definició de les variables.....	66
4.4.1. Variables de les lesions per imatge.....	66
4.4.2. Variables dels macacos	72
4.5. Grups experimentals	72
4.6. Anàlisi estadística.....	73
5. RESULTATS	75
5.1. Consideracions generals	75
5.2. Identificar patrons de distribució de la malaltia tuberculosa pulmonar en imatges TC.....	78
5.2.1. Detall de la distribució dels micronòduls.....	84
5.2.2. La relació entre les condensacions i els micronòduls associats.....	86
5.3. La cavitació de les condensacions.....	90
5.4. L'efecte de la vacuna BCG en macacos rhesus i cynomolgus	92
5.4.1. Evolució natural de la tuberculosi pulmonar	92
5.4.2. L'efecte de la vacunació i l'impacte de la seva via d'administració.....	96
5.5. L'impacte de la pleura en la contenció de la tuberculosi pulmonar.....	105
6. DISCUSSIÓ	109
6.1. Identificar patrons de distribució de la malaltia tuberculosa pulmonar en imatges TC...	113
6.1.1. Detall de la distribució dels micronòduls.....	115
6.1.2. La relació entre les condensacions i els micronòduls associats.....	116
6.2. La cavitació de les condensacions.....	118
6.3. L'efecte de la vacuna BCG en macacos rhesus i cynomolgus	119

6.3.1. Evolució natural de la tuberculosi pulmonar	119
6.3.2. L'efecte de la vacunació i l'impacte de la seva via d'administració	121
6.4. L'impacte de la pleura en la contenció de la tuberculosi pulmonar	124
6.4. Fortaleses i limitacions del treball.....	126
7. CONCLUSIONS	130
8. LÍNIES DE FUTUR.....	131
9. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES	132
10. ANNEX	158

Resum

Introducció: la tuberculosi és una malaltia infecciosa que es transmet per via aèria i el seu tret distintiu histològic és la formació de granulomes necrotitzants. A dia d'avui continua provocant una alta morbi-mortalitat a nivell mundial. Tot i les estratègies diagnòstiques, profilàctiques i terapèutiques disponibles, encara no s'ha aconseguit controlar la malaltia. La vacuna *Bacille Calmette-Guérin* (BCG) ha permès evitar les formes més greus de la malaltia però ofereix una protecció variable dels pulmons.

El diagnòstic per la imatge té un paper cabdal en el seu cribratge, diagnòstic i seguiment. La semiologia radiològica de la tuberculosi està àmpliament descrita i possibilita la diferenciació entre malaltia activa i latent.

El model experimental animal amb macacos està establert i validat per tuberculosi. Alguns d'aquests treballs analitzen els pulmons a partir de imatges de tomografia computada (TC) i analitzen la distribució, càrrega de malaltia i característiques de les lesions.

Tanmateix, la detecció de nous patrons radiològics capaços d'identificar precoçment diferents desenllaços tuberculosos podria ser una nova eina per l'avaluació de diferents estratègies profilàctiques i terapèutiques.

Hipòtesi: L'avaluació de la tuberculosi pulmonar mitjançant tomografia computada permet identificar patrons de contenció o progressió de la malaltia en un model experimental amb macacos.

Objectius: l'objectiu principal és identificar patrons de distribució de la malaltia tuberculosa pulmonar en imatges de TC. Els objectius específics són avaluar l'efecte de la vacuna *Bacille Calmette-Guérin* (BCG) en un model experimental animal amb macacos dels genotips rhesus i cynomolgus i objectivar l'impacte de la pleura per la contenció de la tuberculosi pulmonar en macacos.

Material i Mètodes: s'han analitzat 123 TC procedents de 35 macacos rhesus i cynomolgus infectats experimentalment amb *M. tuberculosis*, catorze dels quals havien estat prèviament vacunats amb BCG (per via intradèrmica o inhalada), i han estat monitoritzats amb imatges de TC durant 16 setmanes. S'avalua el nombre, característiques i localització de cada consolidació pulmonar i dels micronòduls. Aquests últims són subdividits, de forma innovadora, entre aïllats i associats. Es creen els grups experimentals en base al genotip del macaco i a l'estat i ruta de vacunació.

Resultats: es troben un total de 2564 lesions, clarament predominants en els rhesus, tot corroborant que desenvolupen tuberculosi activa progressiva greu en contraposició dels cynomolgus, que fan una major contenció de la infecció. Els micronòduls associats es vinculen a formes de pitjor progressió de la malaltia amb dos patrons radiològics: el complex condensació amb micronòduls associats i la major proporció de micronòduls associats envers els aïllats. S'aprecia un efecte de contenció inicial en tots els grups vacunats, més perllongat en cynomolgus. La ruta d'administració intradèrmica confereix major efecte protector pulmonar. Finalment, s'observa que la pleura provoca contenció tuberculosa en cynomolgus, indistintament del seu estat de vacunació.

Conclusions: les imatges de TC permeten identificar patrons de distribució de la malaltia tuberculosa pulmonar en un model experimental amb macacos. El complex format per condensacions amb micronòduls associats constitueix un patró radiològic identificable en imatges de TC que es vincula a una pitjor una progressió de la malaltia tuberculosa pulmonar i s'ajusta a la proposta del Model de Bombolles. Una major proporció de micronòduls associats envers els aïllats es relaciona amb progressió de la malaltia tuberculosa pulmonar. La vacuna BCG protegeix contra la tuberculosi pulmonar en la fase inicial de la malaltia a les dues espècies de macacos, fent una contenció temporal. La vacuna BCG per via intradèrmica podria conferir major efecte protector pulmonar, ja que mostra major contenció dels micronòduls associats. En els cynomolgus, indistintament del seu estat de vacunació, el contacte de les condensacions amb la pleura presenta un efecte de restricció del seu creixement.

Abstract

Introduction: tuberculosis is an airborne infectious disease and its hallmark at the histological level is the necrotizing granuloma. Nowadays, it is still associated worldwide with high morbidity and mortality. Despite the availability of diagnostic, prophylactic and therapeutic strategies, tuberculosis is not yet under control. The Bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccine avoids the deadliest forms of the disease although it offers inconsistent protection to the lungs.

Diagnostic imaging has a pivotal role in screening, diagnostic and follow-up. Radiological manifestations of tuberculosis are documented and enable to differentiate active from latent disease.

Experimental animal models using macaques are well established and validated in tuberculosis. Some of these studies analyse the lungs by performing computed tomography (CT) scans to evaluate the distribution and features of the lesions as well as burden of disease.

Nevertheless, the detection of new radiological patterns capable of distinguishing prematurely different outcomes could become a new tool for the evaluation of diverse prophylactic and therapeutic strategies.

Hypothesis: the evaluation of pulmonary tuberculosis by computed tomography allows the detection of disease's containment or progression patterns in an experimental model with macaques.

Objectives: the main objective is to detect patterns on the distribution of pulmonary tuberculosis in CT images. The specific objectives are (i) to evaluate the effect of the BCG vaccine in an experimental animal model with rhesus and cynomolgus macaques, and (ii) to analyse the pleural impact on the containment of pulmonary tuberculosis in macaques.

Materials and Methods: in this study, 123 CT scans from 35 rhesus and cynomolgus macaques experimentally infected with *M. tuberculosis* have been analysed, fourteen of them had been previously BCG-vaccinated (intradermal or inhaled) and have been monitored by CT images during

16 weeks. The number, features, and location of each lung consolidation as well as micronodules are evaluated. The latter are subdivided, in an innovative way, between *isolated micronodules* and *daughter micronodules*. Experimental groups are based on macaques' genotype and the vaccination status and route.

Results: up to 2564 lesions are found, showing a clear predominance in rhesus. This indicates that rhesus macaques develop progressive active tuberculosis in contrast to cynomolgus, which are able to do major containment. Daughter micronodules are related to worse tuberculosis progression, showing two radiological patterns: the complex consolidation with daughter micronodules and a higher proportion of daughter micronodules than isolated. It is appreciated an initial containment effect in all vaccinated groups that takes longer in cynomolgus. The intradermic route seems to confer greater lung protection in rhesus. Finally, a disease restraint effect performed by pleura is observed in cynomolgus, indistinctly of their vaccination status.

Conclusions: CT images are capable to detect patterns on the distribution of pulmonary tuberculosis in an experimental model with macaques. The lesional complex formed by consolidations with daughter micronodules constitutes an identifiable radiological pattern in CT images related to worse disease progression and adjusts to the bubble model proposal. A higher proportion of daughter micronodules than isolated is related to progression of tuberculosis. BCG vaccine protects initially from pulmonary tuberculosis to both macaques' genotype, temporally. Intradermic BCG route could confer greater lung protection because a larger contention of daughter micronodules is shown. In cynomolgus, indistinctly of their vaccination status, the contact of the consolidations with pleura restrains its growth.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. La infecció tuberculosa

1.1.1. Situació actual i rellevància de la tuberculosi

La tuberculosi és una malaltia infecciosa causada pel *Mycobacterium tuberculosis* que es transmet per via respiratòria. Clínicament existeixen la forma pulmonar, que és la primordial, i la forma extrapulmonar, que es dona per la disseminació bacil·lar a qualsevol òrgan.

Aquesta malaltia acompanya els éssers humans des de la prehistòria i a dia d'avui encara és un greu problema mundial degut a l'alta morbi-mortalitat que comporta, tot persistint com la primera causa de mort per patògen únic durant dècades fins a la irrupció de la síndrome respiratòria aguda greu per coronavirus 2 (més coneguda per les sigles en anglès SARS-CoV-2). És especialment prevalent en els països de ingressos baixos, amb l'Àfrica subsahariana i el sud-est asiàtic al capdamunt, prenent una revolada dramàtica quan es combina amb la infecció pel virus de la immunodeficiència humana (VIH) (1,2) **(Figura 1)**.

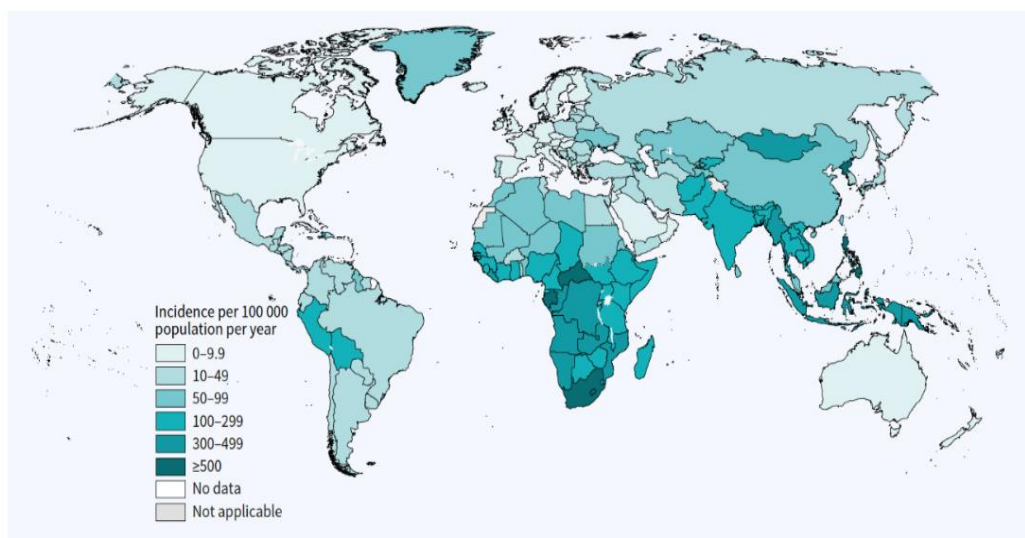


Figura 1. Taxa d'incidència estimada de tuberculosi, 2021. Extret de *Global Tuberculosis Report 2021, World Health Organization* (1)

La micobactèria tuberculosa infecta cada any uns 10 milions de persones arreu del món i és la causa de 1,5 milions de morts anuals. A més, la Organització Mundial de la Salut (OMS) estima que un 25-30% de la humanitat està latentment infectada, dels quals un 10% desenvoluparà tuberculosi activa en pocs anys (1–3).

La pandèmia per SARS-CoV-2 que va declarar-se el 2020 ha suposat una regressió en termes de contenció de la tuberculosi, amb dificultats per accedir a centres de salut i al seu tractament, sobretot en els llocs de menor implantació i cobertura sanitària. Globalment, ha suposat una franca caiguda en la detecció de casos, així com una estimació de mig milió d'excés de mortalitat que ens re situarà en valors de fa 10 o 15 anys (**Figura 2**) (1,2,4–6).

Global trend in case notifications of people newly diagnosed with TB, 2015–2021

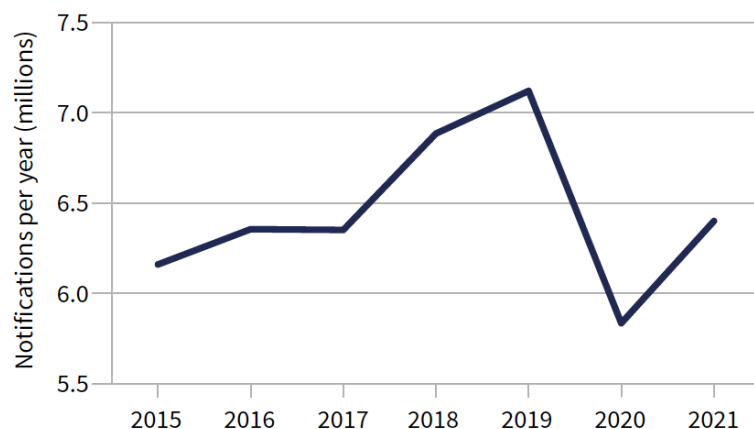


Figura 2. Tendència global de la notificació de casos de tuberculosi diagnosticada, 2015-2021. Extret de *Global Tuberculosis Report 2021, World Health Organization* (1)

Vèncer la tuberculosi, en el moment actual, no és un objectiu factible a curt ni a mig termini, i els esforços han de continuar concentrant-se en tres grans pilars: prevenció, diagnòstic precoç i tractament. Això, primordialment, significa avançar en el camp de les vacunes, trobar biomarcadors de diagnòstic i d'activitat de la malaltia, així com nous fàrmacs i protocols que permetin escurçar i facilitar el tractament, i que alhora, combatin la tuberculosi multiresistent (7–10).

Breu història

L'origen de les infeccions per *Mycobacterium tuberculosis complex* en *Homo sapiens* daten del paleolític, associat al descobriment del foc i l'establiment de petites comunitats amb majors vincles socials (11–16). Hi ha indicis de tuberculosi a totes les civilitzacions des de temps antics (17–22) i al llarg de la història ha mostrat una afectació creixent a mesura que les ciutats i la densitat de població augmentaven. Durant la Revolució Industrial van tenir lloc greus epidèmies tuberculoses, on la prevalença i la morbi-mortalitat van ser altíssimes, i s'estima que es van assolir taxes de mortalitat al voltant de 900/100.000 habitants, amb especial incidència entre adults joves (17,20,23).

Jean-Antoine Villemin va ser el primer en demostrar que la malaltia és de causa infecciosa el 1865 (17,20,24). Però fou finalment el científic Robert Koch (**Figura 3**), el 1882, qui va aconseguir el gran repte d'identificar la bactèria (17,20,21,27), fet que li va valdre el Premi Nobel el 1905.

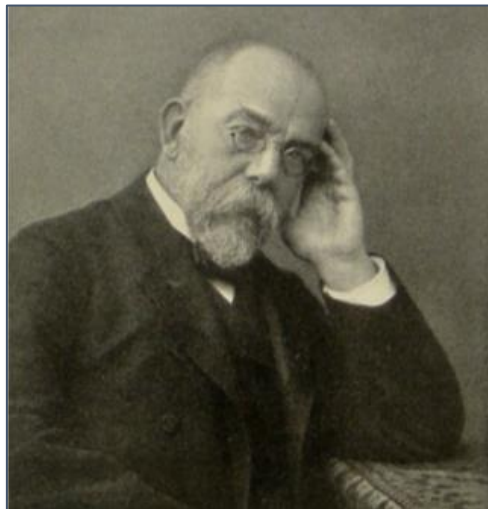


Figura 3. Retrat del Dr Robert Koch (1843-1910). Extret del llibre de JB Huber, *Consumption: Its relation to man and its civilization: Its prevention and cure*. Philadelphia, JP Lippincott, 1906

Anys després, es van desenvolupar els tests cutanis de von Pirquet (1907) i Mantoux (1908) -també conegut com test cutani de la tuberculina o PPD-, així com la vacuna anti-tuberculosa de Calmette i Guérin (1921). El 1944 es va descobrir el primer fàrmac anti-tuberculós, l'estreptomina (26–28)

fet que va donar pas a l'inici de l'era post-antibiòtica, on la morbi-mortalitat va caure dràsticament i el control de la malaltia va esdevenir una realitat.

El 1993 la OMS va declarar la tuberculosi una emergència global i va dissenyar un pla que predeia la seva erradicació al voltant de l'any 2000, basant-se en dades optimistes gràcies a tractaments curts desenvolupats els anys 1980s i la perspectiva de noves vacunes. Però la realitat va ser diferent a les expectatives inicials, ja que no es van aconseguir noves eines profilàctiques, el protocol de tractament curt de 6 mesos va esdevenir massa llarg, fet que donava peu a l'abandonament terapèutic i al desenvolupament de resistències antibiòtiques, així com el gran impacte negatiu que va suposar la irrupció de la pandèmia VIH. A més, la milloria de l'esperança de vida està facilitant la tuberculosi, de forma inversemblant, com a conseqüència d'una major presència de malalties debilitants; l'increment de fluxos migratoris està barrejant àrees d'alta i baixa endemicitat i l'èxode rural mundial ha donat lloc a l'augment de la vida urbana i de les aglomeracions, tot afavorint la persistència de les infeccions (4,8,29).

El 2017, la OMS va ressituar l'erradicació de la tuberculosi al 2030 (30), però la irrupció de la pandèmia SARS-CoV-2 ha estat un nou daltabaix que ha suposat una marcada regressió que ens ressitua en dades de 2005-2010 (1,2,4-6,31).

1.1.2. Etiologia. Característiques del *Mycobacterium tuberculosis*

El *Mycobacterium tuberculosis* forma part de la família *Mycobacteriaceae*, on s'hi troba el gènere *Mycobacterium* i d'altres microorganismes com les corinebactèries i les nocàrdies, que presenten una alta presència de lípids (fins al 60%) degut essencialment a la presència d'àcids micòlics a la membrana externa de la paret cel·lular. Aquesta els confereix la seva característica primordial, que és la d'àcid-alcohol-resistència: s'acolorixen amb dificultat, però un cop tenyits, no es poden decolorar amb àcids ni alcohol.

Les micobactèries són uns gèrmens ubics, i n'hi ha des de sapròfits del sòl i aigua fins a patògens humans causants de la tuberculosi (*M. tuberculosis*), d'afectació pulmonar per micobactèries atípiques (entre d'altres, *M. avium intracellulare* o *M. kansasii*) o bé de malalties cutànies com la lepra (*M. leprae*) (32).

És un bacil immòbil i no esporulat (**Figura 4**), aeròbic obligat i que pren l'energia de fonts de carboni. És peculiarment de creixement lent, amb un temps de duplicació de 18-24 hores (la resta de bacteries freqüentment ho fan en 20 minuts), i són més resistents a agents químics que les altres bacteries gràcies a la naturalesa hidròfoba que li confereix la seva superfície cel·lular lipídica i un creixement aglomerat. No produeix endotoxines, exotoxines ni enzims que puguin causar danys adversos (32,33).

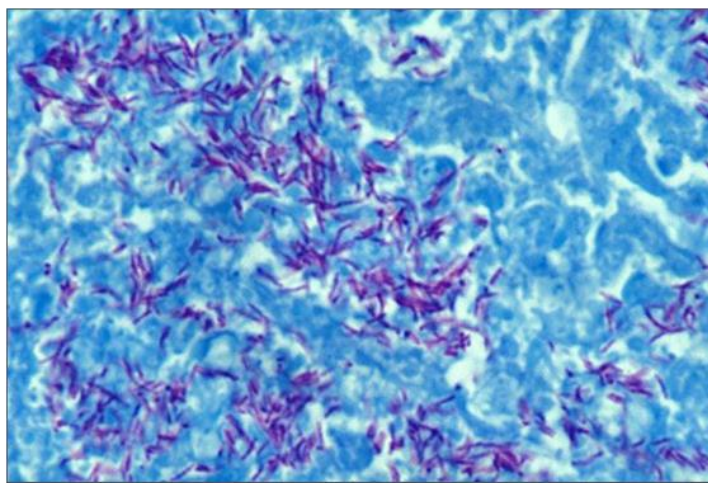


Figura 4. Bacils de *M. tuberculosis* amb tinció de Ziehl-Neelsen

El mètode de tinció Ziehl-Neelsen és el més eficaç, però val a dir es considera bactèria grampositiva tot i que s'acolorix irregularment amb la tinció. En mostres directes d'esput o tissulars aquest bacil també es pot observar amb fluorescència sota tincions amb fluorocroms, com l'auramina (32,33).

Es cultiva típicament en medi sòlid a base de ou coagulat, com el *Löwenstein-Jensen*. També s'usen medis de cultiu semi-sintètics d'agar, com *Middlebrook 7H10*, i medis líquids o caldos de cultiu com *Middlebrook 7H9* i *7H11* (on acostuma a créixer més ràpid que en cultius sòlids). Una atmosfera enriquida amb CO₂ estimula el seu creixement (32–34).

1.1.3. Patogènia. Desenvolupament de la infecció i models d'evolució tuberculosa

La tuberculosi és una malaltia infecciosa que es contagia per via aèria a través de gotetes respiratòries aerosolitzades de molt petita mida (de 2-4 μm), que contenen bacils viables, i que es generen des de persones amb tuberculosi activa pulmonar. També existeix la transmissió per via digestiva sobretot a través llet vacuna infectada per *M. bovis*, que actualment és anecdòtica, o inclús la infecció a laboratoris com a malaltia d'exposició laboral (32–34).

La infecció pulmonar s'inicia, doncs, amb l'arribada d'un inòcul infectiu amb *Mycobacterium tuberculosis* al pulmó mitjançant la seva inhalació i és fagocitat per un macròfag alveolar (35,36). Però aquest bacil té la capacitat de replicar-se dins dels propis macròfags gràcies a la producció del pèptid ESAT-6, que evita tant la fusió fagosoma-lisosoma com l'apoptosi cel·lular, fet que permet l'entrada del patogen al citoplasma (35,37–39). Allí es multiplica durant pràcticament una setmana (40) fins a provocar la necrosi del glòbul blanc i l'alliberament de múltiples bacils al medi extracel·lular (35,41,42), on també es repliquen, tot permetent la infecció de nous macròfags a alvèols adjacents. La repetició d'aquest procés produeix un nivell cada cop més elevat de senyals pro-inflamatòries fins que es desencadena una cascada de resposta immune tot iniciant-se l'estructuració de la inflamació i la formació del granuloma(43).

Els bacils són drenats fins als ganglis limfàtics, on interaccionen amb les cèl·lules dendrítiques. Aquí té lloc la presentació d'antígens (que majoritàriament són ESAT-6 i complex antigènic Ag85), i s'estimulen sobretot limfòcits T CD4 i en especial el subtipus ajudants Th1 (43–45), tot permetent l'activació dels macròfags infectats i la subsegüent destrucció del bacil. En menor mesura també s'estimulen Th2, que propicien reparació tissular fibrosant, i en cas d'estimular-se limfòcits Th17 (situació que es dona quan hi ha alta concentració de bacils extracel·lulars) s'atrauen principalment neutròfils, que generen lesions de major volum (**Figura 5**).

Els macròfags activats són capaços de destruir el patogen, tot i que un petit percentatge dels bacils aconsegueix entrar en un estat d'alentiment metabòlic (conegut com estat dorment, o *dormancy* en anglès) que els permet sobreviure amb activitat metabòlica mínima. Aquests macròfags també tenen la capacitat de fer apoptosi, que al contrari de la necrosi, té un paper en la contenció de la replicació (46–48).

Per altra banda, els macròfags activats es poden arribar a transformar en macròfags espumosos (o *foamy macrophages* en anglès) com a conseqüència de la funció "d'escombrariaire" i que

habitualment succeeix al centre o *core* de la formació granulomatosa, amb la fagocitació dels teixits necrosats i bacils residuals. Aquest fet comporta una enorme incorporació intracitoplasmàtica d'àcids grassos provinents de les parets cel·lulars desintegrades, tot formant cossos lipídics que, al seu torn, resulten ser font d'energia per les micobactèries (amb especial interès de les dorments) (49–51).

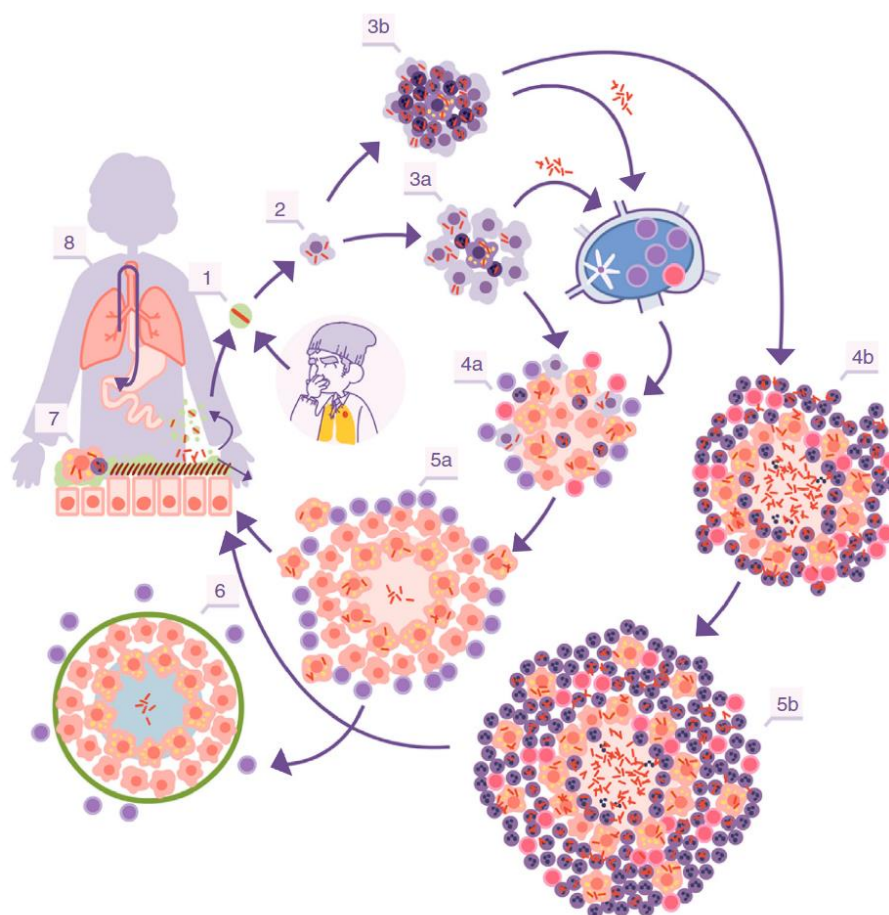


Figura 5. Cicle infecciós de *M. tuberculosis*, extret de Cardona (2018) (35).

[1] Entrada de bacils a l'alvèol i [2] fagocitosis per part d'un macròfag alveolar, amb multiplicació al seu interior. [3] Destrucció del macròfag i disseminació local, on apareixen altres macròfags que els fagociten novament. Es genera una resposta inflamatòria local, on s'hi troben monòcits [3a] i neutròfils [3b], amb drenatge dels bacils als ganglis limfàtics regionals, que desencadena la proliferació de limfòcits Th1 [4a] i Th17 [4b]. En el cas dels Th1, hi ha un control del creixement bacil·lar, amb el drenatge dels bacils dorments a través dels macròfags espumosos [5a], fins que es controla la lesió mitjançant l'encapsulació [6]. En el cas del Th17, les lesions creixen gràcies a l'entrada de neutròfils, associat a creixement bacil·lar extracel·lular, tot generant noves lesions perifèriques; en aquest cas, la concentració dels bacils és molt més alta i el drenatge és més important (a través dels fluids alveolars o inclús a nivell sistèmic mitjançant la neovascularització del granuloma [5b]). Globalment a nivell pulmonar, els bacils arrossegats pels fluids alveolars es drenen cap al tracte digestiu [8], tot i que poden arribar a formar part de nous aerosols, tot generant noves lesions i progressió de la malaltia.

Aquests macròfags espumosos, que contenen bacils tuberculosos, es poden trobar als fluids alveolars drenats amb el moviment ciliar, i per tant, no tots queden encapsulats dins dels granulomes. La seva mobilització, en cas de no aconseguir eliminar-los amb les secrecions respiratòries, pot ser perversa i poden provocar reinfeccions endògenes amb la generació de nous aerosols infectius dins de la pròpia via aèria.

El conjunt de fenòmens inflamatoris descrits desencadenen la formació immune característica de la tuberculosi, els granulomes, i tenen la capacitat d'evitar el desenvolupament de la tuberculosi activa en un 90% dels casos aproximament (2,3,35). L'equilibri entre els senyals bioquímics pro- i anti-inflamatoris al lloc de la infecció és crucial pel control de la malaltia (52,53).

Existeix la possibilitat que el bacil aconsegueixi sortir del gangli limfàtic o del granuloma i dissemini, a través de vasos limfàtics o sanguinis, fins a d'altres localitzacions i inclús altres òrgans, donant a formes extrapulmonars de la malaltia (42,46,47).

Cavitació tuberculosa. És un altre fenomen característic i rellevant de la tuberculosi. Els agregats d'inflamació granulomatosa pateixen necrosi caseosa central; si la inflamació erosiona la paret d'un bronqui adjacent, es produeix una comunicació amb la via aèria que permet la sortida del caseum a l'arbre traqueobronquial així com l'entrada de gas a l'interior de les lesions tuberculosos (54–59) tot donant lloc a lesions cavitades. Aquest procés implica que el caseum, inicialment encapsulat i ben contingut, és capaç de disseminar-se per via aèria provocant reinfeccions endògenes (51,60) i per tant, és un fenomen que promou la progressió de la malaltia. Les cavitacions de condensacions tuberculosos són un esdeveniment de mal pronòstic, doncs implica baix control de la infecció, desvascularització de la pneumònia amb pobra entrada d'antibiòtic així com major risc de reactivacions futures. A demés, les lesions tuberculosos cavitades incrementen el risc epidemiològic perquè augmenten la transmissió, ja que es detecten majors càrregues bacil·líferes en cultius d'esput (61).

Models de l'evolució tuberculosa basats en la patogènia

Les revisions recents de la fisiopatogènia demostren que els fenòmens immunes i els granulomes són processos dinàmics (43,52,60,62) en contra de la Teoria Estacionària tradicional. Es recolzen en el fet que s'identifiquen macròfags de diferents fenotips al sí dels granulomes, amb macròfags infectats i no-infectats i que, per tant, se n'hi van infiltrant (43,63,64) així com la identificació de macròfags espumosos als fluids alveolars que al seu torn provenen principalment de zones necròtiques intragranulomatoses (35,49–51).

L'anomenada Hipòtesi Dinàmica es basa en aquests fenòmens i entén la tuberculosi latent com un procés de reinfecció endògena constant, continguda i controlada gràcies a una resposta immune eficient (35,51,60).

Model de "bombolles de sabó" per progressió a la tuberculosi activa

Altrament, Prats et al. (2016) (65) proposen un model matemàtic per descriure la progressió de la malaltia activa tuberculosa, emmirallat en el comportament de les bombolles de sabó. Es basa en tres processos que es consideren claus: (i) la resposta immunitària intensa local, que implica un creixement exponencial de les lesions; (ii) la disseminació infecciosa amb reinfeccions endògenes, i la conseqüent generació de noves lesions anomenades "lesions filles" (o *daughter lesions* en anglès); (iii) finalment, la coalescència de les lesions formades. Les dades són extretes d'un model animal amb ratolins C3HeB/FeJ experimentalment infectats amb *M. tuberculosis*, que de forma característica generen una resposta inflamatòria exagerada.

Cal recordar que la llei de les bombolles de sabó explica que dues bombolles en contacte es fusionaran, ja que l'aire de la bombolla petita és empès cap a dins de la bombolla gran. Per tant, les bombolles fan coalescència tot creant una bombolla més grossa amb menys pressió interna.

L'anàlisi de les lesions en la tuberculosi activa progressiva emulen la dinàmica de les bombolles de sabó en un model murí, tot fusionant-se entre sí en cas de contacte i donant lloc a lesions més grosses amb tendència a l'esfericitat (**Figura 6**).

Aquest Model de Bombolles (o *Bubble Model* en anglès) obre noves perspectives per la comprensió de la història natural de la tuberculosi, inclou altres teories com la Hipòtesi Dinàmica

(51,60) i és capaç de quantificar i per tant comparar models. A més, la seva aplicació podria ser una eina per entendre millor els mecanismes que desemboquen cap a la tuberculosi activa i es podria usar per predir casos en què s'estigui generant una tuberculosi activa des d'una forma latent.

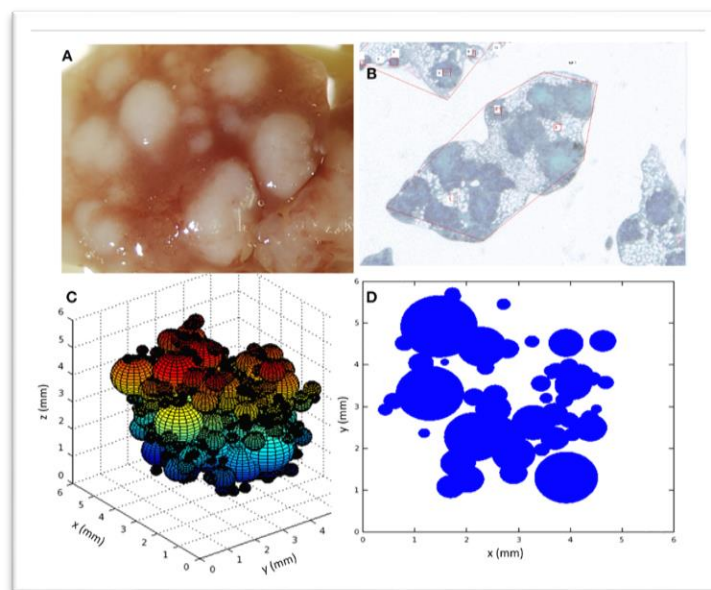


Figura 6. Model de Bombolles per la progressió de la tuberculosi activa, extret de Prats et al. (2016).

(A) Imatge de la superfície d'un pulmó de ratolí el dia 30 post-infecció, on s'identifiquen abundants lesions blanquinoses que corresponen a focus de pneumònia granulomatosa. (B) Imatge histològica de parènquima pulmonar amb lesions tuberculoses granulomatoses, tinció tricròmic de Masson. (C) Simulació 3D d'un grup de lesions pulmonars, on cada esfera representa una lesió. (D) Simulació 2D del mateix grup de lesions.

1.1.4. Histologia. Granuloma tuberculós: el tret distintiu de la infecció

L'estudi histològic de la tuberculosi pulmonar, macroscòpicament, mostra nòduls o masses compactes (anomenats clàssicament "tuberculomes", per la seva similitud amb el tubèrcul de la patata) i també consolidacions pulmonars. Aquestes formacions presenten calcificacions i necrosi central caseosa o *caseum* (43), tot implicant destrucció tissular permanent. Les condensacions pneumòniques corresponen a focus d'inflamació granulomatosa necrotitzant, de diferents

mides. A la malaltia miliar s'observen innumerables micronòduls d'agregats granulomatosos distribuïts aleatòriament pels òrgans (66,67).

Microscòpicament, el tret distintiu de la tuberculosi és la presència de granulomes necrotitzants. Són lesions esfèriques que presenten un centre necròtic envoltat per una muralla cel·lular i corresponen a la resposta immune que desenvolupa l'hoste per contenir la infecció per *Mycobacterium tuberculosis*. Els granulomes estan constituïts principalment per un agrupament de macròfags que mostren diferents fenotips i n'hi ha d'infectats i de no infectats (43,52,68); a més, al seu torn, poden transformar-se en cèl·lules epitelioides i, en fusionar-se, donar lloc a cèl·lules gegants. Aquests agregats de macròfags i cèl·lules derivades habitualment es troben envoltades per limfòcits, amb una presència variable de cèl·lules dendrítiques i de neutròfils (43,52,66,67,69,70) (aquests últims de vegades mostren una intensa infiltració (71)). Els granulomes generen necrosi central de tipus caseosa i tendeixen a fibrosar i calcificar amb el temps (66,67); també es poden esterilitzar completament com a culminació de la resposta immune (70,72–74), fet que es troba associat a major grau de mineralització o calcificació. Els bacils es distingeixen amb la tinció de Ziehl-Neelsen i se'n troben a les àrees necròtiques, a les cèl·lules gegants i en alguns dels macròfags.

Tanmateix, com ja s'ha exposat prèviament, els processos immunes que tenen lloc al granuloma mostren una dinàmica constant i no es tracta d'estructures estacionàries ni hermètiques. Fan la funció de contenció de la micobactèria i, idealment, de la seva destrucció, però alhora són un potencial reservori del patogen (43,51,60,70,75).

D'aquesta forma, els granulomes estan presents sempre en la infecció per *M. tuberculosis*, i per tant, se n'observen en tuberculosi activa i latent, tot i que se'ls pot identificar en diferents fases de maduració.

Subgrups de granulomes

S'han descrits diversos subtipus de granulomes que globalment es troben vinculats al seu grau de maduresa; estan definits per les seves característiques histològiques i moleculars, amb trets diferencials respecte la composició cel·lular i la matriu extracel·lular (52,54,68,72,74,76).

L'estudi de Olga Gil et al. (2010) (72), basat en un model experimental amb *minipigs*, subdivideix els granulomes i els situa en una progressió temporal. Detecta un estadi primerenc, amb lesions poc estructurades, i un estadi tardà, amb lesions organitzades i esfèriques que evolucionen cap a l'encapsulació, amb presència de miofibroblasts, així com calcificació / mineralització. En cas d'haver dos o més granulomes junts, a més, se'ls classifica com a coalescents (**Figura 7**).

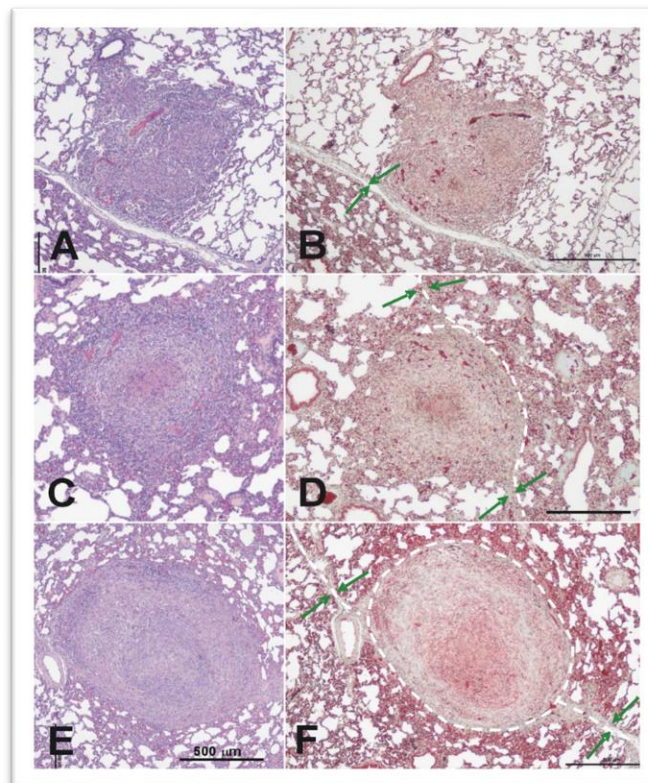


Figura 7. Imatges histològiques de la formació i maduració dels granulomes tuberculosos en minipig, extret de Gil et al. (2010)(72). A l'esquerra amb tinció d'hematoxilina-eosina i a la dreta amb tricròmic de Masson, usant magnificació x100. Els granulomes A-D es troben en la fase I, i els granulomes E-F en fase II. Les línies discontinuïques i les fletxes verdes mostren els septes interlobulillers.

L'anàlisi de Flynn et al. (2011) (52) proposa quatre subgrups, que impliquen diferents microambients immunes i bacterians, basats en un model experimental amb macacos: granuloma caseós, granuloma no-necrotitzant, granuloma necròtic neutrofílic i granuloma fibròtic. El granuloma caseós es considera el clàssic i poden calcificar-se, com a èxit de la resposta immune. Per un altre costat, també es poden subdividir en funció de la seva distribució: focals, agrupats i disseminats (basats en anatomia patològica).

Implicació dels fibroblasts i els septes interlobulillars pulmonars

Aquest mateix estudi de Olga Gil et al. (2010) (72) també planteja que l'encapsulació col·lagenitzada dels granulomes mitjançant fibroblasts o miofibroblasts sembla vinculada a l'estimulació dels septes interlobulillars adjacents; no s'hi aprecia clara influència de la pleura en l'estudi, però el seu disseny no està dirigit a la valoració pleural. En aquest punt cal destacar que els septes interlobulillars són estructures presents al parènquima pulmonar de mamífers grossos (77) i tenen una funció de xarxa estructural que permet mobilitzar el parènquima pulmonar amb la respiració i evitar el col·lapse alveolar amb la espiració; aquests septes són un teixit ric en teixit intersticial lax que conté fibroblasts. Per un altre costat, la pleura visceral està formada per diferents subcapes, la més interna de les quals és molt rica també en teixit connectiu lax i presenta per tant abundants fibroblasts (66,67,78).

1.1.5. Clínica, diagnòstic i tractament

Clínica

La tuberculosi mostra un ampli espectre de presentació, com a resultat de les diferents situacions a nivell microbiològic, immunitari, patogènic i clínic que mostren les persones infectades (79). Tanmateix, no tothom que s'exposa a la micobactèria queda infectat. La presentació clínica de la malaltia tuberculosa és variable, amb manifestacions sistèmiques i manifestacions a l'òrgan infectat, tot i que també pot ser asimptomàtica (10-20%) (34). Habitualment es presenta una clínica respiratòria associada a quadre general amb astènia, pèrdua de pes, febre vespertina i sudoració nocturna.

Afectació pulmonar. És la forma més freqüent i dona lloc a clínica d'infecció respiratòria, amb tos, expectoració i de vegades dolor pleurític. És característic que el quadre pneumònic sigui persistent si es fa tractament antibiòtic convencional. Els esputs hemoptòics o l'hemoptisi (habitualment *minor*) són un signe més específic de la malaltia tuberculosa pulmonar. Si l'afectació pulmonar és greu, pot donar lloc a dispnea i insuficiència respiratòria. També es poden afegir sobreinfeccions, especialment en cas de bronquièctasis o cavitacions pulmonars. És habitual trobar adenopaties

augmentades de mida i la limfadenitis cervical és una disseminació limfàtica locorregional usual (34,80).

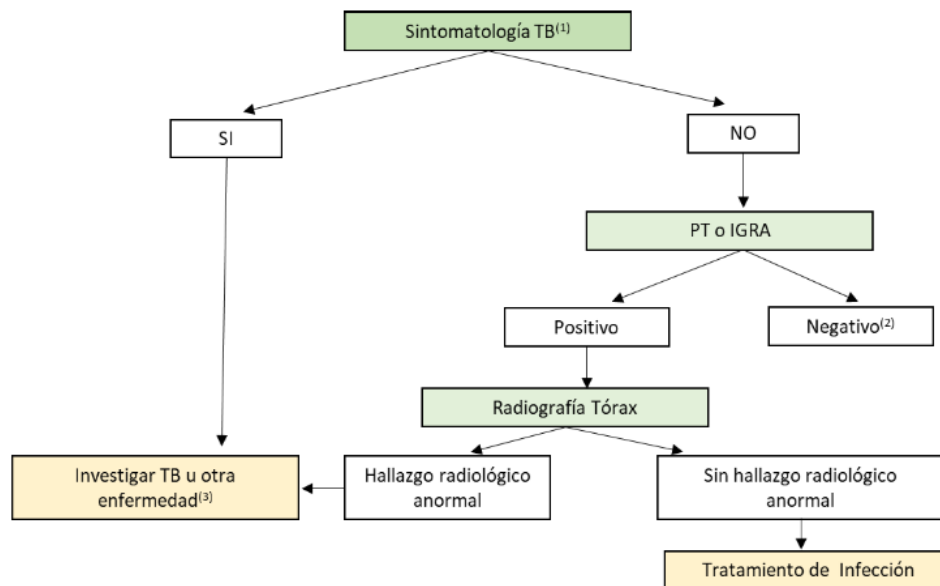
Afectació extrapulmonar. És una forma poc freqüent que acostuma a donar-se per disseminació hematògena (81–83) i la clínica es troba en relació amb l'òrgan afectat, que pot ser qualsevol. La disseminació més greu i destacable és al sistema nerviós central, on la meningitis (o leptomeningitis) tuberculosa està associada a una alta morbi-mortalitat i es desenvolupa amb major freqüència en els extrems de la vida (sobretot menors de 5 anys i en ancians) (84–86). La tuberculosi miliar és una forma extrema de disseminació hematògena en què es fa una sembra difusa amb formació de granulomes tuberculosos a tots els òrgans, també vinculat a alta morbi-mortalitat. Tanmateix, la infecció genitourinària és la forma més freqüent extrapulmonar i està descrit en el 2-8% de les persones amb malaltia tuberculosa (87–89). També són clàssiques les formes d'espondilitis (o mal de Mal de Pott, a la columna vertebral), d'ileïtis terminal i peritonitis tuberculosa.

En adults, la tuberculosi és freqüent que estigui associada a malalties debilitants, sobretot als països industrialitzats (com diabetis, cirrosi, insuficiència renal o neoplàsies), així com a malalties immunosupressores (típicament VIH). La infecció predomina en el sexe masculí sense que s'hagi identificat clarament la causa.

Diagnòstic

Sospita de tuberculosi. Davant la sospita de infecció (bé per clínica, bé per exposició o estudi de contactes), està indicat fer test cutani o bé uns IGRAs, i si és positiu, es realitza una radiografia de tòrax per valorar troballes de possible tuberculosi (activa o bé inactiva), així com un estudi microbiològic (**Figura 8**).

Els IGRAs (com el mètode *Quantiferon*), en contraposició al PPD, no positivitzen davant d'altres micobactèries ni amb la vacuna BCG. No obstant, cap de les dues proves no aporten informació sobre infecció recent o passada, ni tenen la capacitat de discriminar malaltia entre activa o latent. (90).



⁽¹⁾ Incluye hemoptisis, fiebre, escalofríos nocturnos, pérdida de peso, dolor torácico, dificultad respiratoria, fatiga. Se ofrecerá test VIH a criterio clínico. Se realizará radiografía de tórax siguiendo criterio clínico. ⁽²⁾ Repetir PT/IGRA a las 8 semanas tras el último contacto. Las personas no candidatas a tratamiento de ITL deben recibir información sobre la sintomatología y la importancia de buscar atención sanitaria si aparecen síntomas compatibles con TB. ⁽³⁾ Personas en las que descarte TB deben considerarse para recibir tratamiento ITL.

Fuente: Latent tuberculosis infection: updated and consolidated guidelines for programmatic management; WHO 2018³⁸.

Figura 8. Algoritme per diagnòstic de infecció tuberculosa latent i exclusió de tuberculosi en estudi de contactes en persones (excloent <5 anys, VIH+ i altres grups de risc). Extret de *Plan para la Prevención y Control de la Tuberculosis en España del Ministerio de Sanidad, 2019* (90).

Confirmació microbiològica. La presència de *M. tuberculosis* en mostres biològiques és diagnòstica de malaltia tuberculosa activa i es fa mitjançant la seva detecció directa i per cultiu. Aquests estudis, que permeten arribar al diagnòstic de certesa, han d'incloure bacil·loscòpia i cultiu, identificació del complex *M. tuberculosis*, així com un estudi de sensibilitat a fàrmacs, de soques resistents i de sensibilitat a fàrmacs de segona línia (90). Actualment, si està disponible, es recomana la detecció del DNA de *M. tuberculosis* amb tècnica de PCR, que és la forma més específica de diagnòstic.

El bacil de Koch es pot observar directament amb tincions d'auramina o bé es pot demostrar la seva presència en cultiu (que és sensible a partir de 10 bacils/ml, però pot trigar fins a 6 setmanes).

La bacil·loscòpia d'esput és una prova diagnòstica capaç de donar una confirmació ràpida (30 minuts), que alhora proporciona informació sobre el grau d'infectivitat, ja que es requereixen de 5000-10000 bacils/ml per a la seva detecció amb auramina. Si no s'aconsegueix esput, es pot recollir una mostra directament al pulmó, amb rentat bronquioloalveolar mitjançant fibrobroncoscòpia, o bé una mostra de secrecions gàstriques amb rentat gàstric mitjançant fibrogastroscòpia (típicament realitzat en pediatria); es basa en el fet que, durant la nit, les secrecions bronquials es degluteixen.

A més, si la tuberculosi afecta a seroses, com en la malaltia pleural, pericarditis i inclús peritonitis o meningitis tuberculosa, la detecció en mostra del líquid de la molècula adenosina deaminasa (coneguda com ADA) n'és altament suggestiu

Recentment, s'estan introduint noves eines diagnòstiques per detectar la infecció fent servir tècniques ràpides moleculars (91,92). En global, aquests mètodes permeten la identificació simultània de la *M. tuberculosis* i de mutacions associades als fàrmacs més habituals (especialment la rifampicina). Al nostre sistema sanitari ja s'està implantant el mètode *GeneXpert* en la pràctica clínica habitual, que inclou diagnòstic per DNA del bacil així com detecció de gens associats a resistència a la rifampicina.

També hi ha altres estudis, com la detecció del pèptid ESAT-6 en sang (93), lipoarabinomannan en orina (94) o identificació del bacil en esput amb altres mètodes, com un anàleg fluorogènic de la trehalosa (95).

Cal afegir que el diagnòstic de tuberculosi obliga a fer estudi de VIH, i a la inversa (90).

Tractament

Els fàrmacs antibiòtics són el tractament principal de la tuberculosi, que requereix pautes llargues i combinades per assegurar bones taxes de curació i per evitar la recaiguda i l'aparició d'infeccions resistents. A Catalunya, Espanya i la resta de països amb baixa incidència i baixa probabilitat de tuberculosi multi-resistent, la pauta més habitual de la malaltia tuberculosa activa és un règim de 6 mesos; els dos primers amb isoniazida, rifampicina i pirazinamida, i els quatre mesos següents amb isoniazida i rifampicina. La tuberculosi latent es tracta amb 9 mesos de isoniazida, i la

quimioprofilaxis primària (prevenció de la infecció davant d'una exposició de risc) es tracta amb 8-12 setmanes de isoniazida (90). Es deixen en segona línia antibiòtics més tòxics o menys efectius com l'estreptomicina, kanamicina, l'etionamida o la ciprofloxacina. (9,10,33,90).

Risc de recaiguda

Està present especialment durant els dos anys següents a la infecció o finalització del tractament, però decreix exponencialment fins a ser pràcticament inexistent a partir dels 10 anys (35,96,97).

A demés, recentment hi ha estudis que demostren que, en països d'alta endemicitat, una nova re-infecció tuberculosa (re-infecció exògena) pot arribar a ser més probable que la recaiguda per una malaltia prèvia, en base a l'anàlisi de les soques micobacterianes (97-100).

Classificació de la tuberculosi segons l'espectre d'infecció i malaltia

Donat l'ampli espectre de la infecció i malaltia tuberculosa, tot tenint en compte paràmetres epidemiològics, immunològics, radiològics i microbiològics, l'*American Thoracic Society* (ATS) ha creat una classificació pràctica basada en la seva patogènia i que s'utilitza mundialment (**Taula 1**). Tot i així, en el moment actual hi ha tendència a treballar sobre el binomi tuberculosi activa / latent, perquè és un model que permet fer una estratificació simple i àgil; no obstant, l'espectre de la infecció és més complexe i inclús amb més matisos dels que es recullen en la classificació de la ATS, com exposen Pai et al. (2016) (79) i Lin et al. (2018) (74).

Taula 1. Classificació de la tuberculosi, per l'*American Thoracic Society* (ATS)

Classe	Tipus	Clínica i Laboratori	Radiologia
0	No exposició No infectat	Sense història d'exposició tuberculosa Negatiu per test de Mantoux o IGRA	Sense evidència radiològica de malaltia
1	Exposició a tuberculosi No evidència d'infecció	Història d'exposició a tuberculosi Negatiu per test de Mantoux o IGRA (realitzats al menys 8-10 setmanes després de l'exposició)	Sense evidència radiològica de malaltia
2	Infecció per tuberculosi latent Sense malaltia tuberculosa	Positiu per test de Mantoux o IGRA Frotis, tests moleculars i cultius negatius Sense evidència clínica malaltia TB activa	Sense evidència radiològica de malaltia
3	TB clínicament activa	Cultiu positiu per <i>M. tuberculosis</i>	Evidència radiològica de malaltia tuberculosa activa
4	tuberculosi prèvia (inactiva)	Antecedents de malaltia tuberculosa Positiu per test de Mantoux o IGRA Frotis, tests moleculars i cultius negatius Sense evidència clínica de tuberculosi activa	Radiografia de tòrax patològica però troballes estables Sense evidència radiològica de malaltia activa
5	Sospita de tuberculosi	Signes i símptomes de tuberculosi, avaluació diagnòstica no completada	Troballes radiològiques variables

1.2. La vacuna antituberculosa

La vacunació és una de les estratègies essencials, si no la més important, per la prevenció de les malalties infeccioses. Es basa en l'assoliment d'una immunitat específica contra un patògen, tot exposant-ne el sistema immune a un preparat terapèutic que conté microorganismes morts o vius atenuats o bé antígens derivats d'agents patògens (adaptació a partir de les definicions aportades per la OMS i pel Centre de Terminologia de la Llengua Catalana).

La vacuna antituberculosa del *Bacille Calmette-Guerin*, altrament coneguda amb les sigles BCG, és una vacuna atenuada i la única aprovada contra la tuberculosi, amb més de cent anys d'història. Es va aconseguir el 1921 gràcies als esforços del metge i microbiòleg Albert Calmette i el seu assistent, el veterinari Camille Guérin (101–103), als laboratoris de l'Institut Pasteur a Lille. A dia d'avui, aquest vaccí és el més inoculat en tot el món (amb més de 4 bilions de dosis administrades), sobretot en nadons i especialment a partir de la Segona Guerra Mundial (104).

Continua sent una vacuna essencial en països amb alta endemicitat de tuberculosi, però ja no es recomana de forma universal en països amb baixa prevalença (que principalment són països d'ingressos alts) (105–107) doncs no queda ben establert el seu efecte protector en aquest cas i, a més, interfereix amb la prova de tuberculina cutània (si bé és cert que quedaria suplert amb una anàlisi de IGRA en sang).

1.2.1. Eficàcia de la BCG

Aquest vaccí és eficaç per la protecció contra les formes greus de tuberculosi majorment en la infància, però amb resultats dispars per la protecció de l'afectació pulmonar, sobretot en adults i amb variabilitat geogràfica (96,106,108–113). Tanmateix, ha demostrat protecció contra la mort per tuberculosi i la malaltia disseminada, evitant especialment les formes de meningitis infantil i la malaltia miliar (108). Més recentment, s'ha exposat que la BCG en humans protegeix contra les formes pulmonars i extrapulmonars de la tuberculosi com a mínim durant 10 anys, amb una decreixença posterior. La immunització millora quan la reben persones *naïve* (sense contacte previ amb tuberculosi, inclús d'altres micobactèries) (109,114).

Aquest fàrmac profilàctic ha estat motiu d'abundants estudis al llarg de la seva història, amb resultats que diferien i que li van atorgar una eficàcia controvertida així com polítiques d'aplicació diverses (106). L'exposició prèvia a micobactèries, que comporta una sensibilització a la tuberculina, així com la latitud i l'edat de vacunació, són els factors que expliquen en gran part les variacions observades en la seva eficàcia (109,114). Persisteixen qüestions sense resoldre que fan referència a la pròpia eficàcia, la duració de la protecció immune, l'edat òptima en què el vaccí ofereix millors resultats i la relació amb la latitud (109) així com altres aspectes relatius a la pauta exacta de vacunació, la via d'administració (tot i que existeix consens generalitzat a fer servir la via intradèrmica) i la soca o *strain* òptima de la BCG (111); no obstant, actualment no hi ha evidència que diferents soques expliquin la variabilitat (109,112).

1.2.2. La recerca continua: noves vacunes i diferents estratègies amb la BCG

És remarcable, i fins i tot sorprenent, que la centenària BCG desenvolupada amb les tècniques de la vacunologia primerenca, sigui l'única vacuna anti-tuberculosa licitada. Però, fins al moment, no hi ha hagut nous vaccins que hagin demostrat oferir millors resultats que la clàssica.

Tot i això, hi ha diferents candidats en diverses fases d'assajos clínics que poden tenir un futur prometedor (36,115–118); es pot seguir a través de la plataforma *TuBerculosis Vaccine Initiative* (coneguda com TBVI) i que mostra les noves candidates i fase de l'estudi, amb última actualització el octubre 2021, a www.tbvi.eu (119) (**Figura 9**).

Mentrestant, altres investigacions aposten per nous protocols amb la BCG, sobretot explorant vies alternatives d'administració, com inhalada (120), o bé pautes de revacunació (105,112,121).

Noves candidates de vacunes anti-tuberculosos

La vacuna ideal ha de poder prevenir la tuberculosi pulmonar (116,122) així com conferir protecció a individus que ja han estat infectats amb *M. tuberculosis* prèviament, actuar amb eficàcia i seguretat en persones VIH i facilitar les pautes de tractament de la malaltia (36,109) doncs aquests són els principals dèficits en la prevenció de la tuberculosi que permeten la perpetuació de la

cadena de transmissió i la generació de multirresistència, on s'acumula gran part de la morbi-mortalitat avui en dia.

Les noves candidates es categoritzen principalment en tres grups:

- **Vacunes de prevenció pre-exposició o *priming vaccines*.** Són administrades prèvia a la primera exposició al bacil de Koch i típicament es dona a nounats.
- **Vacunes de prevenció post-exposició o *boosting vaccines*.** Dirigides a adolescents i adults amb tuberculosi latent i també a pacients prèviament immunitzats amb BCG.
- **Vacunes terapèutiques.** S'administren juntament amb el tractament antimicobacterià, habitualment a persones amb major risc de recaiguda o bé per escurçar el temps de tractament (i millorar l'adhesió, tot afavorint la lluita contra la multirresistència).

Com a norma general, les vacunes de prevenció primària es basen en l'estat actiu de replicació i metabolisme del *M. tuberculosis*, mentre que les de prevenció post-exposició es basen en la seva fase dorment, doncs l'objectiu és conferir o incrementar la immunitat contra les formes de tuberculosi latent (36,116,117).

Es destaca la vacuna RUTI, ja que ha estat concebuda dins del marc la Universitat Autònoma de Barcelona amb l'equip liderat pel dr. Pere-Joan Cardona Iglesias des de la Unitat de Tuberculosi Experimental ubicada a la Fundació Institut Germans Trias i Pujol. Es tracta d'una vacuna terapèutica de tipus agent sencer inactiu, en fases IIa i IIb, que ha sigut concebuda per destruir els bacils no replicants de *M. tuberculosis*, i així millorar els resultats del tractament anti-tuberculós en pacients amb tuberculosi latent i que, per tant, permet escurçar la pauta antibiòtica (123–125) (**Figura 9**).

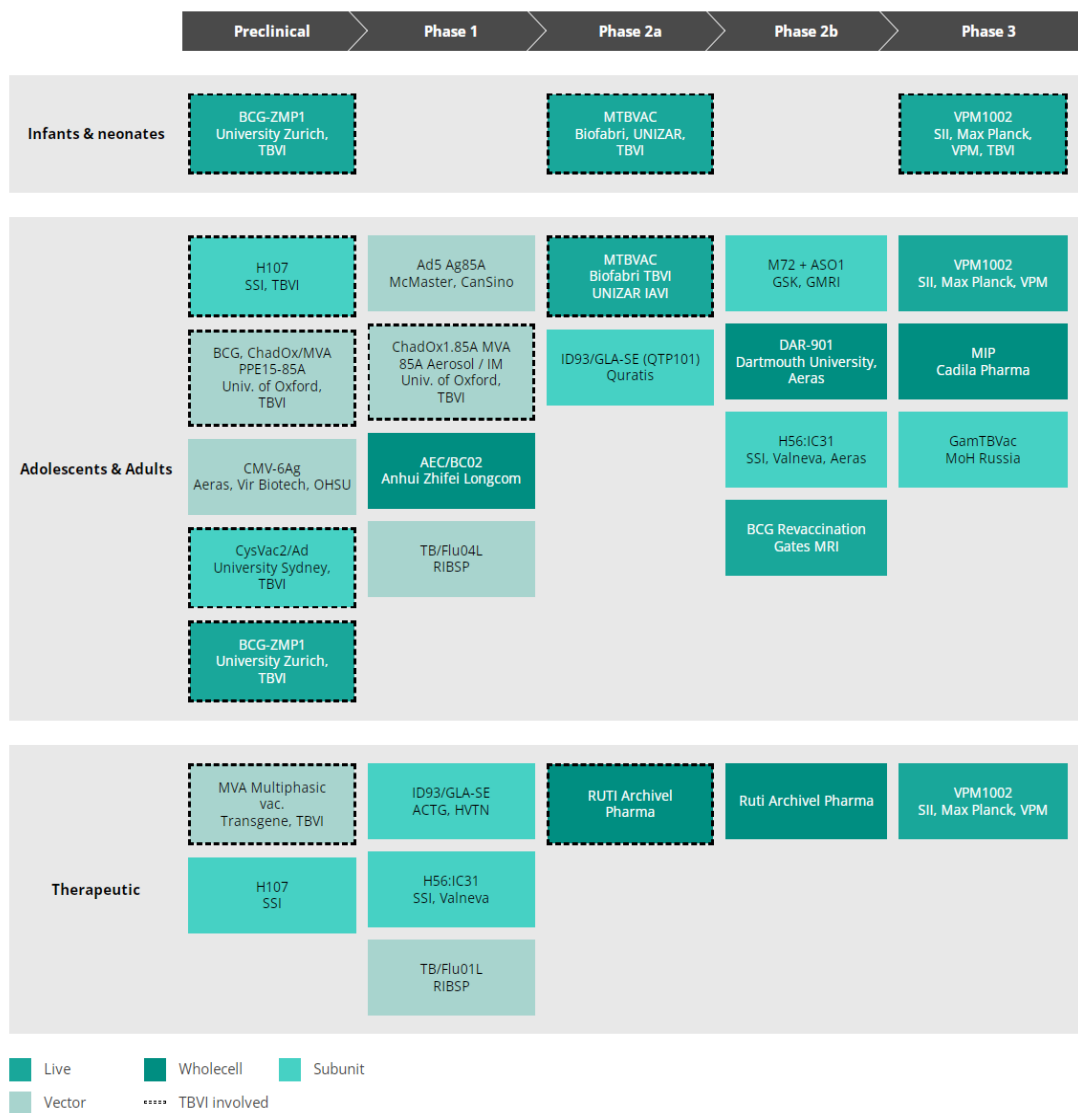


Figura 9. TB vaccine pipeline TBVI. Esquema de les principals candidates a vacuna tuberculosa publicada per TuBerculosis Vaccine Initiative (que es coneix com Pipeline of vaccines from TBVI), amb última revisió a octubre del 2021.

Noves rutes d'administració de la BCG

Paral·lelament, s'estan investigant adaptacions del protocol de la via d'administració de la BCG on diferents rutes de vacunació estan sent explorades, destacant-ne les que empenen la via respiratòria o local. De forma majoritària es troben en fases amb models animal (112,126,127).

Globalment es poden subdividir en rutes sistèmiques i en locals. Les sistèmiques inclouen les rutes cutània (com la intradèrmica estàndard), oral, sublingual i intravenosa. Les locals, o via mucosa, provoquen la immunització a través de la mucosa respiratòria i és la ruta alternativa que acumula l'experiència més àmplia i avançada pel profilàctic BCG; aquest grup inclou les vies intranasal i inhalatòria, i altres anomenades endobronquial o intrapulmonars. També hi ha estudis que les combinen, com el protocol SIM-BCG (128,129).

Se'n descriuen les principals variants de les rutes d'administració:

- **Percutània.** Hi ha estudis per donar-la percutàniament a través de petites puncions a la superfície de la pell. Publicacions sud-africanes (130,131) i sud-coreana (132) mostren que provoca una immunitat equivalent a la intradèrmica en humans.
- **Oral i sublingual.** Cal recordar que originalment a principis del segle XX la vacuna era per via oral, i d'aquí deriva la seva rellevància. S'ha investigat amb models animals com de conillet d'Índies (més conegut en investigació pel seu nom en anglès *guinea pig*) (133), model murí (134) i recentment inclús teixons (135) (que actuen com a reservori de tuberculosi en bestiar), on s'ha observat que és protectora. Una variant de l'administració oral és la via sublingual, que compta amb investigacions actuals amb ratolins (136).
- **Intravenosa.** Recentment s'ha reprès aquesta via d'administració, amb estudis que mostren eficàcia superior a l'administració intradèrmica i que inclús proposen un canvi de paradigma (137,138). Però aquesta via d'administració pot presentar disseminació per tot el cos i està en entredit la seva seguretat, i per un altre costat, l'administració intravenosa respecte intradèrmica la fa pràcticament inviable en la pràctica clínica diària i especialment en els països d'ingressos baixos.
- **Intranasal.** La ruta intranasal aposta per crear protecció utilitzant un petit sistema difusor que administra el preparat des dels narius o fosses nasals i que es distribueix, per inspiració profunda, per la mucosa de vies respiratòries i fins als pulmons (139), com ja s'assaja en profilàctics per d'altres malalties especialment per virus respiratoris en humans (en el context actual, són rellevants les noves candidates a vaccí intranasal per

SARS-CoV-2 (140)). També hi ha experiència en administració de BCG intranasal en ratolins (141–143). Aquesta ruta d'administració planteja reptes en seguretat, doncs ha provocat alguns efectes adversos de sistema nerviós com paràlisi facial transitòria en investigació amb vacuna de la grip (144–146).

- **Inhalada.** La vacuna inhalada (també anomenada aerosolitzada o nebulitzada) és primerament tractada en una màquina per aerolitzar-la en microgotetes i a continuació és respirada a través d'una mascareta facial d'anestèsia (que engloba nas i boca) durant un temps determinat. És la via no-intradèrmica que presenta més experiència i amb més estudis publicats, on sobresurten els treballs de model animal NHP amb macacos (120,138,144,147). Ja existien, però, publicacions d'entre finals dels anys 1960s i principis del 1970s amb macacos (148) i inclús amb humans (149). Aquesta ruta mostra bona efectivitat que és inclús superior en alguns aspectes a la intradèrmica, tot i que no sembla aportar especial protecció pulmonar. També hi ha publicacions que fan referència purament a la tècnica de nebulitzar la BCG (150,151).
- **Intratraqueal.** Hi ha experiències amb models animals amb bons resultats d'immunització (152) però és poc extrapolable als humans en la pràctica clínica diària (138).

Re-vacunacions o *boosters* amb BCG

Les propostes basades en re-vacunacions amb BCG no estan obtenint resultats clarament positius (112,121,141,153–156). Encara que alguns estudis previs havien apuntat la possibilitat d'una protecció adicional (155,157) i que en alguns països aquest *booster* està contemplat dins del calendari vacunal (105,106,121) des de 2017 la OMS no recomana dosis de repetició a les persones que ja han rebut una administració de BCG perquè segons l'evidència científica acumulada fins al moment, aquestes dosis extres no aporten majors beneficis (158). Per altra banda, s'ha demostrat que és una pràctica profilàctica segura (121). Malgrat això, aquesta via d'investigació no està abandonada i noves estratègies i meta-anàlisis estan en curs (141).

1.3. Diagnòstic per la imatge en tuberculosi

1.3.1. Mètodes d'imatge

El diagnòstic per la imatge ha estat i continua sent un dels puntals en l'avaluació dels pacients amb sospita i amb infecció pel bacil de Koch. La tuberculosi és motiu d'estudi per imatge des de la invenció de les primeres màquines de raig X aplicades a medicina, a principis del segle XX, (159,160) però àmpliament utilitzada després de la Segona Guerra Mundial. La introducció dels escàners TC va donar lloc a estudis volumètrics amb major definició dels detalls i, recentment, s'ha incorporat la PET-TC, que afegeix la valoració del nivell d'activitat inflamatòria a imatges adquirides amb TC.

Radiologia convencional. És fonamental en l'estudi per imatge de la tuberculosi, molt accessible i econòmica, i constitueix un dels pilars del cribratge, diagnòstic i seguiment de la malaltia (161). No obstant, és biplanar i té una sensibilitat i especificitat limitades (161–164). Actualment, estan ressorgint estratègies basades en radiografies convencionals de tòrax per aplicar índex (o *scores*) que permetin una classificació quantitativa, estratificació i monitorització simplificada de la tuberculosi, com l'índex *Timika X-Ray score* (165–167) o altres de nova validació (168). Per un altre costat, també s'estan implementant algorismes d'intel·ligència artificial per facilitar el diagnòstic de la malaltia (169,170).

Tomografia computada (TC). Aquest escàner és l'evolució de la radiografia convencional i aporta tridimensionalitat amb alta resolució espacial i detall anatòmic pulmonar. És una tecnologia d'adquisició ràpida, força accessible i més econòmica que la resta de mètodes d'imatge (exceptuant la radiologia convencional).

Tomografia per emissió de positrons – Tomografia computada (PET-TC). Aquest escàner ofereix informació híbrida superposant imatges anatòmiques de TC amb imatges metabòliques de PET, mitjançant l'ús de radiotraçadors, que habitualment és glucosa marcada amb isòtop de fluor (^{18}F -FDG (171–173). Les lesions de tuberculosi activa mostren avidesa per la glucosa (174–176), i es considera que aquest alt metabolisme identificat a la PET-TC es deu al cúmul de ^{18}F -FDG en neutròfils i macròfags (171,177,178); consegüentment, està assumit que les lesions tuberculososes inactives no mostren metabolisme glucídic (171,172,179–181). Tanmateix, amb relativa

freqüència es troba activitat metabòlica en lesions suposadament inactives o latents (182,183), i són pacients que mostren major taxa de recaiguda (74,172,184).

Ressonància magnètica (RM). No utilitza radiacions ionitzants sinó polsos d'ones electromagnètiques a dins d'un camp magnètic (185). No és un mètode amb bon rendiment per l'estudi de patologia pulmonar en la pràctica clínica diària, ja que és relativament poc accessible, no caracteritza l'aire ni el calci i és molt susceptible al moviment (com el respiratori i el cardíac). En el camp de la tuberculosi, la RM està relegada a casos puntuals (sobretot per evitar radiacions ionitzants) i a investigació (186,187).

1.3.2. Semiologia de la tuberculosi en estudis d'imatge

La semiologia radiològica de la tuberculosi està extensament exposada a la literatura (80,180,196–202,188–195). Les primeres descripcions de la tuberculosi per imatge feien referència a la radiografia convencional, que es van completar i detallar amb la incorporació de la TC. Cal recordar que ambdues tècniques utilitzen raigs X (radiació ionitzant) i la conformació de les imatges es basa en les diferents densitats radiològiques.

Afectació pulmonar

L'afectació pulmonar presenta un ampli rang de manifestacions radiològiques. Les **condensacions** o **consolidacions** pulmonars corresponen a focus de pneumònia necrotitzant granulomatosa que ocupa el parènquima pulmonar (sobretot, els sacs alveolars).

Són lesions dins del parènquima pulmonar que mostren densitat de parts toves amb marges mal definits i distribució habitualment peribroncovascular, unilateral o bilateral i en ocasions amb broncograma aeri. Poden ser de diverses mides, des de petites fins a consolidacions complertes lobars (189,194) (**Figura 10**).



Figura 10. Imatge de TC axial amb finestra de pulmó (humà). Condensació pulmonar tuberculosa que afecta els lòbuls superior i mig drets.

Els **nòduls** corresponen, histològicament, a agregats de granulomes o a petites lesions de pneumònia necrotitzant. A les imatges s'observa un focus de morfologia arrodonida i ben delimitat enmig del parènquima pulmonar, de densitat de parts toves o bé calci (en cas d'estar mineralitzat), que pot arribar fins als 3 cm (**Figura 11**). Està descrit que en la radiografia convencional es poden identificar nòduls pulmonars tuberculosos a partir de 10 mm (195) (inclús menors, si estan calcificats); la TC mostra una sensibilitat molt superior, on es poden identificar aproximadament a partir de 1-2 mm.

Els micronòduls, tot i que no està clarament especificat a la literatura, s'assumeix que són nòduls menors de 7 mm (188,189,194,203–205).



Figura 11. Imatge de TC axial amb finestra de pulmó (humà). Afectació tuberculosa activa amb nòdul pulmonar de major mida i micronòduls adjacents situats a la perifèria del segment posterior del lòbul superior dret. Micronòdul contralateral al segment superior del lòbul inferior esquerre en contacte amb la cissura.

La **cavitació** correspon a una radiolucència central en una lesió tuberculosa (**Figures 12 i 13**). Com major és el gruix de les parets a les lesions cavitades, major probabilitat de tuberculosi activa i / o major risc de recaiguda; la seva aparició en el sí d'un nòdul o condensació tuberculosa indica malaltia activa. Es descriu com una imatge central de densitat similar a l'aire (de -900 a -1000 unitats Hounsfield) envoltat per teixit de densitat de parts toves (que correspon a la condensació) (55,194).



Figura 12. Radiografia convencional toràcica amb projecció frontal postero-anterior (humà). Lesió cavitada de paret gruixuda a camp pulmonar mig dret i opacitats nodulars adjacents compatible amb tuberculosi activa.

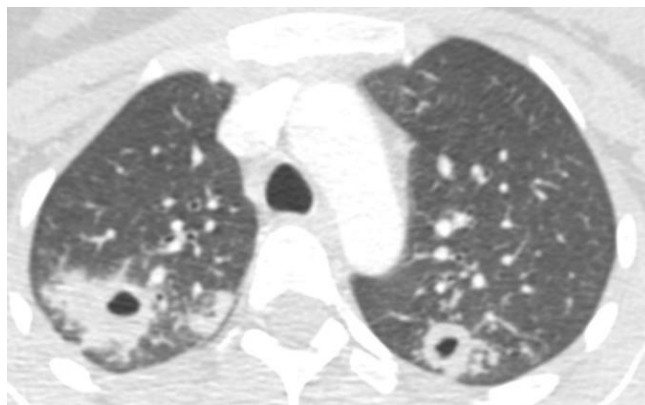


Figura 13. Imatge de TC axial amb finestra de pulmó (humà). Condensació dreta i nòdul esquerre que mostren cavitació central, situades a ambdós lòbuls superiors. Addicionalment s'observen micronòduls a la perifèries de les dues lesions.

Una altra forma diferent de malaltia activa és la tuberculosi **miliar (Figura 14)**, que consisteix en una afectació pulmonar deguda a disseminació hematògena del patògen. En aquest cas, s'identifica un patró granulat difús o intersticial micronodulillar bilateral, difús i simètric, on s'aprecien micronòduls de 1-3 mm (fins a 5-7 mm) de distribució aleatòria dins del parènquima pulmonar i que pot associar-se a altres troballes tuberculoses com petites condensacions. Es diu així per la seva similitud amb els grans de mill (que és un cereal rodó i de petita mida).

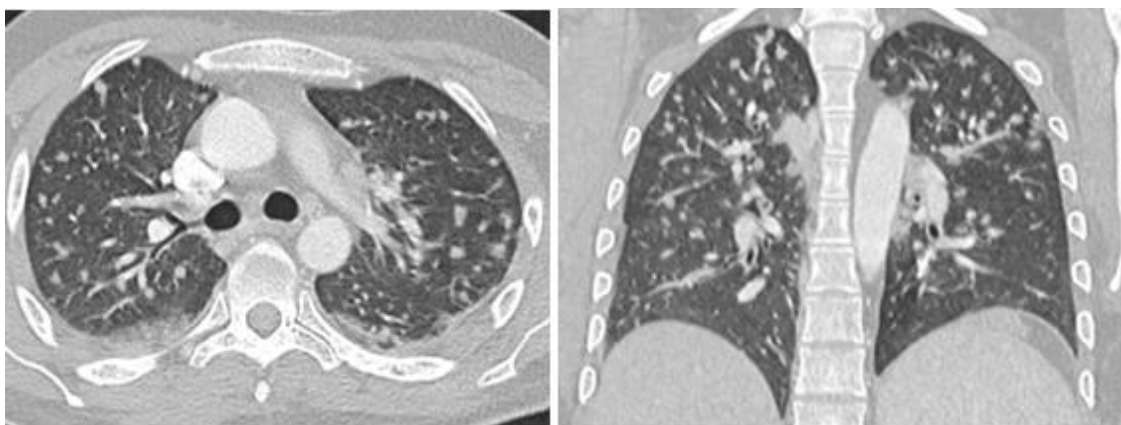


Figura 14. Imatges TC de tòrax en finestra de pulmó de la mateixa persona amb reconstruccions axial (esquerra) i coronal (dreta). S'hi identifiquen abundants micronòduls pulmonars sòlids bilaterals de distribució aleatòria en tuberculosi miliar.

Els focus de pneumònia en curació es retrauen i configuren tractes o bandes pulmonars irregulars i distorsió de l'arquitectura pulmonar, que s'associen a atelèctasis i pèrdua de volum pulmonar. També es poden observar petits focus apicals de consolidació pulmonar irregulars i pseudonodulars amb marcada irregularitat de la interfase pleuro-pulmonar, així com nòduls sòlids ben delimitats de diverses mides.

Aquest conjunt de lesions fibrocicatricials s'anomenen globalment **canvis fibronodulars**, tot i que aquest terme s'utilitza especialment quan l'afectació és als àpex pulmonars, i s'associen a tuberculosi latent o curada sobretot. Si els canvis fibronodulars conformen una cavitat apical, se l'anomena caverna, i presenta parets fines (no obstant, si són gruixudes o s'engrosseixen, cal valorar possible tuberculosi activa) (**Figura 15**).

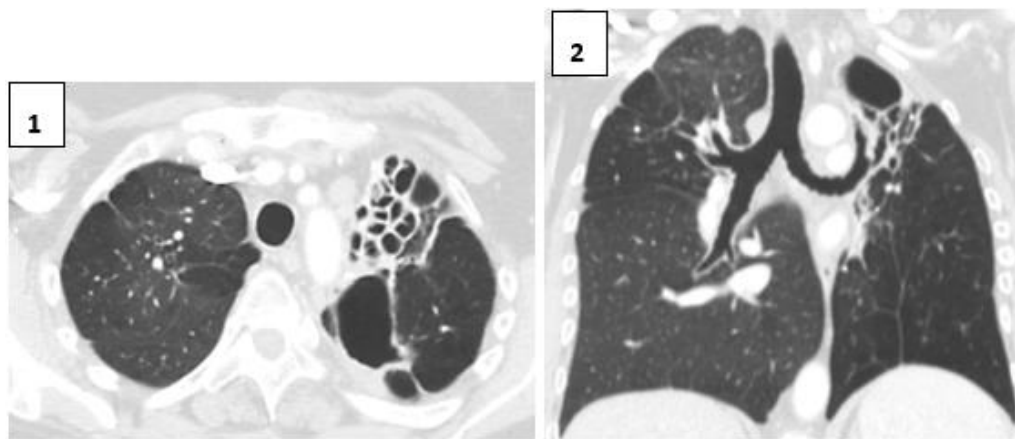


Figura 15. Imatge de TC axial (1) i coronal (2) amb finestra de pulmó (humà). Canvis fibronodulars tuberculosos de clar predomini a àpex pulmonar esquerre, on s'observen pèrdua de volum global pulmonar, caverna apical, bronquièctasis, distorsió de l'arquitectura pulmonar, alguns tractes irregulars i ocasionals micronòduls biapicals.

La curació i esterilització de les lesions pulmonars també es relaciona amb processos de mineralització o **calcificació**, que en general són d'aspecte groller. Així doncs, es poden observar nòduls de petita mida (habitualment menors de 10 mm) de densitat càlcica profusa, que són granulomes calcificats (**Figura 16**), i també canvis fibrocicatricials amb calcificacions irregulars (**Figura 17**). Cal destacar que les lesions que es troben densament calcificades s'associen a un risc

extremadament baix de reactivació (els bacils són destruïts a través de l'estrès hiperosmòtic generat per l'acumulació de calci).

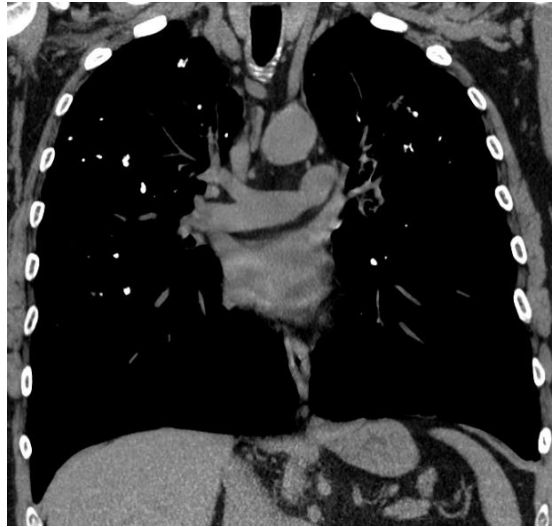


Figura 16. Imatge TC coronal amb finestra de mediastí (humà). S'observen múltiples micronòduls calcificats a ambdós camps pulmonars superiors i mitjos.

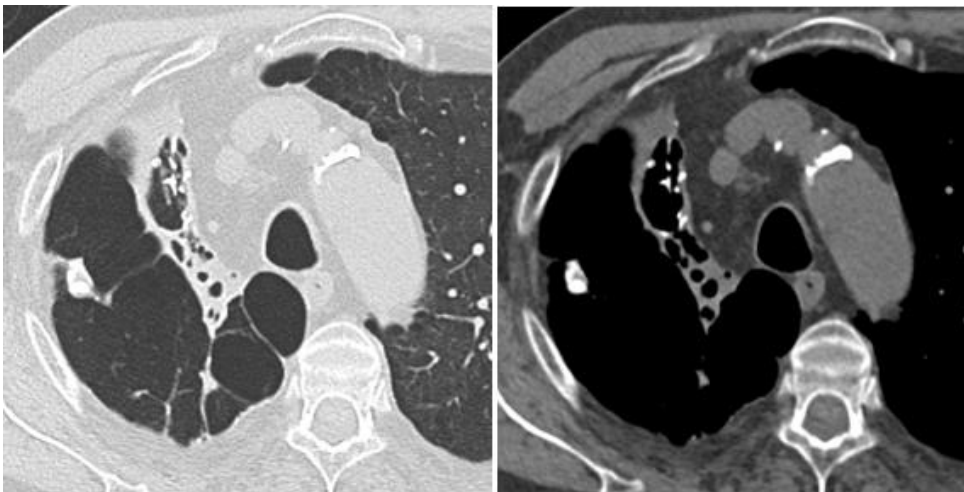


Figura 17. La mateixa imatge TC axial, una amb finestra de pulmó (dreta) i una altra amb finestra de mediastí (esquerra) en humà. Es mostra el lòbul superior dret on s'observen canvis fibronodulars amb bronquièctasis, distorsió de l'arquitectura pulmonar i tractes lineals irregulars. Destaquen abundants calcificacions nodulars gollerres de diverses mides que s'identifiquen amb major claredat amb la finestra de mediastí.

Afectació de la via aèria

L'afectació de via aèria en tuberculosi activa és típicament distal, amb inflamació de les parets i ocupació endobronquial per material infeccios i caseum, donant lloc en imatges TC al patró de "arbre en brot" (més conegut com "*tree-in-bud*" en anglès), en què s'observen micronodules peribronquials; és més evident si es fan reconstruccions de les imatges amb MIP (*maximum intensity projection*). Aquest patró se l'anomena així perquè recorda els brots de les fulles a les branques dels arbres durant la primavera (**Figura 18**).

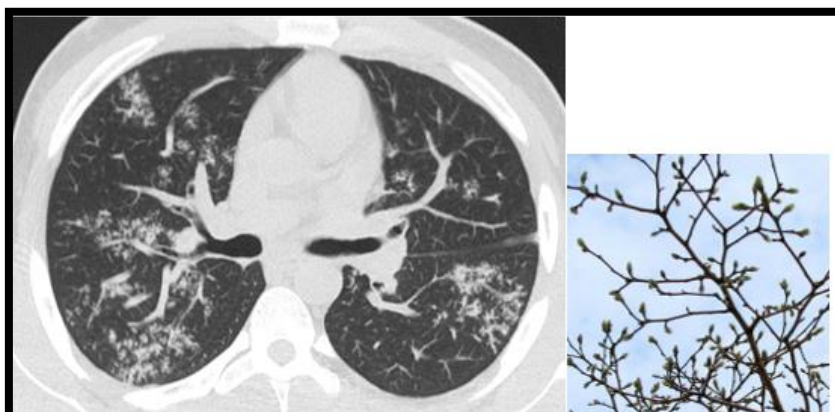


Figura 18. Imatge TC axial amb finestra de pulmó (humà). Múltiples focus bilaterals de "arbre en brot" que corresponen a pneumònia broncocèntrica. A la dreta es mostra un arbre en gemmació a la primavera, imatge que representa el signe de "arbre en brot".

Els processos de cronificació i de curació de la tuberculosi poden conduir a canvis seqüelars de la via aèria, que sovint es troben associats als canvis pulmonars fibronodulars.

Destaquen l'afectació de gran via aèria amb bronquièctasis irregulars (**Figura 19**), així com estenosis bronquials (degudes a canvis fibrosants post-inflamatoris a la paret, per compressió adenopàtica o inclús per bronquiòlit endoluminal) i poden donar lloc a atelèctasis cròniques si l'estenosi és una oclusió complerta. També es pot observar bronquiolitis obliterant post-infecciosa (**Figura 20**).

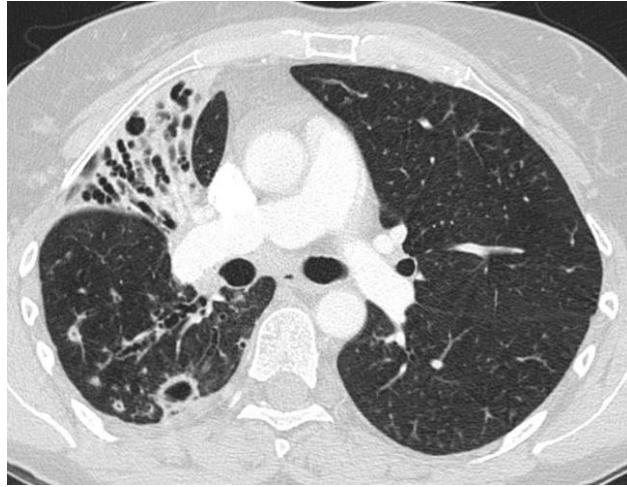


Figura 19. Imatge TC axial amb finestra de pulmó (humà). Extensa afectació tuberculosa al pulmó dret amb bronquièctasis per tracció sobretot al lòbul mig i nòduls cavitats al lòbul inferior dret.



Figura 20. Imatge TC sagital del pulmó dret (humà) amb finestra de pulmó. S'observa que el lòbul superior presenta una disminució difusa de la densitat i vasos globalment disminuïts de calibre, compatible amb atrapament aeri per bronquiolitis obliterant o síndrome de Swayer-James-McLeod d'origen post-tuberculós. Addicionalment s'identifiquen petits granulomes calcificats apicals.

Afectació adenopàtica

L'afectació adenopàtica característica de la tuberculosi activa és la presència d'adenopaties augmentades de mida hilar i mediastíniques, d'aproximadament 2-3 cm. En les radiografies de tòrax es mostren com engruiximent hilar de morfologia nodular i eixamplament mediastínic i en imatges TC s'observen adenopaties de centre hipodens i realç perifèric de contrast iodat (**Figura 21**). Les adenopaties cròniques o curades mostren mida normal o lleument incrementada que poden presentar calcificacions grolleres al seu interior (**Figura 22**).

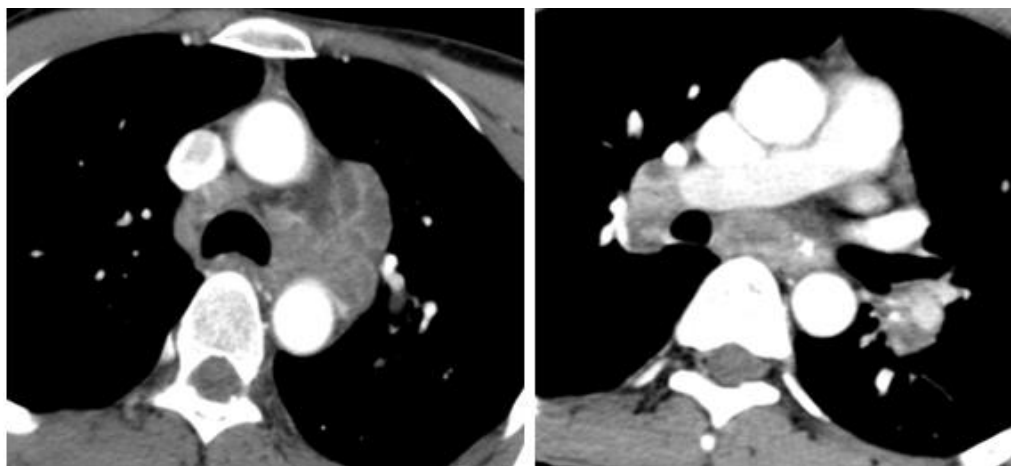


Figura 21. Imatge TC axial amb contrast endovenós en finestra de mediastí (mateixa persona), a nivell immediatament caudal a l'arc aòrtic (esquerra) i nivell subcarinal (dreta). S'observen múltiples adenopaties augmentades de mida que mostren centre hipodens i realç perifèric; a la primera imatge estan localitzades a regió paratraqueal esquerra i subaòrtiques amb ocupació de la finestra aorto-pulmonar i a la segona imatges se situen a regió subcarinal, hilars i lobars inferiors.



Figura 22. Imatge TC coronal amb finestra de mediastí (humà). S'observen algunes adenopaties grollerament calcificades a regió mediastínica subcarinal i hilar bilateral.

Afectació pleural

L'afectació pleural tuberculosa és excepcional en la infància. En adults es pot observar vessament pleural reactiu (no infecció) o bé empiema; aquest habitualment és de lleu a moderada quantitat i típicament presenta engruiximent difús de la pleura (**Figura 23**).

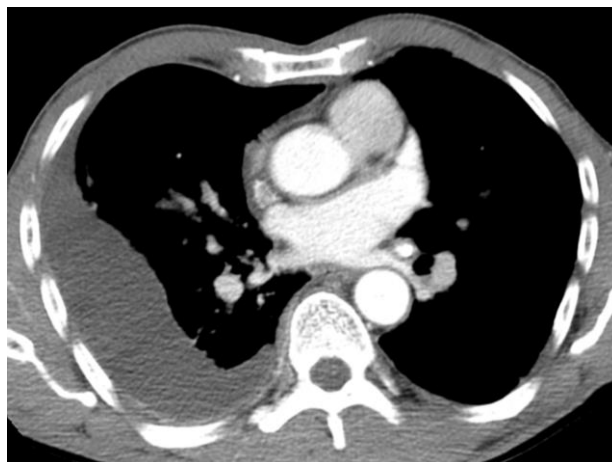


Figura 23. Imatge TC axial amb contrast endovenós en finestra de mediastí (humà). A l'hemitòrax dret s'objectiva vessament pleural de contingut homogeni amb interfase pleuropulmonar lobulada i lleu realç amb engruïment de les fulles pleurals, compatible amb empiema tuberculós.

L'empiema s'associa a intensos fenòmens inflamatoris que desemboquen amb freqüència en fistulitzacions. Destaquen la fístula broncopleural (**Figura 24**) i per un altre costat, la fístula pleuro-cutània, que si completa la comunicació amb l'exterior i es drena espontàniament, és anomenat *empiema necessitatis*.



Figura 24. Imatge TC coronal en finestra de pulmó (humà). Caverna tuberculosa biapical, amb demostració de fístula broncopleural esquerra.

La curació tendeix al col·lapse de l'espai pleural però pot quedar lleu vessament residual. És freqüent observar engruiximent pleural residual i habitualment es generen plaques calcificades grolleres pleurals (**Figura 25**).

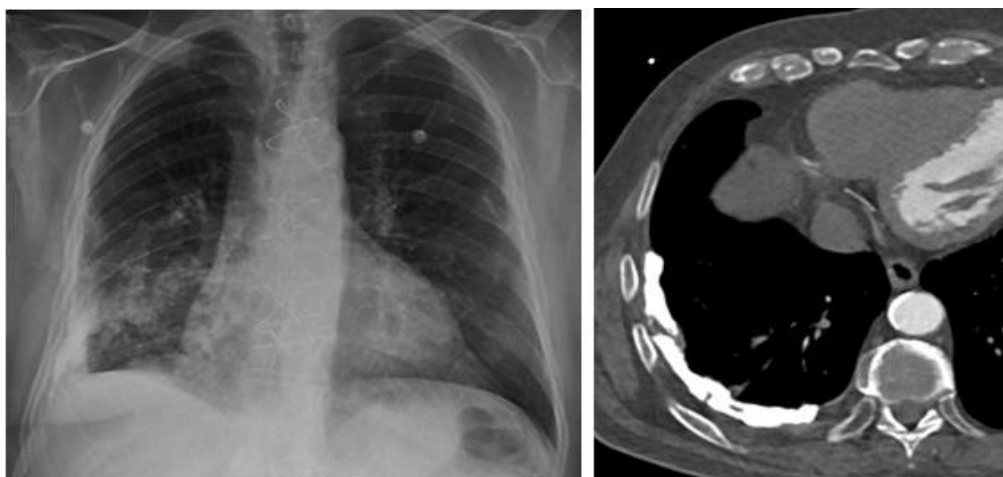


Figura 25. Radiografia de tòrax en projecció frontal postero-anterior (esquerra) i TC toràcic amb contrast endovenós a nivell de les bases pulmonars en finestra de mediastí (esquerra) del mateix pacient. S'observa extens engruiximent calcificat pleural basal dret compatible amb paquipleuritis calcificada post-tuberculosa.

Complicacions

Les complicacions de la tuberculosi pulmonar poden tenir lloc tant en fase activa com latent i les principals són l'hemoptisi i els micetomes.

El més freqüent és que es produeixi una hemoptisi *minor* (lleu i autolimitada) deguda a l'erosió inflamatòria d'una artèria bronquial o aberrant a les parets bronquials, que en cas requerir tractament, es practica una embolització arterial percutània. No obstant, també es pot donar el cas que l'erosió inflamatòria doni lloc a un pseudoaneurisme o ruptura continguda habitualment d'una artèria pulmonar (que s'anomena aneurisma de Rasmussen); si aquest es trenca, dona lloc a una hemoptisi massiva que posa francament en risc la vida del pacient (**Figura 26**).

Per un altre costat, pot tenir lloc una colonització d'espais intrapulmonars cavitaris post-tuberculosos, com les pròpies caverne apicals (**Figura 27**) o inclús de les bronquièctasis. Les caverne no acostumen a estar completament segellades, sinó que presenten comunicacions bronquials que permeten la seva ventilació i arribada d'espores de l'aire inhalat. Com que són lesions desvascularitzades sense efectivitat del sistema immune ni correcte drenatge bronquial, es poden desenvolupar boles de fongs, anomenades micetomes. Típicament es mobilitzen si es fa una TC en diferents posicions, ja que no estan ancorades.



Figura 26. Imatge TC axial adquirida amb contrast endovenós en finestra de mediastí. Extensa afectació tuberculosa dreta on destaca lesió nodular de densitat similar als vasos sanguinis compatible amb pseudoaneurisme pulmonar o de Rasmussen; va ser tractat amb embolització intraarterial percutània (no es mostra). A més s'observa extensa condensació pulmonar del lòbul inferior dret i lleu empiema pleural amb realç i engruiximent de les fulles pleurals tractat amb drenatge percutani.

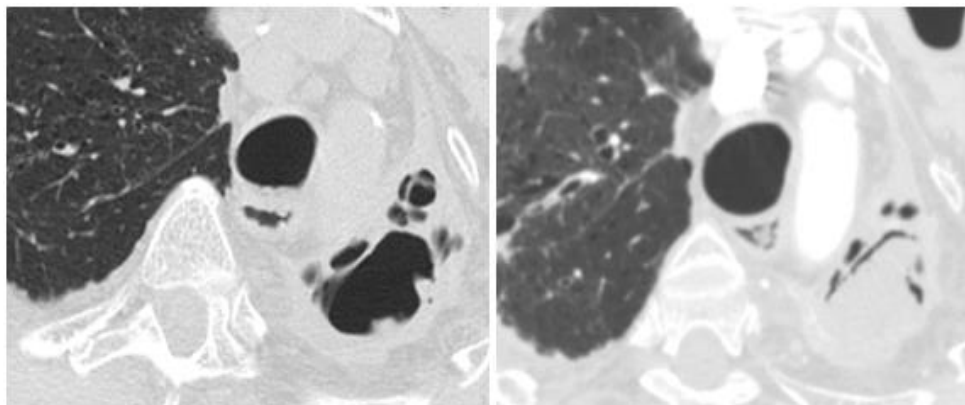


Figura 27. Imatge TC axial en finestra de pulmó al mateix nivell adquirits amb 12 mesos de diferència (humà). La imatge de l'esquerra mostra una caverna tuberculosa. A la imatge de la dreta, la cavitat es troba ocupada per material arrodonit que deixa una fina làmina de gas amb la paret de la caverna (signe de "la mitja lluna aèria") i és compatible amb micetoma.

1.4. Model experimental animal amb macacos

Existeix la necessitat de prosseguir les investigacions sobre tuberculosi que, de forma ideal, ens condueixin cap a la seva erradicació. Els nous estudis requereixen models animals experimentals ben caracteritzats i validats, on els macacos són primordials i principalment inclouen els genotips rhesus i cynomolgus.

Tot i que els models murins i suïns (amb conillet d'Índies i *minipig*) han estat àmpliament utilitzats en tuberculosi, les investigacions més rellevants són aquelles que es duen a terme amb models de primats no humans (NHP), doncs s'assemblen als humans en pràcticament tots els aspectes i presenten els mateixos patrons anatòmics i fisiològics. Els macacos són el principal model animal experimental dins dels NHP, i està ben documentat que manifesten la malaltia tuberculosa de forma anàloga als humans (206–208). De la mateixa manera, l'eficàcia que ofereixen la vacuna BCG i els fàrmacs anti-tuberculosos és similar a la observada en persones (207,209–212).

En la última dècada, ha aparegut un nou model animal NHP amb el tití comú (*Callithrix jacchus*), originari de Brasil, com exposa Via et al. (2013) (208). Són més petits i més fàcils de mantenir, però

les mostres obtingudes són també menors. S'ha de seguir investigant quin és el seu comportament experimental i validar-lo com a model animal si presenta avantatges sobre els macacos.

Paradoxalment, la tuberculosi en macacos salvatges (que no interaccionen amb humans ni activitat humana) seria excepcional (206,213–216).

1.4.1. Diferències entre macacos rhesus i cynomolgus

Rhesus (*Macaca mulatta*). Ha estat històricament el model experimental NHP més investigat, des de les dècades 1960-70's (148,217–220). Reprodueix robustament les lesions actives tuberculoses (210,211,221–225) i desenvolupa formes de malaltia activa progressiva i avançada en un període de temps assumiblement curt (de 8 a 9 setmanes). En estudis més recents, ha demostrat ser un model igualment vàlid per infecció asimptomàtica, però fent servir una soca menys virulenta amb inòcul de baixa dosi (226). És conegut que són significativament més susceptibles que els cynomolgus.

Cynomolgus (*Macaca fascicularis*). Va ser validat per Walsh et al. (1996) com a model per tuberculosi activa (igual que els rhesus), però a més, és un bon model per tuberculosi latent (227). Són capaços de contenir millor la progressió de la infecció, donant lloc en gran part a formes de tuberculosi lentament progressiva o inclús latent, amb limitació cap a la progressió de la malaltia activa (224,228,229), d'una forma més similar a la tuberculosi en humans del que mostren els rhesus. També s'observa que els cynomolgus mostren major grau de protecció que els rhesus en ésser immunitzats amb BCG (209,229).

Globalment s'estima que els humans fan 90% d'infecció latent versus 10% de malaltia activa (1,2); els cynomolgus, 60% d'infecció latent versus 40% de malaltia activa; finalment els rhesus, que presenten un comportament invers al descrit en humans, amb 10% d'infecció latent versus 90% de malaltia activa (210,223,228).

Genotips (o subespècies) de rhesus i cynomolgus

Per un altre costat, cal afegir que cada espècie té subespècies o genotips diferents. Habitualment es treballa amb rhesus d'origen indi i amb cynomolgus d'origen indonesi i el coneixement global del model amb macacos es basa en aquests genotips.

Estan apareixen noves investigacions amb rhesus d'origen xinès, amb un comportament equivalent al rhesus estàndard d'origen indi, que és el més freqüentment involucrat (128,230,231).

Tanmateix, les subespècies de cynomolgus mostren major diversitat. Els genotips indonesi i xinès mostren l'ampli espectre de tuberculosi ja descrit en aquest model macaco i són els més habituals. El genotip filipí també és similar a l'indonesi i el xinès (223,227). Per contra, el genotip mauricià (o *mauritian*, original de Illa Maurici) és més susceptible a la malaltia i presenta un curs equivalent als rhesus (187,222,223,225,232).

1.4.2. Infecció experimental amb *M. tuberculosis*

Imitar el procés d'infecció per tuberculosi tal i com ocorre de forma natural és un repte en els models d'experimentació animal que permet simular la malaltia en els laboratoris. Així doncs, la ruta d'infecció, la càrrega bacteriana de l'inòcul i la soca de micobactèria han de conduir a una infecció o malaltia suficient i mesurable, evitant situacions indetectables o al contrari, situacions amb malaltia desbordada que dificulti la seva avaluació o que, en el pitjor dels casos, obligui a eutanasiar prematurament un individu (207,210,211,223,224,228,233,234).

La infecció que es produeix en macacos utilitzant exposició a aerosol amb dosi d'inòcul ultra baixa ha demostrat que s'assembla molt a l'exposició naturalment succeïda, causa malaltia pulmonar que pot ser monitoritzada i permet la detecció de petites diferències entre fàrmacs (224,235).

La virulència de la malaltia desenvolupada és, però, multifactorial, i depèn de la conjunció entre el model animal emprat (més enllà dels NHP), la ruta d'infecció, la dosi d'inòcul i soca.

Ruta d'infecció

La infecció deliberada experimental amb la micobactèria es fa típicament per via aèria i els dos mètodes principals són la inhalació de l'inòcul aerosolitzat (o nebulitzat) i la instil·lació intrabronquial / intrapulmonar, usant un broncoscopi; la primera ruta simula millor el procés d'infecció natural però és més laboriós de crear i necessita maquinària específica (187,207,210,233). També estan descrites les rutes intranasal i intratraqueal i hi ha experiències amb infecció intravenosa en model amb ratolí, però amb menor eficàcia (236).

L'efecte de la infecció en termes clínics i del global de la malaltia són similars entre la via aerosol i la instil·lació amb broncoscopi, però difereixen clarament en l'afectació pulmonar, doncs via broncoscopi les lesions es troben localitzades i via aerosol les lesions es distribueixen difusament per tot els pulmons (233,237,238).

Soca de micobactèria tuberculosa

Les soques que s'utilitzen de forma estàndard als laboratoris per provocar la tuberculosi són la soca *Erdman* i la soca *H37Rv*, que són les que han donat lloc al coneixement experimental adquirit fins a dia d'avui, i se n'estan introduint de noves, com la CDC1551 i la HN878 (210,239). És conegut que diferents soques de la micobactèria poden mostrar virulències dispars en models animals no NPH; la soca *Erdman* és més virulenta en NHP i la CDC1551 seria menys agressiva, però no està clar i la resta de factors de la inoculació són també molt rellevants. Sí que hi ha consens en què *H37Rv* presenta la menor i acostuma a necessitar inòcul d'alta dosi per provocar malaltia activa (207).

1.4.3. Anatomia pulmonar dels macacos

Per l'anàlisi de la tuberculosi pulmonar mitjançant imatges de TC és rellevant remarcar les similituds i diferències entre humans i macacos a nivell anatòmic broncopulmonar, tot fent èmfasi en l'anatomia per imatge.

Els macacos, igual que els humans, presenten dos pulmons continguts dins de la pleura parietal (que està adherida a la caixa toràcica i al mediastí) i estan revestits per la pleura visceral. Cada un dels pulmons està compartimentat en lòbuls, que els separen les cissures pleural (provinents de invaginacions de la pleura visceral).

Els macacos tenen quatre lòbuls drets: superior, mig, inferior i infracardíac (que també se l'anomena lòbul accessori o àzigos); aquest últim no està present en humans, ocupa el recés àzigo-esofàgic (molt més prominent en macacos que en humans) i depèn d'un eix broncovascular originat entre el bronqui intermediari i el bronqui lobar inferior dret. El pulmó esquerre presenta tres lòbuls: superior, mig i inferior. El mig equival a la língula dels humans (240) **(Figures 28 i 29)**.

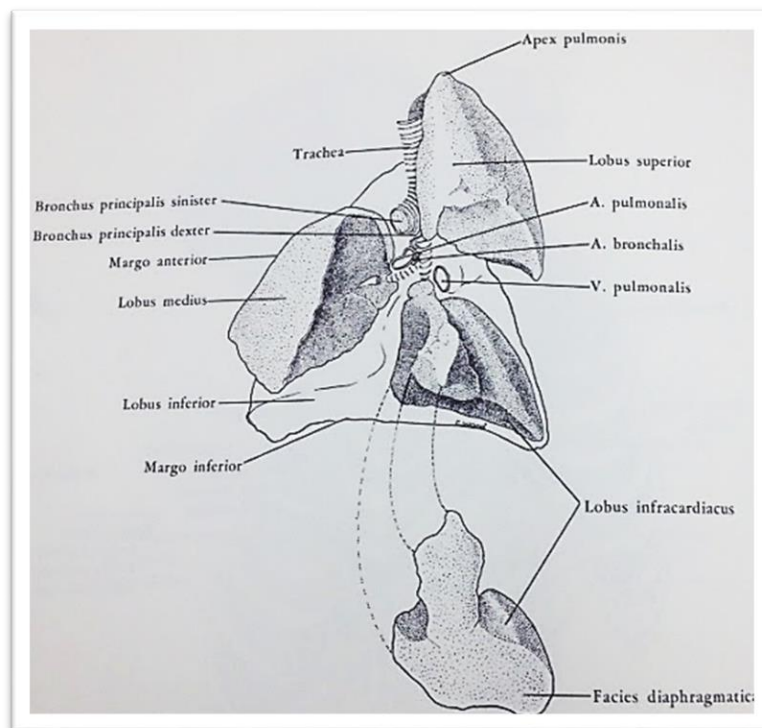


Figura 28. Esquema de l'anatomia del pulmó dret en *Macaca* espècie. Extret de *An Atlas of Primate Gross Anatomy* (240).

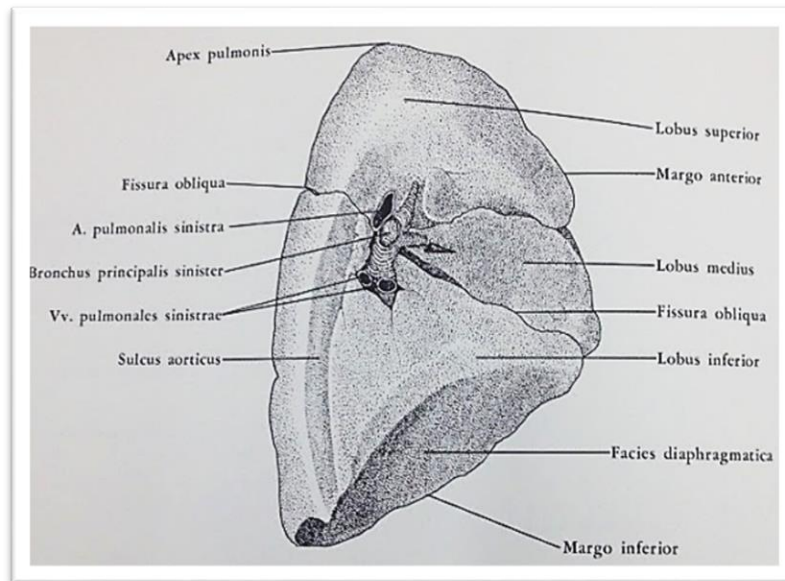


Figura 29. Esquema de l'anatomia del pulmó dret en *Macaca* espècie. Extret de *An Atlas of Primate Gross Anatomy* (240).

A nivell histològic, s'ha descrit que els macacos tenen menys interstici pulmonar; la pleura en humans és més gruixuda a expenses de la subcapa interna amb major quantitat de teixit connectiu lax, i a més a més, els macacos globalment no presenten septes interlobulillars (tot i que se'n troben en molt baixa quantitat) (77,241).

A més, el parènquima pulmonar està distribuït en funció dels eixos o beines broncovasculares i se'ls anomena segments broncopulmonars, que són equivalents entre humans i macacos (242–248). Aquesta segmentació està definida en humans i s'utilitza en la pràctica clínica diària; serveix per localitzar lesions o fer referència a la pròpia anatomia, en àrees com diagnòstic per la imatge, intervencionisme pulmonar (puncions dirigides i fibrobroncoscòpia) així com cirurgia toràcica o radioteràpia. Els segments broncopulmonars presenten la següent nomenclatura (**Figures 30**), que a més es vincula a una numeració estàndard:

- Al lòbul superior dret es troben els segments apical (1), posterior (2) i anterior (3).
- Al lòbul mig dret es troben els segments lateral (4) i medial (5).
- Al lòbul inferior dret es troben els segments superior (6), mediobasal (7), anterobasal (8), laterobasal (9) i posterobasal (10).

- Al lòbul superior esquerre es troben els segments apicoposterior (11-12), anterior (13), língula superior (14) i língula inferior (15).
- Al lòbul inferior esquerre es troben els segment superior (16), mediobasal (17), anterobasal (18), laterobasal (19) i posterobasal (20).

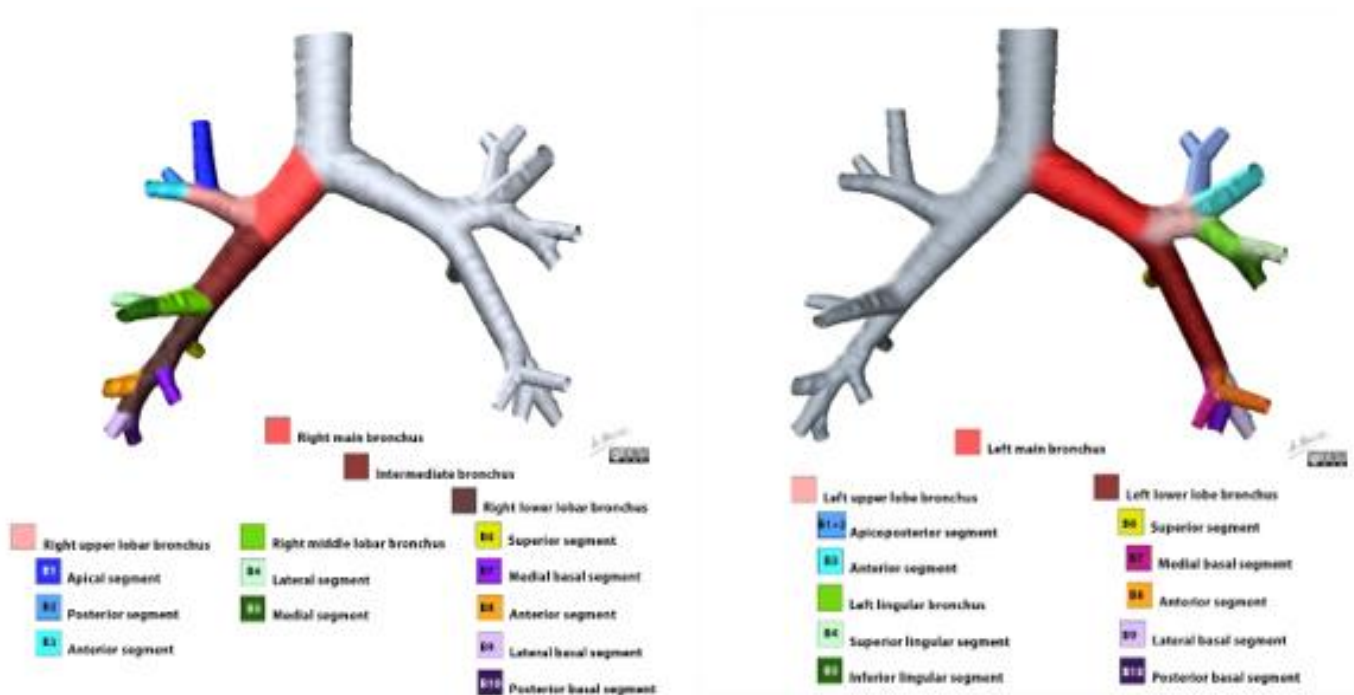


Figura 30. Esquema dels segments broncopulmonars representats en l'arbre bronquial (humà). Cortesia del Dr Matt Skalski, Radiopaedia.org, rID: 23285

En humans i la resta de mamífers grans, els segments broncopulmonars estan subdividits per septes de teixit connectiu anomenats septes interlobulillars, que delimiten els lobulets secundaris (**Figura 31**). Aquests últims corresponen a les unitats funcionals respiratòries i estan formades pels bronquis respiratoris i els sacs alveolars (66,67,242,249–251). Cal destacar que les imatges TC no tenen prou resolució per mostrar l'estructuració anatòmica pulmonar més enllà de les cissures i els eixos broncovasculars, amb la excepció de processos patològics en què queden engruixits els septes interlobulillars i llavors sí que són identificables per imatges de TC (249,250) (**Figura 32**).

Els macacos i mamífers de petita mida, per contra, no tenen septes interlobulillars i els manquen els lobulets secundaris (78,252).

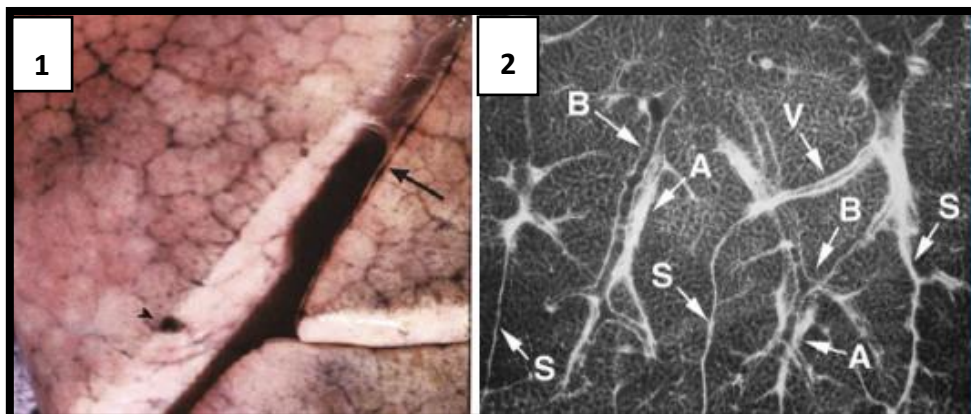


Figura 31. Septes interlobulillars en anatomia patològica macroscòpica de pulmons humans.

(1) Fotografia de la superfície externa de pulmó dret humà on s'identifiquen els lobulets secundaris per pigmentació antracòtica lineal dels septes interlobulillars (antecedent de tabaquisme). Fletxa negra: cissura major dreta. Extret de *Dail and Hammar's Pulmonary Pathology* (66). (2) Radiografia amb característiques d'alta resolució (mamografia) d'un tall laminar de 1mm de gruix provinent de teixit perifèric pulmonar. S'observen dos lobulets secundaris demarcats per septes interlobulillars (S) amb l'eix broncovascular central amb bronqui (B) i artèria pulmonar (A), així com vena (V) a la perifèria. Extret de R. Webb (2006) (250).

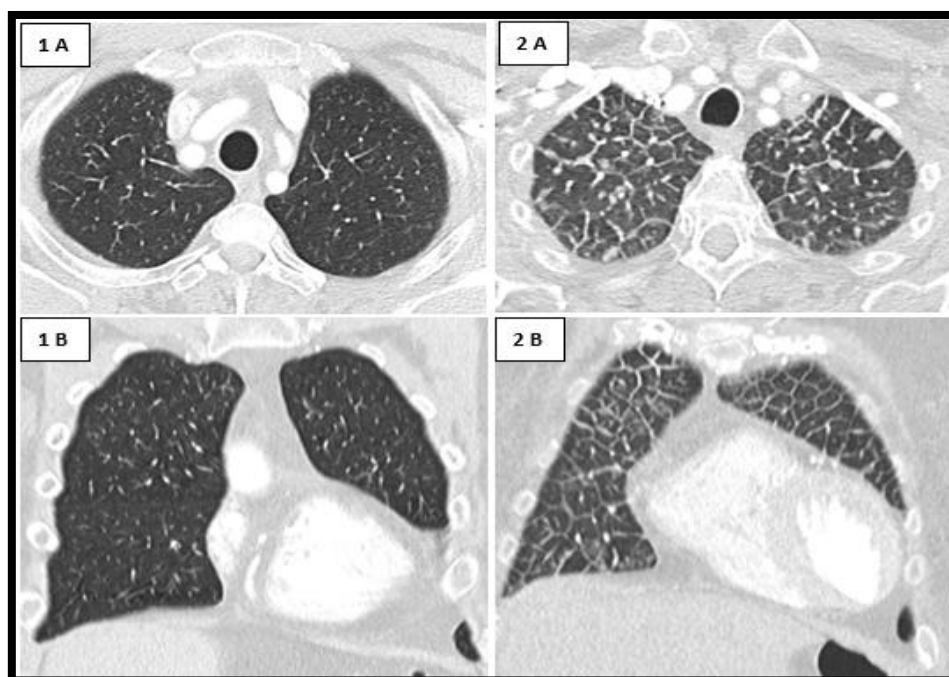


Figura 32. Septes interlobulillars en imatges TC de pulmons humans.

Imatges TC de tòrax en finestra de pulmó amb reconstruccions axials a nivell dels àpex pulmonars (A) i reconstruccions coronals a nivell anterior (B). El pacient (1) presenta parènquima pulmonar normal. El pacient (2) pateix insuficiència cardíaca amb edema intersticial i presenta parènquima pulmonar patològic amb engruiximent de septes interlobulillars tot delimitant-se els lobulets secundaris, i donant aspecte de pulmó "en xarxa" o "reticulat".

1.4.4. Diagnòstic per la imatge

Les radiografies convencionals de tòrax en estudis amb animals de petita mida (incloent macacos) habitualment es realitzen amb característiques tècniques de mamografia, ja que tenen major resolució i s'adapten millor al volum toràcic a estudiar.

És interessant destacar que l'adquisició d'una TC dura escassos segons (menys de 10 segons en un macaco). Tot i que no es pot realitzar amb l'individu despert donat que es mouria i perquè genera alt nivell d'estrès, es pot realitzar amb relativa facilitat i ràpidament amb l'animal sedat en procediments *in-vivo*. La PET-TC i la RM requereixen més temps d'adquisició i sedacions llargues.

Per un altre costat, la TC i la RM són tècniques vàlides per adquirir imatges *ex-vivo*, i s'utilitza especialment per l'estudi morfològic de pulmons extrets. Però s'ha de tenir en compte que no estaran ventilats ni plenament expandits, l'espai alveolar i la via aèria es trobaran ocupats per líquid conservant (com solucions de formol o agarosa) i, per contra, l'arbre vascular contindrà gas. Així doncs, la detecció i valoració de les lesions pulmonars es dificulta per la complexitat que pot suposar distingir parènquima pulmonar sa de lesions focals tuberculoses amb densitat de parts toves, sobretot en TC; per tant en aquest cas la RM és superior a la TC per la seva major capacitat de discriminar teixits tous. L'estudi *ex-vivo* no té cabuda en la PET-TC ja que no permet valoració metabòlica.

Les imatges TC toràciques de macacos mostren les mateixes lesions tuberculoses pulmonars que els humans, com ja s'ha exposat, però hi ha estudis que detallen particularitats, especialment en referència a les fases primerenques de la malaltia i la formació de lesions. Lin et al. (2013) descriuen que els nòduls (als que anomena granulomes en general) ja poden detectar-se per TC i PET-TC entre les setmanes 2 a 4 post-infecció i aquests mesuren 1-11 mm fins a la setmana 8. Destaca que només un 32% de les lesions pulmonars presenten mineralització o calcificació valorable per TC abans de la setmana 20. A més, també observa que no hi ha correlació entre el SUV mesurat a la PET-TC i el tipus de granuloma identificat en l'estudi histològic.

Altrament, s'han confeccionat escales de puntuació o *score systems* basats en troballes radiològiques per valorar i mesurar l'afectació pulmonar enfocat en models experimentals amb macacos. Inicialment es van fer amb estudis de radiologia convencional, però recentment s'han confeccionat amb les troballes per TC. Destaca el *score* proposat per Sharpe et al. (2018) on

globalment s'avaluen el nombre i mida de nòduls pulmonars, conglomeració de nòduls, cavitació, condensacions pulmonars, *tree-in-bud*, col·lapse lobar, així com afectació de via aèria, adenopaties i focus extra-pulmonars (253).

Per una altra banda, la PET-TC s'està implantant en estudis d'investigació amb models animals, com els treballs amb primats no humans (74,225,235,238,254,255).

1.4.5. Eficàcia de la BCG

Hi ha pocs estudis que se centrin en l'eficàcia de la BCG en models animals. Els estudis més recents s'enfoquen en l'avaluació del nivell de protecció que ofereixen les rutes alternatives d'administració o bé s'emmarquen en el desenvolupament de noves vacunes i una part d'aquests inclouen una anàlisi pulmonar amb tècniques d'imatge tridimensional (és a dir, més enllà de la radiografia toràcica). Si bé les publicacions es concentren en NHP, també hi ha experiències amb d'altres models animals com els *minipigs*, tal i com s'exposa en l'estudi de Bechini (2017) (256), on s'analitzen candidates a vacunes anti-tuberculosi utilitzant imatge de TC.

Destaca l'àmplia variació de protecció que ofereix la BCG en humans, tot i que globalment presenta un efecte protector alt en cynomolgus i baix en rhesus (209). No hi ha prou evidència científica que resolgui si la BCG administrada per via respiratòria ofereix major protecció pulmonar, tot i que sembla oferir protecció com a mínim equivalent a la administració intradèrmica (120,128). A més, els estudis d'eficàcia de la BCG per via intravenosa han mostrat bons resultats inclús superiors a la BCG intradèrmica; tanmateix, és poc aplicable en la pràctica clínica diària.

Cal remarcar que dins de l'interès creixent per desenvolupar noves vacunes, el model NHP és de rellevància cabdal i s'utilitza la BCG com a *gold standard* en els controls positius (o "la vacuna a batre"). Però la variabilitat en la resposta del vaccí centenari pot ser un problema, ja que pot actuar com a potencial factor de confusió (120,128).

Langermans et al. (2001) (209). Es compara l'eficàcia de la vacuna BCG intradèrmica entre macacos rhesus i macacos cynomolgus. S'exposa que la vacuna protegeix pràcticament del tot els cynomolgus, prevenint l'avanç de la progressió; en els cynomolgus vacunats hi ha menys del 5% de volum pulmonar afectat, no s'hi troba necrosi i no hi ha disseminació a d'altres òrgans. Contràriament, el model de rhesus no mostra protecció eficaç contra la malaltia, i a nivell pulmonar, no hi ha diferències rellevants entre rhesus vacunats i no vacunats. No s'utilitzen tècniques d'imatge diagnòstica (ni radiografia convencional).

Sharpe et al. (2016) (138). Valora la protecció que ofereix la vacuna BCG per diferents rutes d'administració (intradèrmica, intravenosa i mucosa endotraqueal) en rhesus. Analitzen els pulmons *ex-vivo* amb RM, tot realitzant una quantificació de la tuberculosi i es conclou que la vacuna BCG intradèrmica redueix la gravetat de la malaltia i que aquest efecte pot ser millorat per revacunació mucosa (endotraqueal) o per vacunació sistèmica intravenosa, però són dues rutes d'administració amb dificultats per l'aplicació clínica.

DiFazio et al. (2016) (255). Valora l'eficàcia de la BCG i una nova candidata de vacuna (subunitat H56) amb cynomolgus en un projecte que té per objectiu final la identificació de nous marcadors d'efectivitat. Entre d'altres paràmetres, utilitza la PET-TC i determinen l'afectació global pulmonar tot mesurant l'avidesa de FDG. Conclou que la vacuna BCG/H56 evita la disseminació però no prevé la infecció, i que el nombre d'adenopaties mediastíniques estèrils és molt més alta en vacunats que en el grup control.

Verreck et al. (2017) (128). Valora l'assoliment de protecció amb BCG parenteral i pulmonar en macacos rhesus. Aquest estudi vacuna amb el protocol SIM-BCG, que combina una dosi intradèrmica i una altra intrapulmonar instil·lada amb broncoscopi. Confirma que els rhesus mostren immunització amb la vacuna per via respiratòria, exposant que aquesta BCG administrada localment redueix l'afectació pulmonar en macacos no immunitzats amb BCG intradèrmica. Inclús obtenen dades que mostren disminució de la gravetat de malaltia i protecció pulmonar que no observen en els macacos amb BCG intradèrmica estàndard. No s'utilitzen tècniques d'imatge diagnòstica (ni radiografia convencional).

White et al. (2020) (120). Valora l'eficàcia de la BCG inhalada en model de macacos rhesus, comparant un grup vacunat amb BCG intradèrmica i un altre via inhalada. S'analitzen imatges TC i s'aplica el sistema *score* proposat per Sharpe et al. (253). Conclouen que la protecció oferta per

via respiratòria és igual d'efectiva que la via sistèmica i en alguns aspectes extrapulmonars sembla conferir major protecció inclús. Així doncs, no observen els mateixos resultats que Verreck et al 2017 (en què sembla que podria existir superioritat de la BCG per via respiratòria en el control de la malaltia tuberculosa pulmonar), però s'ha de remarcar que les formes de vacunació són diferents i també ho són alguns dels paràmetres emprats per valorar la quantitat de malaltia.

Darrah et al. (2020) (137). Valora diferents rutes d'administració de BCG en rhesus amb l'objectiu principal d'avaluar la protecció que ofereix la via sistèmica intravenosa. S'avaluen escàners PET-TC i valoren l'afectació global pulmonar tot mesurant l'avidesa de FDG i també fan un recompte de les lesions. Conclou que l'administració intravenosa de la BCG millora la protecció que ofereix la via intradèrmica i la aèria (mucosa), tot plantejant que pot arribar a significar un canvi de paradigma en el camp de la vacuna antituberculosa.

Sibley et al. (2021) (229). Valora l'eficàcia de la BCG intradèrmica en cynomolgus de genotip xinès infectats amb inòcul aerosolitzat d'alta dosi de *M. tuberculosis*. S'analitzen els pulmons *ex-vivo* amb RM, fent una quantificació de la càrrega de malaltia tuberculosa. Observa que tots els animals vacunats controlen la malaltia i la BCG els aporta un nivell consistent de protecció pulmonar, amb reducció significativa de l'afectació pulmonar respecte el grup control. A més, descriu que en aquest grup de no vacunats, la meitat desenvolupa malaltia progressiva i l'altra meitat és capaç de controlar intrínsecament la tuberculosi. Proposa que és un model vàlid per testejar estratègies per exposicions post-vacunació i avaluació de tractament.

En conclusió, la tuberculosi és una malaltia que acompanya la humanitat des dels seus inicis i a dia d'avui continua sent un dels principals problemes de salut mundial. Tot i el desenvolupament d'eines diagnòstiques, profilàctiques i terapèutiques (especialment durant la primera meitat del segle XX), encara no s'ha arribat al seu control ni erradicació a pesar de ser un objectiu específic de la OMS. El seu tret distintiu és la formació de granulomes necrotitzants, a nivell histològic. Cal destacar la vacuna BCG, l'únic vaccí anti-tuberculós licitat, que ha permès un control de les formes més greus de la malaltia però ofereix una protecció variable dels pulmons.

Dins del marc del diagnòstic per la imatge, està ben establerta la semiologia radiològica tuberculosa, on les condensacions i els nòduls pulmonars, així com la cavitació i l'afectació de petita via aèria (amb patró de "arbre en brot") estan vinculats a tuberculosi activa i progressió de la malaltia; per contra, les calcificacions i les lesions cicatricials representen l'espectre de latència i de curació.

La recerca translacional és la clau per aconseguir la comprensió profunda de la tuberculosi i desxifrar aquells elements de la infecció que encara són obscurs, tot prenent especial rellevància els models experimentals animals amb primats no humans, que han de conduir els nous avanços científics cap a l'aplicació clínica humana. El model de tuberculosi experimental amb macacos està ben establert i validat, i es coneix l'espectre de malaltia que es desenvolupa així com l'efecte de la vacuna BCG. Alguns dels estudis, a més, obtenen imatges de TC com a mètode d'anàlisi pulmonar, principalment per avaluar la distribució i característiques de les lesions, així com per quantificar la càrrega tuberculosa.

Tanmateix, es percep una mancança d'anàlisi a major detall o profunditat de les imatges TC als estudis experimentals amb macacos. Aquesta podria aportar la detecció de nous patrons radiològics capaços de discernir i identificar precoçment diferents desenllaços tuberculosos, que tindria aplicacions en estudis comparatius per l'avaluació de diferents estratègies profilàctiques i terapèutiques. Per tant, podria aparèixer una nova eina per l'avaluació de vacunes candidates novells.

2. HIPÒTESI

L'avaluació de la tuberculosi pulmonar mitjançant tomografia computada permet identificar patrons de contenció o progressió de la malaltia en un model experimental amb macacos.

3. OBJECTIUS

3.1. Objectiu principal

Identificar patrons de distribució de la malaltia tuberculosa pulmonar en imatges de TC.

3.2. Objectius secundaris

- Avaluar l'efecte de la vacuna Bacille Calmette-Guérin (BCG) en un model experimental animal amb macacos dels genotips rhesus i cynomolgus.
- Objectivar l'impacte de la pleura per la contenció de la tuberculosi pulmonar en macacos.

4. MATERIAL I MÈTODES

4.1. Disseny general

Es tracta d'un treball que analitza les lesions tuberculosos pulmonars en una seqüència temporal mitjançant imatges de TC procedents d'estudis experimentals en model animal amb macacos, on es provoca deliberadament una infecció per *Mycobacterium tuberculosis* i en alguns casos s'administra prèviament la vacuna BCG bé intradèrmica o bé inhalada.

4.2. Material

Es disposa de 123 escàners TC de tòrax aportats per la doctora Sally A. Sharpe i l'equip d'investigació que lidera al *UK Health Security Agency, Porton Down, Salisbury SP4 0JG, United Kingdom*. Corresponen a imatges obtingudes a macacos de dos genotips diferents i infectats amb bacil de Koch, amb dades publicades a Sharpe et al. (2016) (224), White et al. (2020) (120) i White et al. (2021) (232).

4.2.1. Animals experimentals

Descripció i procedència dels macacos

El conjunt d'animals està format per 35 macacos de 3-4 anys, per un costat 13 macacos de l'espècie cynomolgus (*Macaca fascicularis*) de genotip indonesi, i per un altre costat 22 macacos de l'espècie rhesus (*Macaca mulatta*) de genotip indi, que no han estat destinats a cap altre estudi amb antelació. Els macacos són sans i no han estat en contacte ni infectats per micobactèries, fet que es demostra amb test cutani de tuberculina i detecció de interferó gamma (IFN- γ).

Procedeixen de colònies de cria establertes a Anglaterra. Estan instal·lats en gàbies grans amb obertures que permeten alt nivell d'observació i amb ampli ventall d'estimulació ambiental, són

alimentats amb dieta rica i variada i conviuen en grups socials compatibles, tal i com s'estipula a la *Home Office (UK)* i a les guies NC3Rs. El disseny dels estudis i les intervencions o processos que se'ls realitza han estat aprovats pel *Establishment Animal Welfare and Ethical Review Committee*, i l'organisme *UK Home Office* ha expedit la llicència del projecte.

Vacunació amb BCG

Inicialment, 14 macacos són vacunats amb BCG (Danish strain 1331; SSI, Copenhagen, Denmark) 21 setmanes abans de ser infectats per *Mycobacterium tuberculosis*. S'administra per via intradèrmica (que és la ruta estàndard) o bé per via inhalada. La vacunació intradèrmica s'injecta a l'extremitat superior esquerra i la vacunació inhalada és respirada a través d'una mascareta quirúrgica des d'un nebulitzador, on s'ha aerosolitzat el fàrmac profilàctic. La dosi administrada de la vacuna és l'equivalent a l'estàndard adult intradèrmic, tot tenint en compte les pèrdues esperables dins de la pròpia maquinària (120,224,232).

Així doncs, dels 35 individus se'n vacunen 3 cynomolgus per via intradèrmica, 5 rhesus per via intradèrmica i 6 rhesus per via inhalada.

Infecció experimental amb *Mycobacterium tuberculosis*

Tots els macacos són infectats experimentalment amb *Mycobacterium tuberculosis* (Erdman strain K 01; BEI Resources) i es fa per via inhalatòria a través de l'exposició a aerosols, que contenen dosis d'inòculs ultra baixes. Resumidament, i segons la tècnica exposada per Sharpe et al. (2016) (224,234,257), s'utilitza un nebulitzador que genera aerosols amb *M. tuberculosis* en suspensió, a una concentració predeterminada i que són inhalats gràcies a una mascareta d'anestèsia. Els càlculs de la dosi ultra baixa d'inòcul és la que prediu una dosi de retenció (és a dir, el número d'organismes que s'assumeix que queden retinguts als pulmons) d'aproximadament 5 bacils viables (138,187,224,234).

D'aquesta forma, es genera una infecció que simula la que ocorre de forma natural per inhalació de microgotes (aerosols) infeccioses procedents de secrecions respiratòries o salivals.

En el present estudi es considera que la setmana d'aquesta inoculació correspon a la setmana 0 o inici de l'experiment. D'aquesta manera, la referència cronològica que es fa servir per denominar les diferents adquisicions de escàners de TC al llarg de l'estudi pren el moment de la infecció com el punt d'origen (i no pas del moment de la vacunació).

4.2.2. Imatges de TC

Obtenció dels escàners TC

S'obtenen un total 123 escàners procedents dels 35 macacos estudiats, a cadascun dels quals se'ls han practicat 3 o 4 escàners durant el període post-infecció, tal i com s'exposa a Sharpe et al. (2016) (224), White et al. (2020) (120) i White et al. (2021) (232). El primer escàner s'adquireix constantment a la setmana 3 i la resta són variables però estables per cada estudi, amb una separació de 4, 5 o 6 setmanes entre escàners consecutius (**Figura 33**).

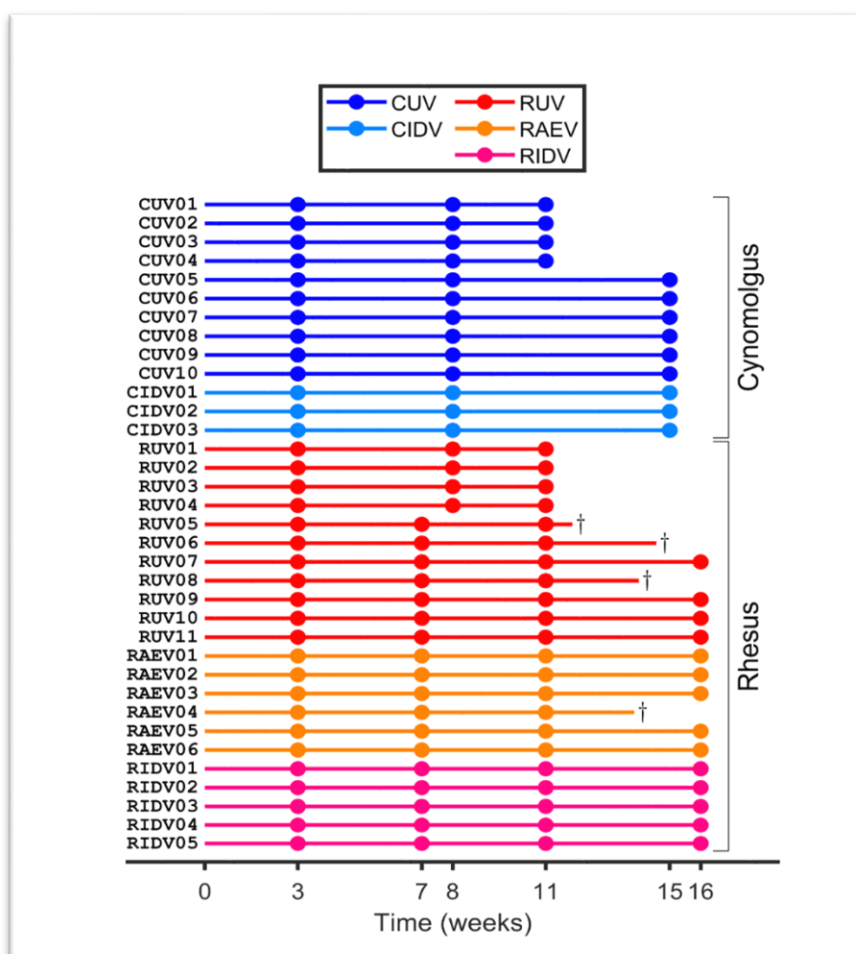


Figura 33. Esquema temporal de l'adquisició de les TC.

De forma més detallada, a 4 cynomolgus control se'ls adquireix un escàner a les setmanes 3, 8 i 11; la resta de cynomolgus control i els cynomolgus vacunats (9 macacos en total) tenen una TC a les setmanes 3, 8 i 15. Per un altre costat, hi ha 4 rhesus control dels que s'obtenen imatges a les setmanes 3, 8 i 11; a la resta de rhesus control i a tots els rhesus vacunats (18 macacos en total) se'ls adquireix un escàner a les setmanes 3,7, 11 i 16, amb l'excepció dels rhesus amb mort prematura que no tenen realitzada la última TC de la setmana 16.

Paràmetres tècnics de l'adquisició i reconstrucció de les imatges TC

Les imatges són adquirides a un escàner de TC multidetector de 16 fileres (o corones) (Lightspeed 16, General Electric Healthcare; Milwaukee, WI, USA). Prèvia sedació del macaco i en respiració lliure, s'apliquen els següents paràmetres tècnics per l'obtenció de les imatges: 120kVp de voltatge de tub i 100-150mAs d'amperatge efectiu amb modulació automàtica de dosi, amb una col·limació d'adquisició de 0.625mm. Es realitzen reconstruccions de les imatges amb algoritme d'alta resolució i finestra de pulmó amb un centre de finestra de -600 unitats Hounsfield i una amplada de 1600 unitats Hounsfield (dit d'una altra forma, nivells de *window width* i *window level* WW: 1600 WL: -600, respectivament) i també es fan reconstruccions estàndards amb finestra de mediastí WW:350 WL:40, ambdues amb un gruix d'imatge corresponent a la pròpia col·limació.

La qualitat de les imatges és considerada bona i equivalent a la imatge mèdica en humans.

Protocols d'actuació en les intervencions als macacos

Per cada intervenció que se'ls fa i que pugui resultar estressant o dolorosa, o bé procediments que precisin immobilitat (com el moment de la infecció o la realització dels escàners TC), els animals són sedats amb quetamina intramuscular (Ketaset 10mg/kg; Fort Dodge Animal Health Ltd., Southampton, UK).

Al final de l'estudi són sotmesos a eutanàsia, que es duu a terme ja sota anestèsia profunda, mitjançant una injecció intracardíaca amb una dosi letal de pentobarbital sòdic (Doletha 140mg/kg; Vétoquinol UK Ltd., Towcester, UK). Cal exposar que hi ha hagut quatre morts prematures de macacos degut a l'avanç de la malaltia, tot seguint criteris veterinaris de benestar,

i han tingut lloc per eutanàsia en el moment que s'ha considerat que hi havia un patiment innecessari. Aquestes morts s'han donat en tres rhesus control i un rhesus amb vacuna aerosolitzada, durant la fase final de l'estudi entre les setmanes 11 i 14.

4.3. Procediment

Anàlisi de les lesions pulmonars tuberculoses a les imatges de TC

El període d'anàlisi de les imatges s'estén des de febrer 2018 fins a l'agost de 2019.

L'avaluació de les imatges les duu a terme la pròpia autora del present treball, que és radiòloga toràcica amb més de 10 anys d'experiència, de forma cega (sense coneixement de l'espècie de macaco, el seu estat de vacunació ni dades clíniques) durant el període d'anàlisi de les imatges.

Els escàners són examinats amb el programa informàtic d'anàlisi i visualització avançada d'imatges radiològiques *Philips IntelliSpace Portal* software (2015 Koninklijke Philips N.V.). Es fan reconstruccions multiplanars axials, coronals i sagitals en 0.625mm i 1.87mm de gruix (per disminuir la ratio senyal/soroll de les imatges), així com projecció d'intensitat màxima (*maximum intensity projection* o MIP) per detectar els nòduls més petits.

L'aplicació *Tumor Tracking* del programa ja mencionat s'utilitza per analitzar el volum i els eixos majors i menors de cada condensació pulmonar. Es fa una anàlisi semi-automàtica que requereix la identificació manual de cada una de les condensacions i el *software* en delimita externament els marges de la lesió, basant-se en la interfase que es crea entre l'afectació de densitat de parts toves envoltada de parènquima pulmonar de densitat propera al gas. Delimita aquestes condensacions amb una línia corba poligonal i tendència a l'esfericitat en tots els seus plans (amb detecció volumètrica). A continuació, aquests marges es corregeixen de forma manual, habitualment per excloure possibles estructures vasculars que han quedat inclosos o per adequar amb major precisió els límits de les lesions amb morfologia amorfa o allargada. Finalment, cada condensació és analitzada com un volum i de forma automàtica se n'extreuen els valors de les variables a estudi

mencionades. Si les lesions són grans, el propi *software* pot detectar la mateixa lesió en diferents escàners de seguiment, però tanmateix s'ha d'ajustar manualment la seva anàlisi.

Per cada condensació a més també s'analiza la presència de cavitació.

La distància entre cada condensació i la pleura més propera es detecta visualment amb reconstruccions multiplanars i es mesura de forma manual amb una línia recta, tot col·locant el calibrador o *caliper* sobre el marge de la lesió més proper a la pleura.

Els micronòduls es valoren de forma visual i manual, doncs el *software* del que es disposa no té prou precisió per fer una anàlisi ni detecció per seguiment automatitzats, i per tant, són identificats, comptats, localitzats i si s'escau també mesurats manualment per cada escàner aplicant sempre la mateixa forma de procedir.

Adicionalment, es determina el volum pulmonar de cada macaco usant l'aplicació de *COPD* del *software Philips IntelliSpace Portal*, que permet l'avaluació de la via aèria principal i el volum de cadascun dels pulmonars de forma separada (**Figura 34**).

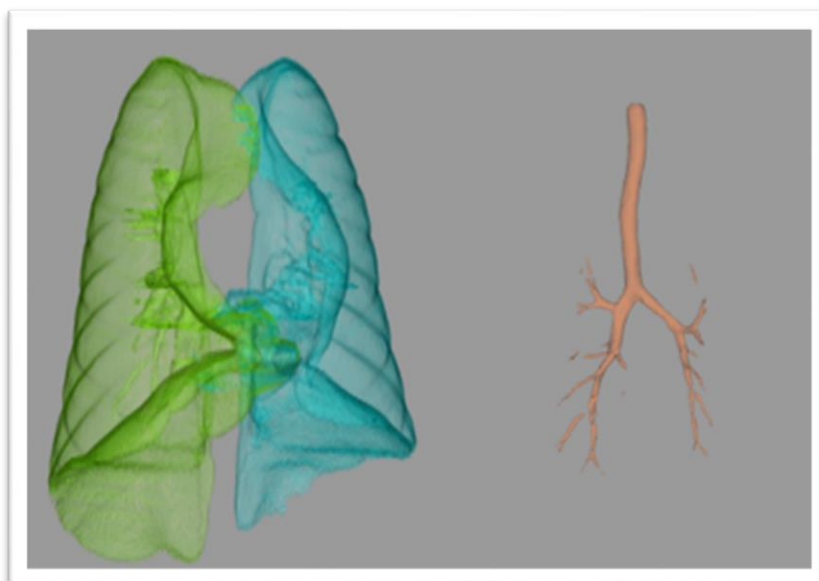


Figura 34. Exemple de l'estudi volumètric tridimensional dels pulmons i de l'arbre traqueobronquial principal (en la primera TC adquirida a un cynomolgus vacunat).

Localització de les lesions: sistema de segmentació broncopulmonar

La localització de les lesions (consolidacions i micronòduls aïllats) es fa mitjançant la segmentació broncopulmonar anatòmica, fet que requereix del seu coneixement previ. Cada segment té assignat un número, aquesta estructuració parenquimatosa és extrapolable als macacos però adaptant-se a la presència d'un segment addicional al pulmó dret que correspon al lòbul infracardíac. Donat que en humans el segment àpicoposterior del lòbul superior esquerra es denomina 11-12, en el present treball es decideix fer la següent adaptació en els macacos: s'anomena 11 al lòbul infracardíac (dret) i se li atribueix el 12 al segment àpicoposterior superior esquerra. D'aquesta forma, la localització també es converteix en una variable quantitativa discreta.

S'ha treballat en la realització d'un mapa visual dels segments broncopulmonars en macacos, que ha culminat amb la configuració d'un model amb imatges TC axials on es delimiten aquestes estructures anatòmiques en un mapa de colors (**Figura 35**).

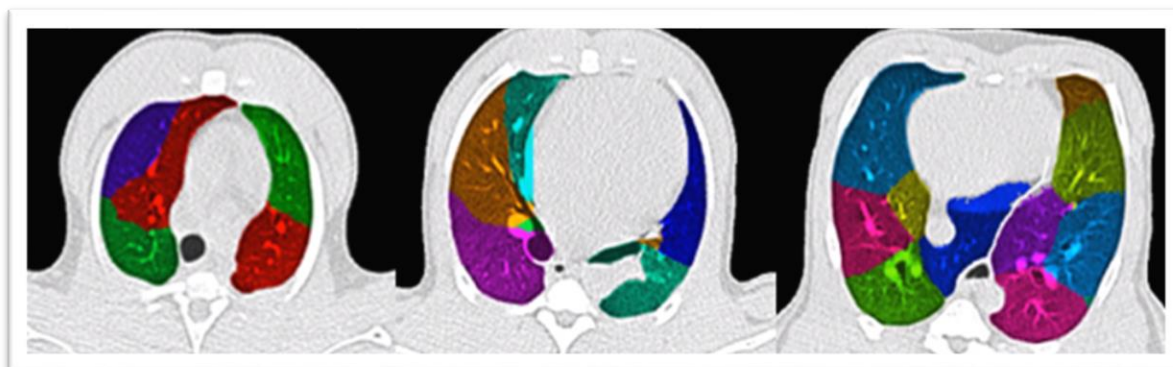


Figura 35. Representació dels segments broncopulmonars en macaco, sobre reconstruccions axials amb finestra de pulmó en imatges axials de la primera TC adquirida a un rhesus vacunat inhalatòriament, realitzat per Dr. Martí Català i Isabel Nogueira.

D'esquerra a dreta, es mostren els tres talls més representatius: camps superior, mig i inferior. Mapa de colors pulmó dret: 1, vermell; 2, verd fosc; 3, blau fosc; 4, cian; 5, taronja; 6, lila; 7, groc; 8, blau clar; 9 fúcsia; 10, verd clar; 11, blau marí. Mapa de colors pulmó esquerre: 12, vermell; 13, verd fosc; 14, blau fosc; 15, taronja; 16, cian; 17, lila; 18, groc; 19, blau clar; 20 fúcsia.

4.4. Definició de les variables

4.4.1. Variables de les lesions per imatge

La nomenclatura de les variables es fonamenta en descriptors estàndards de la semiologia radiològica, que es troba detallada al Glossari de la *Fleischner Society* i en textos radiològics bàsics (188,189,249). Així mateix, són els termes que han estat usats prèviament en estudis que es basen en l'anàlisi de tuberculosi pulmonar en NHP a través de imatges TC, tot destacant Sharpe et al. (2018) (253). Corresponen a conceptes acceptats i reproduïbles d'alteracions pulmonars, que ja han estat explicats a l'apartat 1.2.3.

Les **consolidacions** són prou grans com per poder fer un seguiment precís en escàners consecutius. En el present estudi, són lesions que modifiquen la seva grandària al llarg del temps i tenen una mida de 4.5 mm o superior (equivalent a 0.044 cm³); hi ha condensacions que apareixen de nou i s'inclou en la recollida de dades a partir d'aquell escàner TC. Algunes pateixen cavitació central. També s'inclouen paràmetres que permetin avaluar l'impacte de la pleura sobre les condensacions tuberculoses.

En el present treball es considera que els **micronòduls** mesuren de 1 fins a 4.4 mm de diàmetre (que equival a un volum màxim de 0.044 cm³). Es pren com a diàmetre mínim 1mm perquè les imatges TC no tenen prou resolució per identificar lesions de menor mida amb precisió i reproductibilitat i, per un altre costat, es decideix que han de ser inferiors a 4.5 mm perquè s'observa que gairebé totes les lesions majors augmenten de mida i perden l'esfericitat durant el seguiment. A més, 4.5 mm és la mida màxima que presenten la majoria dels nòduls del macaco rhesus amb disseminació miliar.

Es defineixen dos subgrups de micronòduls:

- **Micronòduls Associats.** Es troben a la perifèria de les condensacions pulmonars, com satèl·lits, i presumiblement es generen a partir d'aquesta condensació inicial o "mare" (8,65,258). Es descriuen com els micronòduls situats dins d'una "zona anular" o "radi d'influència" al voltant d'una condensació, on l'amplitud d'aquesta

corona circular correspon a l'eix menor de la condensació. Per tant, estan íntimament vinculades a les consolidacions. En anglès se les ha anomenat *Daughter Micronodules*.

- **Micronòduls Aïllats.** Són els que no estan associats a cap consolidació (que no compleix criteris de micronòdul associat); així doncs, són micronòduls independents. En anglès se les ha anomenat *Isolated Micronodules*.

Variables de la consolidació

Localització: s'identifica en quin segment broncopulmonar se situa cada condensació, fent servir la nomenclatura numèrica exposada a l'apartat 1.4.3. (que dona un valor a cadascun dels segments, entre 1 i 20). Aquesta localització es fa manualment. Variable categòrica ordenada.

Eixos axials major i menor de la consolidació: Es determinen els eixos major i menor (perpendiculars entre ells) en el pla axial de TC on la lesió és més gran, mesurat en mil·límetres. Aquesta quantificació es calcula de forma automàtica, tal i com està exposat a l'apartat 4.3. **(Figures 36 i 37).** Variable quantitativa continua.

Volum de la consolidació: Es determina el volum de cada consolidació i es mesura en centímetres cúbics. Aquesta quantificació es calcula de forma automàtica amb verificació manual posterior (semi-automàtica), tal i com està exposat a l'apartat 4.3. **(Figures 36 i 37).** Variable quantitativa continua.

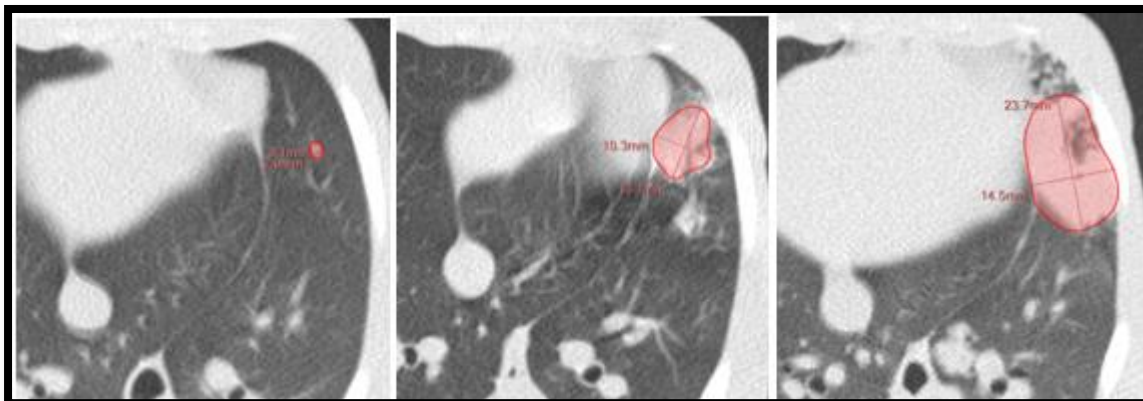


Figura 36. Exemple de condensació pulmonar amb avaluació temporal de lesió a língula inferior (segment 15) de RUV03.

A l'esquerra, la TC a les 3 setmanes on s'observa microneòdul aïllat de 3,1 mm i 0,018 cm³. Al centre, la TC a les 8 setmanes on s'observa creixement de la lesió, amb condensació de 10,3 x 13,1mm i 0,83 cm³. A la dreta, la TC a les 15 setmanes on s'ha incrementat més la condensació i mesura 14,5 x 23,7 mm amb 3,41 cm³.

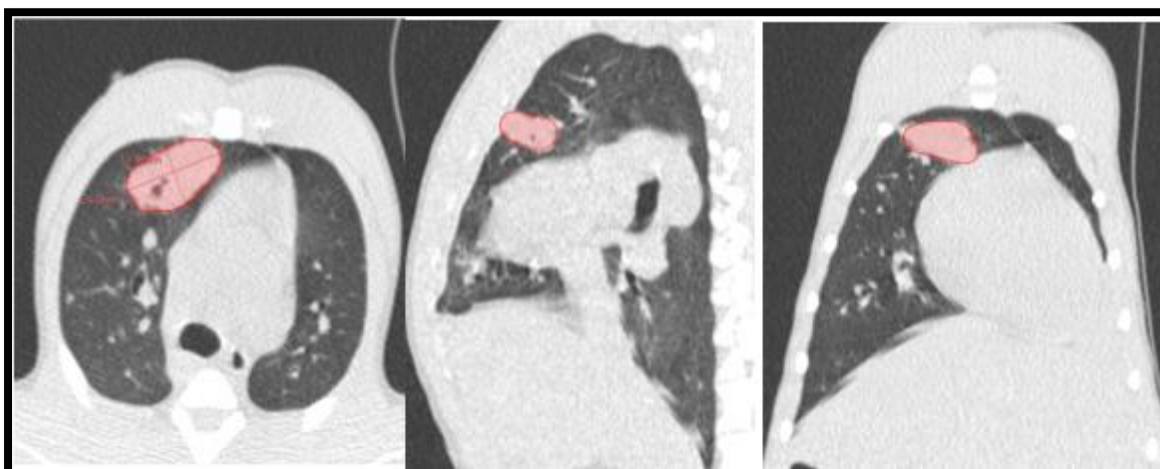


Figura 37. Exemple de valoració tridimensional d'una consolidació en reconstruccions multiplanars axial, sagital i coronal (d'esquerra a dreta).

Correspon a condensació amb petita cavitació central que mostra ampli contacte pleural a la TC4 de RIDV02. La seva anàlisi objectiva uns eixos axials de 24 x 31,4 mm i un volum de 2,308 cm³, en contacte pleural moderat (tipus 2).

Cavitació: Es valora la presència de cavitació a l'interior de la consolidació, amb presència (SI) o absència (NO); es fa manualment. (Figura 38). Variable categòrica dicotòmica.

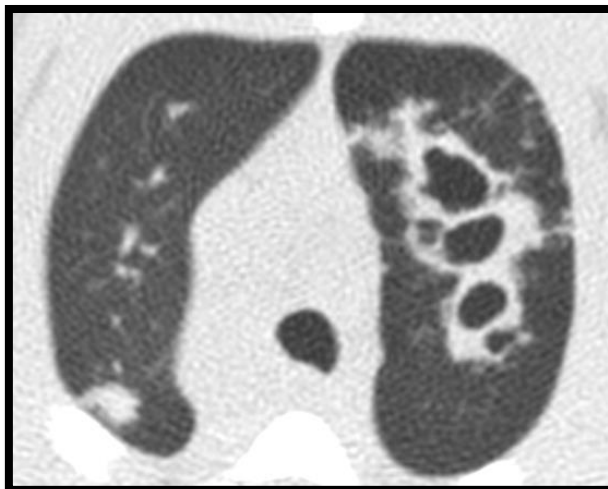


Figura 38. Exemple de cavitació.
S'observa una condensació amb cavitació molt extensa al segment àpicoposterior esquerra (12) a la TC4 de RAEV06. Addicionalment també s'identifica condensació contralateral.

Distància pleural: Es defineix com la distància més curta entre la perifèria des de cada consolidació fins a la pleura més propera (incloent cissures pleurals) (**Figura 39**) i es mesura manualment en mil·límetres. L'absència de distància o distància = 0 mm equival a contacte. Variable quantitativa continua.

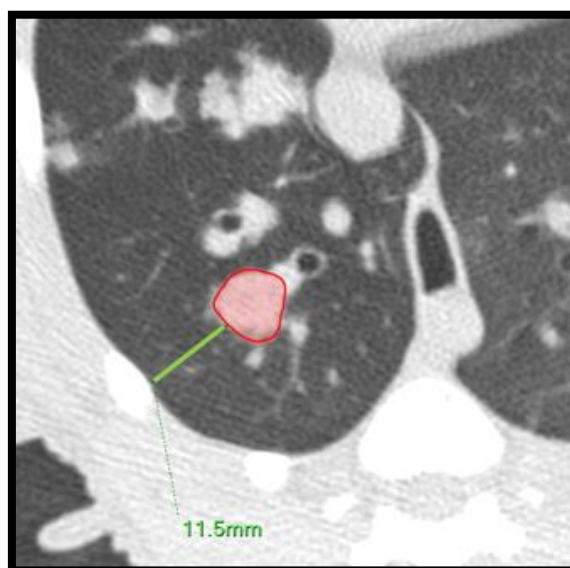


Figura 39. Exemple de distància pleural.
Es mostra condensació al segment laterobasal del lòbul inferior dret (9) a 11.5 mm de la pleura més propera que és la costal, en la TC3 de RIDV02

Tipus de contacte pleural: Es determina el grau de contacte entre una consolidació i la pleura (incloent cissures pleurals), per mètode visual. Variable categòrica:

- Sense contacte: valor 0
- Contacte focal: valor 1. La consolidació i la pleura contacten en un punt.
- Contacte moderat: valor 2. Menys del 50% del marge de la consolidació està en contacte amb la pleura.
- Contacte ampli: valor 3. Més del 50% del marge de la consolidació està en contacte amb la pleura.

Nombre micronòduls associats: Es quantifica manualment el nombre d'aquestes lesions que té cada una de les consolidacions analitzades a cada escàner (**Figura 40**). En ocasions el seu nombre és elevat, fet que dificulta el comptatge; en el cas dels micronòduls associats, se'n determinen fins a un màxim de 10. Variable quantitativa discreta.

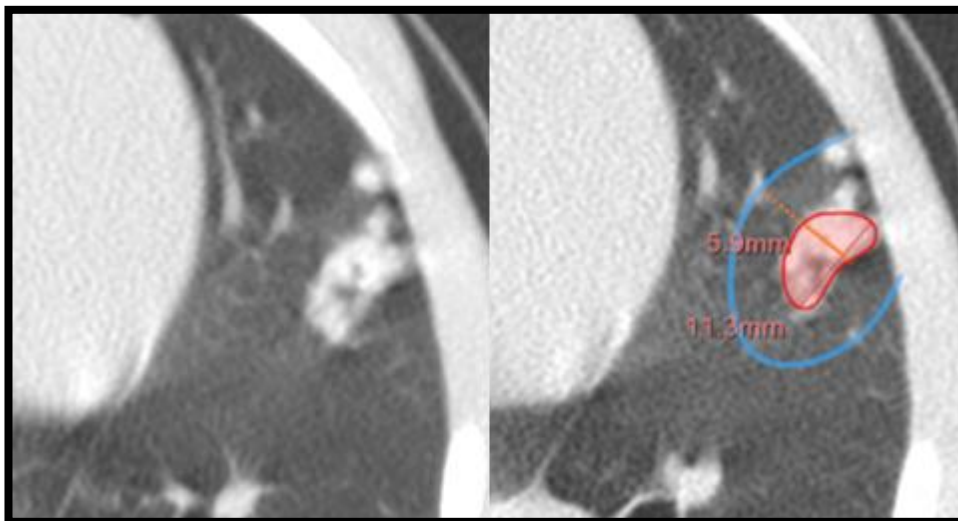


Figura 40. Exemple de micronòduls associats.

La imatge de l'esquerra és la original i la dreta amb les mesures sobreposades. A partir de la consolidació inicial, es pren el seu eix menor i es fa una corona que el radi sigui aquest valor. Els micronòduls inclosos es consideren associats i en aquest cas se n'objectiven dos. Correspon a un complex lesional situat a la língula inferior (15) de la TC3 de RUV10.

Variables de micronòduls aïllats

Nombre: Es quantifica manualment el nombre d'aquestes lesions que hi ha a cada segment broncopulmonar en cada escàner (**Figura 41**). En ocasions, el seu nombre és elevat, fet que dificulta el recompte; en el cas dels micronòduls aïllats, se'n determinen fins a un màxim 20 per segment broncopulmonar. Variable quantitativa discreta.

Mida: Es mesura manualment cada una d'aquestes lesions i s'arrodoneix la seva mida fins a categoritzar-les com de 1, 2, 3 o 4 mm. Variable quantitativa discreta.

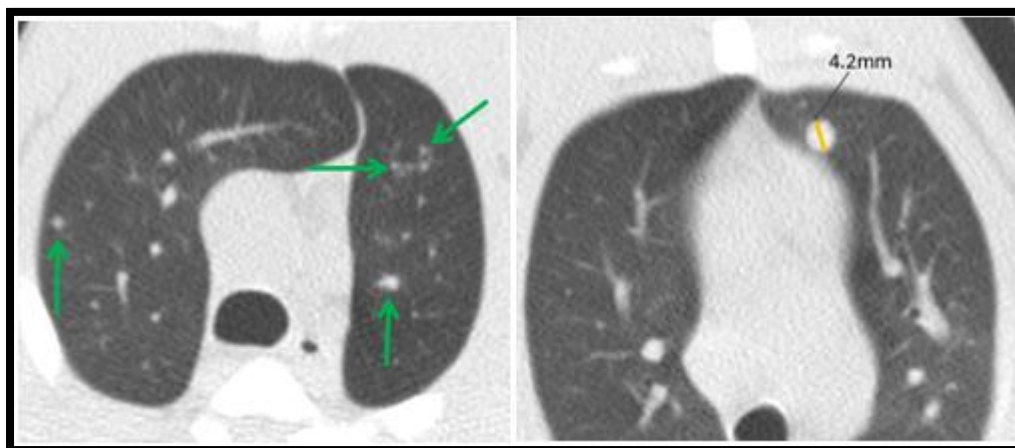


Figura 41. Exemple de micronòduls aïllats.

A l'esquerra s'observen diversos micronòduls aïllats (fletxes verdes) de petita mida i bilaterals a camps pulmonars superiors de RIDV02, i a la dreta s'observa un micronòdul gros de 4.2 mm (volum de 0.041 cm³) al segment anterior del lòbul superior esquerre (13) de RIDV04. Les imatges nodulars no marcades corresponen a estructures vasculars.

4.4.2. Variables dels macacos

Els macacos presenten unes característiques diferencials que en permet definir variables per l'estudi estadístic.

Genotip de macaco: els macacos inclosos són rhesus o bé cynomolgus i se'ls pot anomenar amb la inicial R i C, respectivament. Variable categòrica dicotòmica.

Estat de vacunació amb BCG: els animals poden estar no vacunats o bé vacunats. Variable categòrica dicotòmica.

Ruta de vacunació: la ruta pot ser intradèrmica (anomenada també amb les sigles ID) o bé aerosolitzada (anomenada també amb les sigles AE). Variable categòrica dicotòmica.

4.5. Grups experimentals

Un cop es conclou l'anàlisi de les imatges, es defineixen cinc grups experimentals entre els trenta-cinc macacos, basat en l'espècie de macaco i en el seu estat de vacunació. D'aquesta forma, es configuren els següents grups:

- **Cynomolgus no vacunats.** Està format per 10 macacos cynomolgus. Són també anomenats *cynomolgus unvaccinated (CUV)* en anglès.
- **Cynomolgus vacunats.** Està format per 3 macacos cynomolgus vacunats amb BCG intradèrmica. Són també anomenats *cynomolgus intradermal BCG-vaccinated (CIDV)* en anglès.
- **Rhesus no vacunats.** Està format per 11 macacos. Són també anomenats *rhesus unvaccinated (RUV)* en anglès.
- **Rhesus vacunats via aerosol o inhalada.** Està format per 6 macacos rhesus vacunats amb BCG aerosolitzada. Són també anomenats *rhesus aerosolised BCG-vaccinated (RAEV)* en anglès.

- **Rhesus vacunats via intradèrmica.** Està format per 5 macacos rhesus vacunats amb BCG via intradèrmica. Són també anomenats *rhesus intradermal BCG-vaccinated (RIDV)* en anglès.

Així doncs, els macacos no vacunats conformen el grup control i mostren la progressió natural de la malaltia tuberculosa. Per contra, els macacos vacunats mostren l'efecte del fàrmac profilàctic, tot incloent possibles diferències entre les dues vies d'administració.

4.6. Anàlisi estadística

La recollida de dades s'ha dut a terme utilitzant el programari Excel® de Microsoft, seguida d'una fase de lectura i validació de la base de dades.

Les anàlisis que inclouen valors desconeguts s'han fet interpolant la mitjana amb les dades disponibles. A les gràfiques exposades als resultats, s'ha indicat i marcat amb línies discontinües quan hi ha valors desconeguts.

A continuació, s'ha procedit a fer la seva anàlisi. El tractament estadístic de les dades obtingudes compta amb l'assessorament de la UTE de l'IGTP, amb especial menció del dr. Martí Català Sabaté.

Estadística descriptiva

S'ha realitzat per a cadascuna de les variables d'interès de la base de dades. Per a les variables quantitatives, es calcula la mitjana, la mediana i el rang. Per a les qualitatives, s'han utilitzat freqüències absolutes i relatives.

Significació estadística

L'estudi estadístic s'ha implementat amb les plataformes de MATLAB i Prism.

Per l'anàlisi de variables contínues s'han fet servir el test d'anàlisi de la variància (ANOVA) i el test de Kruskal-Wallis, separades en grups.

Per l'anàlisi de variables discretes s'han fet servir el test de Chi-quadrat de Pearson i el test exacte de Fisher.

S'ha escollit un nivell de significació $\alpha=0,01$, i per tant, s'han pres com a significatives totes les diferències observades amb $p\leq 0,01$.

5. RESULTATS

5.1. Consideracions generals

L'anàlisi anatòmica inicial de les imatges TC corrobora que es poden identificar els lòbuls pulmonars, separats per cissures pleurals, així com les beines o eixos broncovasculars, i per tant, es poden localitzar els segments broncopulmonars (**Figura 42**).

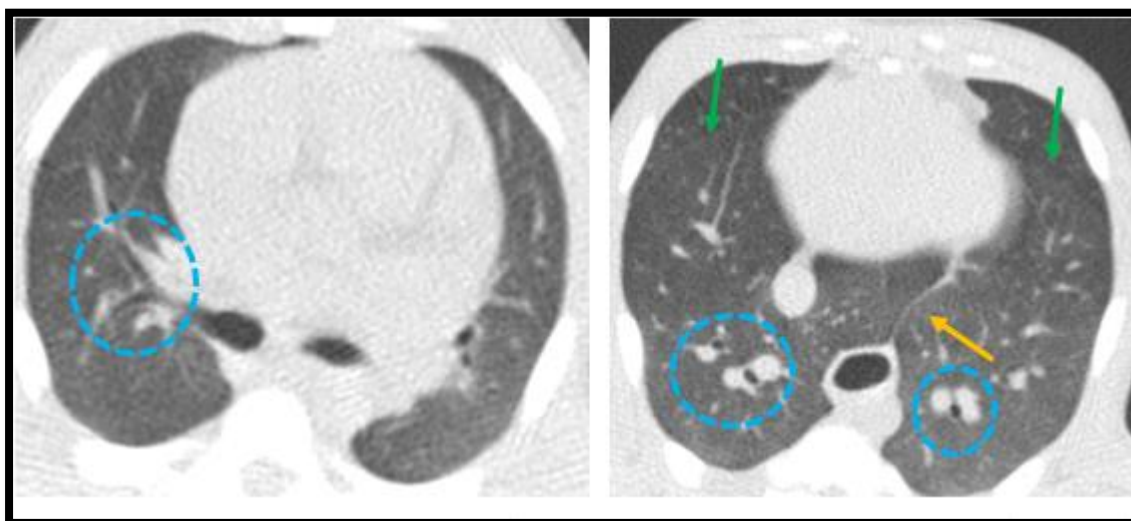


Figura 42. Exemple de beines broncovasculares (cercles blaus) i cissures (fletxes) en les imatges TC axials en finestra de pulmó del TC a les 3 setmanes de RIDV02.

La imatge de l'esquerra és un tall a nivell subcarinal i mostra beina broncovascular dels segments posterior i anterior del lòbul superior dret (2 i 3) en el seu eix longitudinal. La imatge de la dreta és un tall basal supradiaphragmàtic que mostra les beines broncovasculares de les bases pulmonars en eix transversal. Les cissures majors s'assenyalen amb fletxa verda i la cissura interpulmonar posterobasal amb fletxa taronja.

La inspecció de les TC també confirma que els cynomolgus són de menor mida i presenten un volum pulmonar inferior als rhesus, tant el pulmó dret com l'esquerra. A més, la dimensió d'aquests òrgans presenta una correlació lineal directa amb el pes dels individus (**Figura 43**).

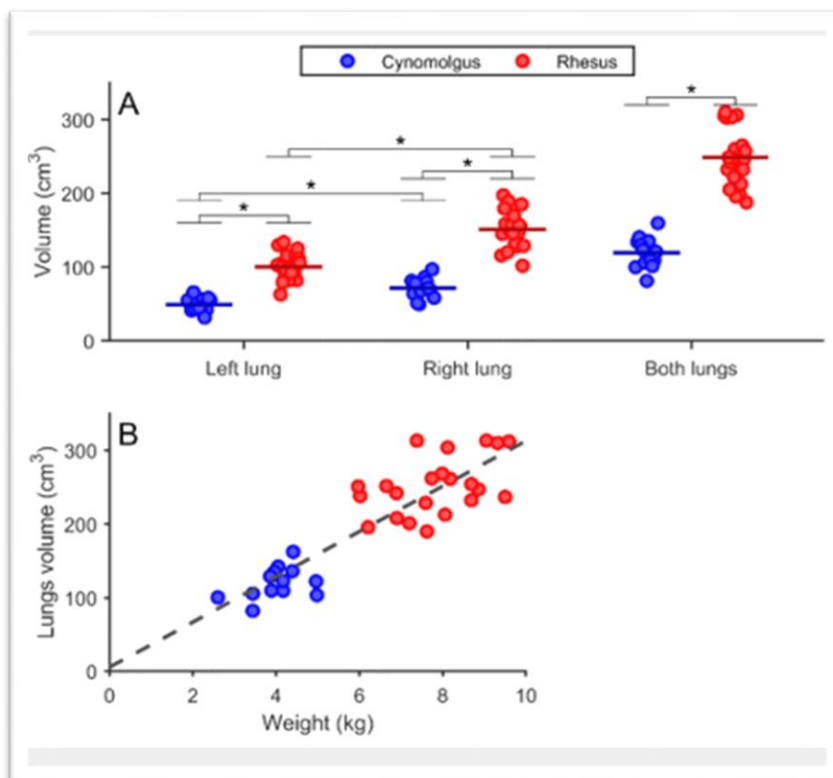


Figura 43. Gràfiques de dispersió del volum pulmonar.

(A) Representació del volum dels lòbuls pulmonars i (B) del volum pulmonar total associat al pes en rhesus i cynomolgus.

La malaltia tuberculosa activa progressiva amb cavitació i disseminació broncògena és la forma més habitual en el present estudi, i es mostra a la **Figura 44**. S'hi pot observar l'evolució de la petita lesió inicial que augmenta de mida esdevenint una consolidació amb cavitació central, i amb posterior aparició de micronòduls associats al seu voltant així com noves lesions a distància (micronòduls aïllats i condensacions), que creixen, fan coalescència i algunes de les quals evolucionen al seu torn amb cavitació.

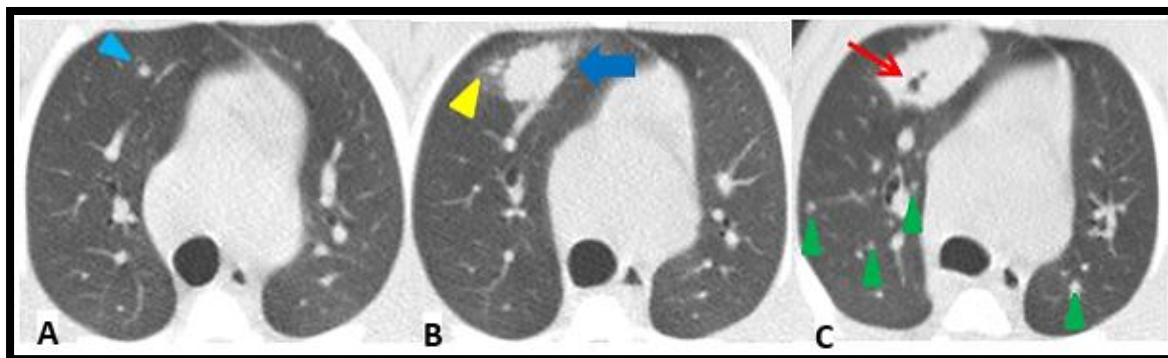


Figura 44. Imatges TC axials consecutives en finestra de pulmó, a nivell de camps superiors. Evolució de la tuberculosi activa progressiva en un rhesus vacunat amb BCG intradèrmica (RIDV) a la setmana 3 (imatge A), setmana 11 (imatge B) i setmana 16 (imatge C) post-infecció.

S'observa la lesió original (imatge A), que correspon a un micronòdul aïllat de 2.1 mm al segment anterior del lòbul superior dret (cap de fletxa blava). Posteriorment (imatge B) aquest s'incrementa de mida tot evolucionant cap a consolidació (fletxa blava) i sorgeixen dos micronòduls associats (cap de fletxa groga). Finalment (imatge C) la condensació encara creix lleument i apareix un focus de cavitació al seu interior (fletxa vermella). A més, s'han generat micronòduls aïllats distribuïts als dos pulmons (caps de fletxes verdes). Cal fixar-se que els imatges nodulars no senyalitzades corresponen a vasos pulmonars (venes i artèries).

Cal destacar que l'individu RUV05 mostra una afectació per tuberculosi miliar i desenvolupa centenars de micronòduls pulmonars distribuïts difusament i homogèniament (**Figura 45**), així com afectació extrapulmonar miliar (sobretot a melsa, fetge i ronyons). A pesar que aquesta disseminació profusa està documentada i en altres estudis publicats s'inclou aquest individu sota l'etiqueta de "*widespread discrete pulmonary nodules*", és inusual i denota distribució hematògena extrema i descontrolada del *M. tuberculosis*. El present treball està focalitzat en la disseminació broncògena i la pneumònia tuberculosa i, en conseqüència, s'han eliminat les seves dades de l'anàlisi estadístic degut a que es considera una malaltia o entitat tuberculosa diferent. En tot cas, la seva inclusió aporta un increment de més de 1000 micronòduls aïllats (concretament, se'n comptabilitzen 627 en la TC de la setmana 7 i 1032 en la TC de la setmana 11), fet que crea un biaix rellevant i pot ser considerat com a factor de confusió.

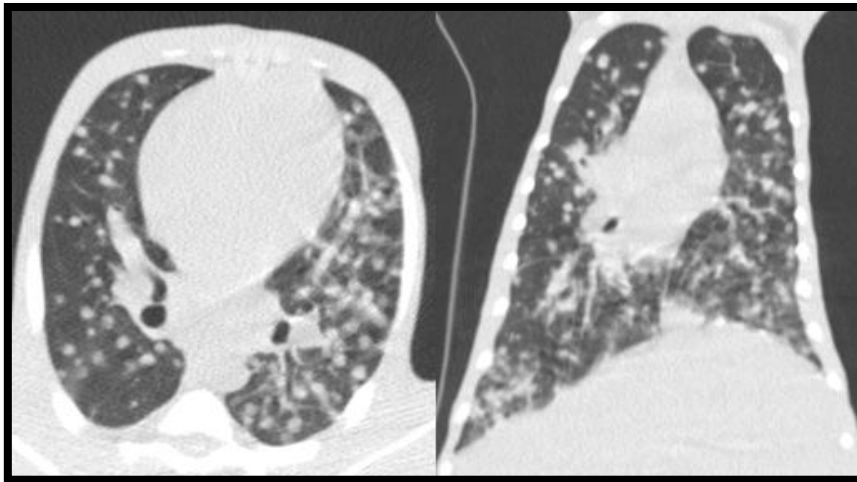


Figura 45. Tuberculosi miliar en la última TC del RUV05, amb reconstruccions multiplanars axial i coronal (imatges de la dreta i esquerra respectivament) en finestra de pulmó. S'observen incomptables micronòduls pulmonars bilaterals distribuïts de forma aleatòria al parènquima pulmonar.

5.2. Identificar patrons de distribució de la malaltia tuberculosa pulmonar en imatges TC

En global s'identifiquen i analitzen 2564 lesions (amb l'exclusió del macaco afectat per tuberculosi miliar). Per un costat, hi ha 332 consolidacions pulmonars tuberculoses, de les quals se'n troben 293 en rhesus i 39 en cynomolgus. Per un altre costat, es detecten un total de 2232 micronòduls, que són generats principalment pels rhesus tot sumant-ne 1927, mentre que se n'identifiquen 305 en cynomolgus (**Taula 2**). Així doncs, hi ha un valor mitjà per cada animal de 106 lesions en rhesus i de 26 en cynomolgus.

Les dades recollides revelen que les lesions globalment augmenten amb el temps.

S'evidencia una diferència molt àmplia entre les dues espècies de macacos, en referència a la xifra de lesions i la seva mida, que són majors en els rhesus de forma significativa, tot desenvolupant un nombre molt més elevat de micronòduls i condensacions.

Taula 2. Taula sumària de quantificació de lesions, per grups experimentals.

	Condensacions	Micronòduls			Total lesions
		Associats	Aïllats	Total	
CUV	29	75	218	293	322
CIDV	10	1	11	12	22
Cynomolgus	39	76	229	305	344
RUV	125	428	322	750	875
RAEV	81	424	141	565	646
RIDV	87	368	244	612	699
Rhesus	293	1220	707	1927	2220
Total	332	1296	936	2232	2564

CUV: cynomolgus no vacunats; CIDV: cynomolgus vacunats; RUV: rhesus no vacunats; RAEV: rhesus amb vacuna inhalada; RIDV: rhesus amb vacuna intradèrmica.

La distribució de les condensacions pulmonars es pot valorar en funció de la seva localització entre pulmó dret i esquerre, anomenat lateralitat, com es mostra a la **Taula 3**. La distribució és heterogènia entre els grups experimentals i entre els genotips de macaco, però globalment hi ha una repartició homogènia entre ambdós pulmons. Per tant, no s'observa una predisposició a la lateralitat de la infecció.

La **Figura 46** exposa l'afectació tuberculosa a cada lòbul, en base al proporció del parènquima pulmonar ocupat per lesions tuberculoses (aquestes majorment equivalen a les condensacions, ja que els micronòduls són molt poc voluminosos en el seu conjunt). Aquest paràmetre és equivalent a l'anàlisi del volum de condensacions però aportant una perspectiva biològica perquè, com s'ha exposat abans, els rhesus són uns animals de major mida que els cynomolgus (i *per ende*, els seus pulmons) i, per tant, l'impacte de la mida d'una lesió és diferent que en un pulmó més petit.

Taula 3. Lateralitat de les condensacions en els grups experimentals

	Pulmó dret	Pulmó esquerre
CUV	10	23
CIDV	9	3
C	19	26
RUV	55	71
RAEV	55	43
RIDV	59	35
R	169	149
Total	188	175

CUV: cynomolgus no vacunats; CIDV: cynomolgus vacunats; C: cynomolgus totals; RUV: rhesus no vacunats; RAEV: rhesus amb vacuna inhalada; RIDV: rhesus amb vacuna intradèrmica; R: rhesus totals.

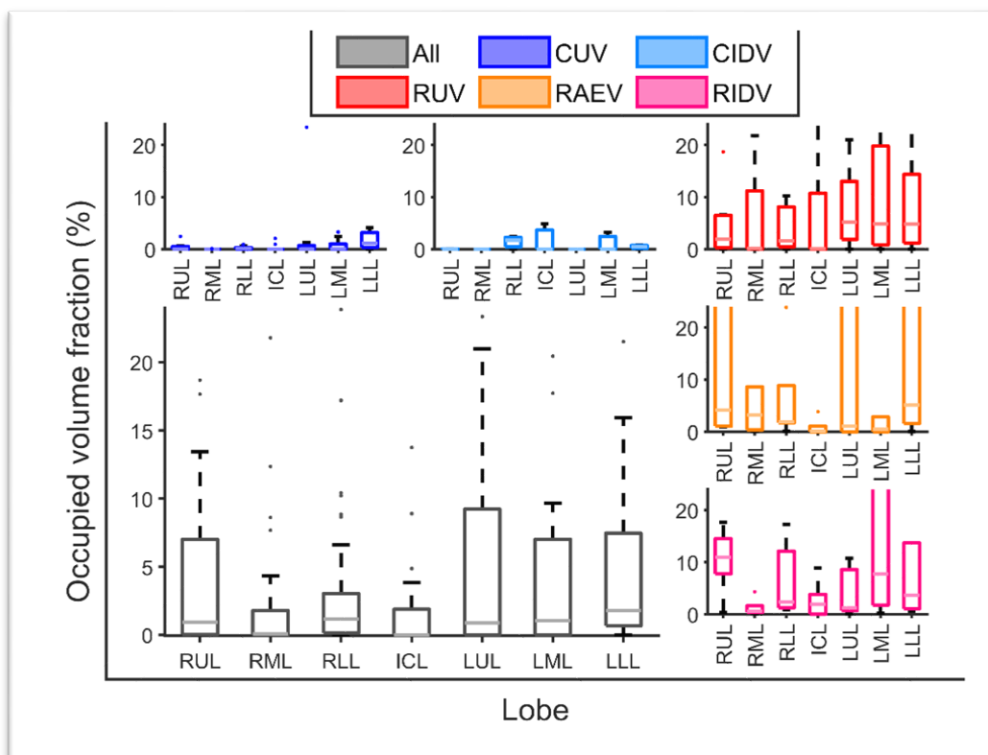


Figura 46. Diagrama *boxplot* que mostra el percentatge d'afectació tuberculosa pulmonar en cada lòbul, expressat com a fracció de volum ocupat lobar.

CUV: cynomolgus no vacunats; CIDV: cynomolgus vacunats; RUV: rhesus no vacunats; RAEV: rhesus amb vacuna inhalada; RIDV: rhesus amb vacuna intradèrmica; All: conjunt total cynomolgus i rhesus. RULL: lòbul superior dret; RML: lòbul mig dret; RLL: lòbul inferior dret; ICL: lòbul infracardíac; LUL: lòbul superior esquerre; LML: lòbul mig esquerre o língula; LLL: lòbul inferior esquerre.

Així doncs, el pulmó esquerre, tot i comptar amb un nombre discretament menor de condensacions, presenta una proporció més elevada de pulmó ocupat o afectat. Existeix una manca de diferències significatives respecte la localització de les lesions, tot i que s'observa una tendència lleu a una major afectació dels lòbuls superiors, que és major al costat esquerre.

En alguns casos d'afectació molt profunda amb grans lesions segmentàries, lobars o inclús pulmonars, la valoració precisa de les condensacions resulta complexa. A més, desapareixen els micronòduls i, tot i ser macacos amb molta malaltia, no aporten micronòduls al comptatge general.

Tanmateix, aquesta situació està habitualment associada a oclusions bronquials rellevants (quan s'estenosa més d'un 70% de la llum endotraqueal) i, fins i tot, poden comportar atelèctasis i hiperinsuflació pulmonar. El bronqui estenosat amb major freqüència és el bronqui principal esquerra (**Figura 47**), observat en 6 casos, mentre que el dret ho ha estat en 4 casos.



Figura 47. Imatge TC coronal en finestra de pulmó que mostra amputació del bronqui principal esquerre (fletxa vermella) en la TC de la setmana 11 de CUV07, amb pèrdua de volum al pulmó homolateral i afectació tuberculosa extensa.

La **Taula 4** presenta una anàlisi detallada de les condensacions, amb especial esment al nombre generat per cada animal així com a l'evolució de la mida de les condensacions, desglossats per grups experimentals.

També s'inclouen les lesions transicionals, que és un concepte creat en el present treball per definir aquells micronòduls aïllats que creixen per sobre de 4.4 mm de diàmetre (equivalent a 0.044 cm³) des d'una TC original a la TC consecutiva, tot convertint-se en consolidacions. Per tant, són micronòduls aïllats, però s'exposen en aquesta taula per evidenciar que inicialment són identificables tot i que molt petits i se'n pot fer un seguiment.

Taula 4. Resum de les condensacions pulmonars i lesions transicionals, per grups experimentals.

	Quantificació condensacions		Condensacions per animal		Volum condensacions		Lesions transicionals
	n	% total lesions	M _e	Rang	Mitjana a TC inicial (cm ³)	Mitjana a TC final (cm ³)	
CUV	29	9	2	[0-6]	0.085	0.883	16
CIDV	10	45	4	[0-6]	0.013	0.194	13
C	39	11	2	[0-6]	0.085	0.539	29
RUV	125	14	13	[1-25]	0.356	1.593	27
RAEV	81	12	15	[0-20]	0.19	2.278	40
RIDV	87	12	15	[12-25]	0.172	0.986	62
	293	13	14	[0-25]	0.239	1.339	129
TOTAL	332	13	10.5	[0-25]	0.162	0.94	158

M_e = Mediana de lesions per individu. n = nombre total de lesions.

CUV: cynomolgus no vacunats; CIDV: cynomolgus vacunats; C: cynomolgus totals; RUV: rhesus no vacunats; RAEV: rhesus amb vacuna inhalada; RIDV: rhesus amb vacuna intradèrmica; R: rhesus totals.

Es mostra la mediana de condensacions per cada animal associat al seu rang. El percentatge que s'observa es correspon amb la relació entre la lesió concreta respecte el global de lesions per cada grup experimental (és a dir, el conjunt de condensacions i micronòduls). Cal tenir en compte que els grups experimentals no estan ben equilibrats a nivell d'animals i els grups de macacos control pràcticament en doblen el nombre; per tant, la rellevància de la quantitat de lesions totals és relativa, i s'ha de prendre la quantitat de "lesions per animal" com l'indicador fiable en la valoració comparativa.

Així doncs, els rhesus generen moltes més condensacions i cada un d'ells desenvolupa fins a 7 vegades més condensacions per macaco que els cynomolgus. No obstant, hi ha un rang de distribució molt ampli especialment en els rhesus, on fins i tot es recompten un mínim de 20 condensacions en 4 macacos (fins a un màxim de 25). A més, aquestes condensacions dels rhesus són molt més voluminoses i ja presenten una mida mitjana a l'inici de l'estudi que pràcticament triplica la dels cynomolgus (els no vacunats en concret, doncs els vacunats estrictament no fan condensacions primerenques); en l'últim escàner el volum mitjà en els rhesus és més del doble que en l'altre genotip.

Es pot advertir que el grup de cynomolgus vacunats té un comportament diferenciable, amb un petit nombre de condensacions, que endemés són de petita mida i representen pràcticament la meitat del conjunt de les lesions que generen (al contrari que la resta dels grups experimentals). De fet, totes les lesions inicials són micronòduls aïllats, ja que el seu volum mitjà és inferior de 0.044 cm^3 , i són identificades com a lesions transicionals. Les condensacions apareixen en la segona TC, on la meitat encara són, però, lesions transicionals. Així doncs, les condensacions dels cynomolgus destaquen per la seva mida reduïda, essent de menor volum de tots els grups experimentals, amb un diàmetre mitjà de 7.2 mm al final de l'estudi.

En l'extrem oposat hi ha els rhesus no vacunats. Aquests generen la major quantitat de condensacions i inicialment són les més grosses, amb un volum en el primer escàner que és aproximadament el doble que el dels rhesus vacunats (amb un diàmetre mitjà de 8.8 mm). Tanmateix, al finalitzar l'estudi, el grup amb les lesions de major mida són els rhesus amb vacuna inhalada, exhibint un diàmetre mitjà de 15.2 mm (més del doble que els cynomolgus vacunats). Per altra banda, els rhesus vacunats mostren una mediana de lesions per macaco una mica superior als rhesus control.

Cal esmentar que un dels cynomolgus control mostra una tendència lleu al decreixement de la mida de les seves condensacions al final de l'estudi.

Les lesions transicionals apareixen sobretot en la fase primerenca, és a dir, entre els dos primers escàners, i es pot observar que gairebé la meitat de les condensacions són micronòduls en aquesta etapa com es reflecteix a la **Taula 4**. En els escàners successius, les lesions transicionals passen a ser pràcticament anecdòtiques excepte en els cynomolgus vacunats.

5.2.1. Detall de la distribució dels micronòduls

La xifra de micronòduls es va incrementant a mesura que avança el temps, tant els associats com els aïllats. Però, curiosament, en alguns individus s'observa una quantitat major dels aïllats en el primer escàner respecte el segon. No obstant, és una qüestió de categorització, ja que succeeix en els macacos amb moltes lesions transicionals que, per tant, són identificades com a micronòduls inicialment però en la TC consecutiva són condensacions, fet que dona lloc a una reducció de la xifra de les lesions petites (com a conseqüència de categorització).

Donat que no ha estat possible l'anàlisi de cadascun dels micronòduls en forma de seguiment temporal (al contrari que les consolidacions), sinó que s'ha obtingut una quantificació en cada TC, pel còmput en total s'exposa el nombre de micronòduls de l'escàner que conté la major quantitat per tal d'evitar el comptatge repetitiu d'aquests elements i habitualment coincideix amb l'últim escàner adquirit.

La **Taula 2** i la **Taula 5** exposen que els cynomolgus generen significativament menys micronòduls, resultant pràcticament anecdòtics en els vacunats. Per contra, com es reflecteix a la **Taula 5**, els rhesus en desenvolupen una mitja de 473 micronòduls en cada un dels grups experimentals, fet que representa més de 6 vegades la quantitat generada pel conjunt de cynomolgus, sense diferències significatives entre els grups control i vacunats dels rhesus.

Taula 5. Resum dels micronòduls per grups experimentals.

EG	Micronòduls Associats				Micronòduls Aïllats			
	n	Me	Rang	%	n	Me	Rang	%
CUV	75	5.5	[0 30]	23	211	5.5	[0 110]	68
CIDV	1	0	[0 1]	5	11	4	[1 6]	50
C	76	3	[0 30]	22	214	4	[0 110]	67
RUV	428	36	[2 96]	49	319	30	[1 83]	37
RAEV	424	54	[0 151]	66	137	18.5	[14 37]	22
RIDV	368	55	[45 138]	53	241	29	[21 117]	35
R	1220	51	[0 151]	55	697	29	[1 117]	32
TOTAL	1296	27.5	[0 151]	51	911	20	[0 117]	37

Me = Mediana de lesions per individu. n = nombre micronòduls. % = proporció de micronòduls respecte el total de lesions. CUV: cynomolgus no vacunats; CIDV: cynomolgus vacunats; C: cynomolgus totals; RUV: rhesus no vacunats; RAEV: rhesus amb vacuna inhalada; RIDV: rhesus amb vacuna intradèrmica; R: rhesus totals.

Globalment, s'identifiquen més micronòduls associats que aïllats, comportament que també mostren els rhesus. En canvi, els cynomolgus generen una xifra molt major de micronòduls aïllats que d'associats.

L'anàlisi percentual de la distribució dels micronòduls associats i aïllats és representada en format visual a la **Figura 48**. Aquesta anàlisi posa de manifest que hi ha un major percentatge del micronòduls associats en global, comportament que també s'observa en rhesus. No obstant, en els cynomolgus succeeix a la inversa i presenten una proporció notablement major de micronòduls aïllats.

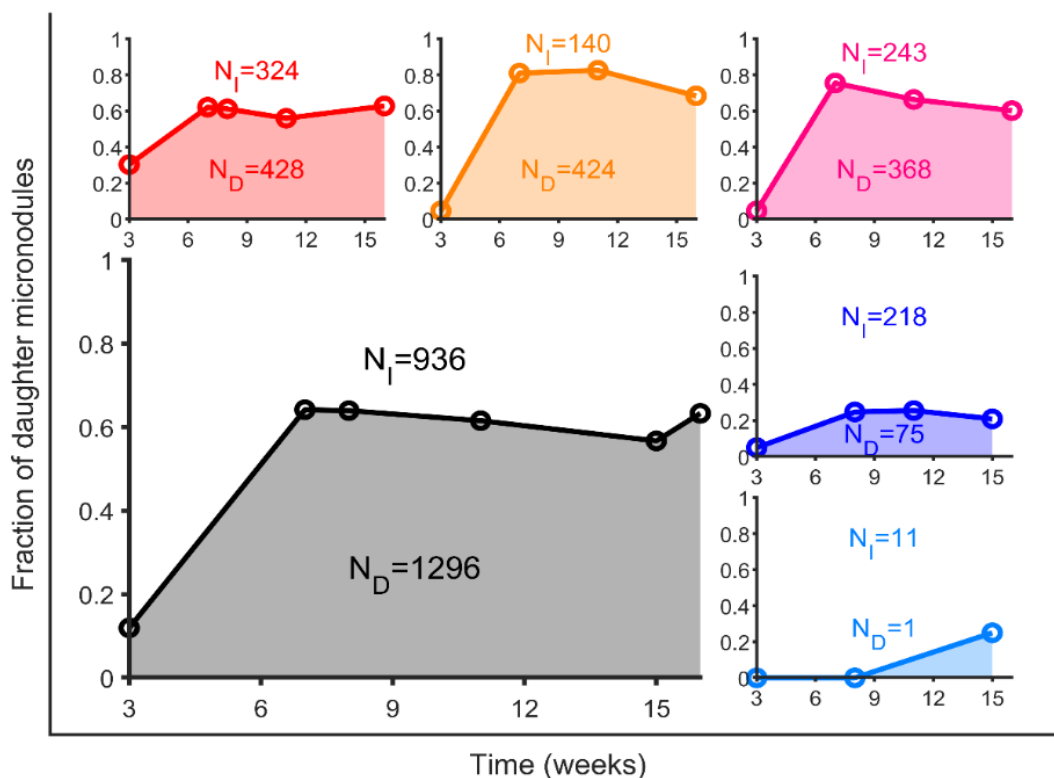


Figura 48. Gràfiques lineals de la distribució percentual dels micronòduls, per grups experimentals. Es mostra l'evolució dels percentatges mitjans de micronòduls per cada fase en cada grup experimental. Es ressalta amb color l'àrea sota de corba (AUC), que correspon als micronòduls associats; d'aquesta forma, l'àrea inversa es representa en blanc i correspon als micronòduls aïllats. A més, s'afegeix el nombre total de cada tipus de micronòdul.

Gris: total; vermell: rhesus no vacunats; taronja: rhesus amb vacuna inhalada; magenta: rhesus amb vacuna intradèrmica; blau: cynomolgus no vacunats; cian: cynomolgus vacunats.

5.2.2. La relació entre les condensacions i els micronòduls associats

La **Taula 6** es mostren les condensacions amb micronòduls associats així com els micronòduls associats per cada consolidació, exposant-ne la quantitat, el percentatge que representen respecte el nombre de condensacions totals, la mediana i el rang.

Taula 6 Distribució de consolidacions amb micronòduls associats i els micronòduls associats per cada consolidació, per grups experimentals

	Consolidacions amb Micronòduls Associats					Micron. Assoc. per consolidació	
	n	%	Me	Rang	N - n	Me	Rang
CUV (N=29)	19	66	2	[0 4]	10	3	[1 15]
CIDV (N=10)	1	10	0	[0 1]	9	1	[1 1]
Cynomolgus (N=39)	20	51	1	[0 4]	19	3	[1 15]
RUV (N=125)	111	92	12	[1 24]	14	3	[1 15]
RAEV (N=79)	79	100	15	[0 19]	0	3.5	[1 15]
RIDV (N=87)	84	95	14	[11 24]	3	3	[1 15]
Rhesus (N=293)	274	95	14	[0 24]	19	3	[1 15]
Total (N=332)	294	90	9	[0 24]	38	3	[1 15]

N= quantitat de condensacions totals del grup experimental. n= nombre de complexos lesionals "condensació amb micronòduls associats". Me: mediana. CUV: cynomolgus no vacunats; CIDV: cynomolgus vacunats; cyn: cynomolgus totals; RUV: rhesus no vacunats; RAEV: rhesus amb vacuna inhalada; RIDV: rhesus amb vacuna intradèrmica; rhe: rhesus totals.

S'hi observa que en global els rhesus generen 9 vegades més condensacions amb micronòduls associats que els cynomolgus. No obstant, destaca de nou el grup de cynomolgus vacunats, ja que només en genera una, que computa com a 0 de mediana per individu i que, a més, tan sols dona lloc a un únic micronòdul.

En l'altre extrem, els rhesus les desenvolupen abundantment i representen més del 90% del conjunt de les seves condensacions en total. El grup de rhesus vacunats amb aerosol és el que en genera més per individu, amb una mediana de 15, i aquest mateix grup és el que genera més micronòduls associats per condensació, amb una mediana de 3.5 per individu (tota la resta de rhesus i els cynomolgus control en fan 3).

La **Taula 7** presenta la distribució de condensacions amb micronòduls associats per cada grup experimental. Es calcula una taula de contingència sobre la distribució de condensacions (en base al percentatge), amb i sense micronòduls associats.

Es posa de manifest que hi ha una associació estadísticament significativa entre el global de les dues espècies de macacos així com entre els dos grups de cynomolgus. S'observa que els rhesus desenvolupen més condensacions amb micronòduls associats que els cynomolgus i, alhora, els cynomolgus no vacunats en desenvolupen significativament més que els vacunats.

Tanmateix, no es detecta una associació significativa entre els grups de rhesus vacunats i per tant, no s'observen diferències respecte la ruta d'administració de la vacuna.

Sí que s'aprecia una diferència propera a la significació entre els rhesus no vacunats i els vacunats, es podria dir que sembla existir una tendència dels vacunats a generar més condensacions amb micronòduls però novament es tracta d'una anàlisi en què hi ha una pèrdua de dades en el grup control i per tant és un resultat de significat més aviat incert.

Taula 7. Taula de contingència. Diferències en la distribució de les condensacions amb o sense micronòduls associats entre els grups experimentals. Els números corresponen al valor de p amb test de Fisher.

EG	CUV	CIDV	C	RUV	RAEV	RIDV	R
CUV	ND						
CIDV	0,0014	ND					
C	ND	ND	ND				
RUV	ND	ND	ND	ND			
RAEV	ND	ND	ND	0,0585	ND		
RIDV	ND	ND	ND	0,0355	>0,999	ND	
R	ND	ND	<0,0001	ND	ND	ND	ND

ND: No calculat. CUV: cynomolgus no vacunats; CIDV: cynomolgus vacunats; C: cynomolgus totals; RUV: rhesus no vacunats; RAEV: rhesus amb vacuna inhalada; RIDV: rhesus amb vacuna intradèrmica; C: rhesus totals.

Per donar fi a aquest apartat, s'exposen unes relacions entre micronòduls i la mida de les condensacions. La **Figura 49** mostra la relació entre el nombre de micronòduls associats i el volum

de les condensacions, on es pot observar una correlació lineal directa que és estadísticament significativa en el conjunt dels macacos, particularment en els rhesus i, també pràcticament, en els cynomolgus control. Així doncs, a mesura que s'incrementa el volum de les condensacions es generen més micronòduls associats.

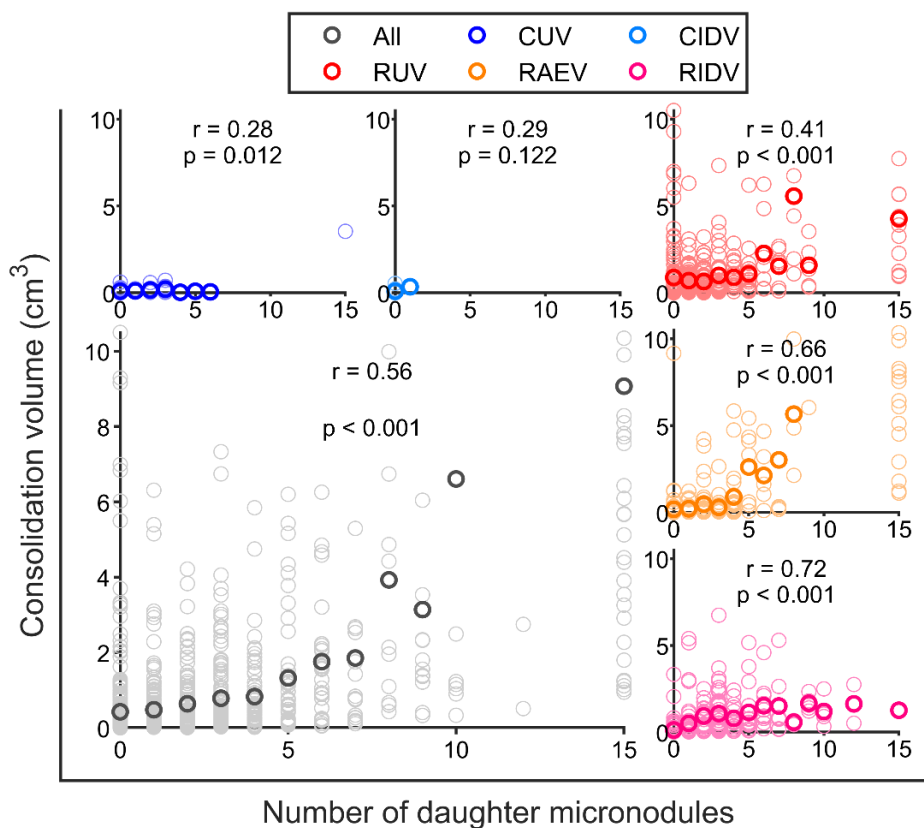


Figura 49. Gràfica de dispersió que mostra el volum de les consolidacions en funció del nombre de micronòduls associats, per grups experimentals.

Gris: total; vermell: rhesus no vacunats; taronja: rhesus amb vacuna inhalada; magenta: rhesus amb vacuna intradèrmica; blau: cynomolgus no vacunats; cian: cynomolgus vacunats.

De igual manera, la **Figura 50** mostra la relació entre el nombre de micronòduls aïllats i el percentatge d'ocupació del parènquima pulmonar (que també es pot concebre com la càrrega de malaltia). S'hi observa una correlació lineal directa que és significativa en el conjunt dels macacos particularment en ambdós grups control i, també pràcticament, en els rhesus amb vacunat intradèrmica. Per tant, a major volum ocupat de pulmó, major nombre de micronòduls aïllats.

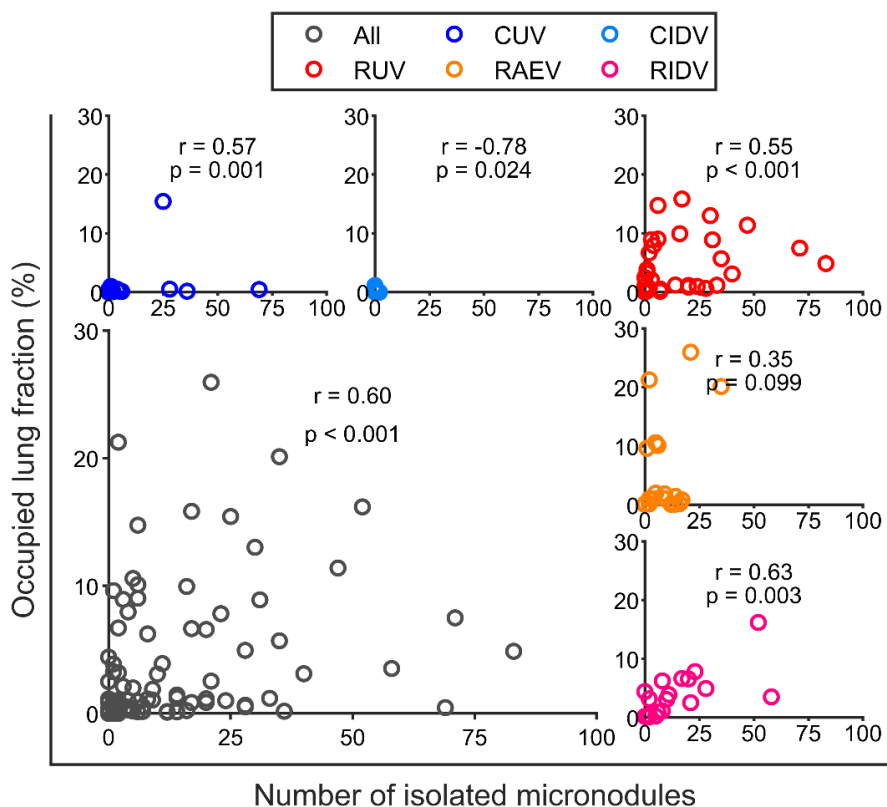


Figura 50. Gràfica de dispersió que mostra la porció de pulmó ocupada per lesions en funció del nombre de micronòduls aïllats, per grups experimentals.

Gris: total; vermell: rhesus no vacunats; taronja: rhesus amb vacuna inhalada; magenta: rhesus amb vacuna intradèrmica; blau: cynomolgus no vacunats; cian: cynomolgus vacunats.

5.3. La cavitació de les condensacions

La cavitació és un fenomen que s'objectiva per TC a l'interior de les condensacions i ocorre majorment en rhesus. D'aquests, un 77.3% dels animals desenvolupen cavitació al llarg de 16 setmanes, on els grups control i amb vacuna inhalada mostren les taxes més altes.

Des del punt de vista de les condensacions, el 34.4% dels rhesus control mostren cavitació, seguits dels grups amb vacuna inhalada (28.4%) i, per últim, amb vacuna intradèrmica (24.3%).

Només s'observen condensacions cavitades en un macaco cynomolgus. Es tracta d'un animal control que mostra extensa afectació pulmonar esquerra amb dues condensacions cavitades que afecten gran part del lòbul superior i de l'inferior, en context d'oclusió del bronqui principal esquerre per conglomerat adenopàtic.

L'anàlisi més detallada en rhesus **Figura 51** revela que la cavitació es troba relacionada amb la mida de la consolidació de forma estadísticament significativa ($p < 0.0001$), de manera que a major volum de lesió, major possibilitat de cavitació. Encara més, aquest fet és més probable en lesions més grans de 2 cc, les quals presenten una taxa de cavitació del 57%.

Des d'un altre punt de vista, i de forma remarcable, el 84.4% de les lesions de 0 a 1cc no cavitaven, i, aquelles de 0 a 2 cc, tampoc ho fan en un 79.8%.

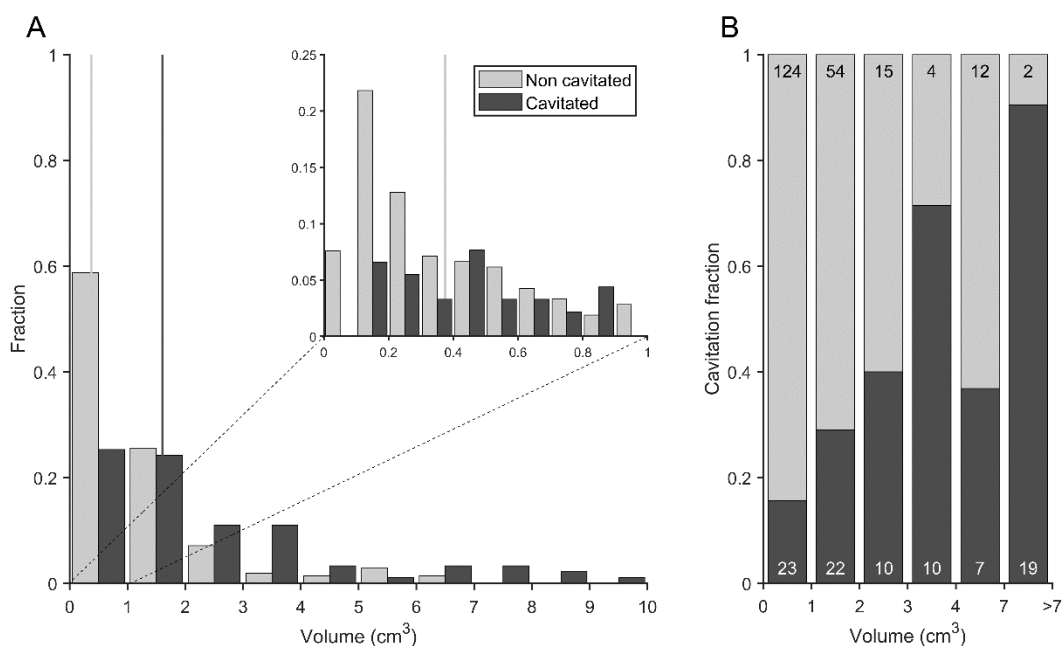


Figura 51. Gràfiques de barres que mostren la fracció de condensacions cavitades distribuïdes per rangs de volum, en els rhesus.

La figura detalla les lesions inferiors de 1 cc, que correspon al grup que conté el major nombre de condensacions. En aquest cas se'n destaca que el percentatge de cavitació és inferior al 10%. El

fet que les lesions entre 4 a 7 cc presentin menor taxa de cavitació que les lesions entre 2 a 4 cc és una troballa inesperada, de causa indeterminada, però seria atribuïble a l'atzar donat que es tracta d'una mostra petita.

No es troben diferències estadísticament significatives respecte la distribució anatòmica de les condensacions cavitades i el 32% es troben als lòbuls superiors.

De forma puntual, s'ha identificat gas a l'interior d'una massa adenopàtica hilar dreta en un rhesus amb vacuna aerosolitzada, que és compatible amb cavitació adenopàtica per necrosi caseosa i fistulització amb la via aèria.

5.4. L'efecte de la vacuna BCG en macacos rhesus i cynomolgus

Aquest apartat es dedica a valorar les diferències entre els diversos grups experimentals que posin de manifest l'eficàcia de la vacuna. S'exposen dades que ja s'han tractat amb anterioritat sota el focus de les diferències entre les espècies de macacos, que ara es redirigeix per valorar l'impacte de la vacuna, tot profunditzant en d'altres aspectes.

5.4.1. Evolució natural de la tuberculosi pulmonar

L'evolució de les lesions en els animals no vacunats o grups control es representa a la **Figura 52**, on el curs natural de la infecció tuberculosa hi queda exposada de forma visual i s'aprecia clarament una afectació més severa als rhesus.

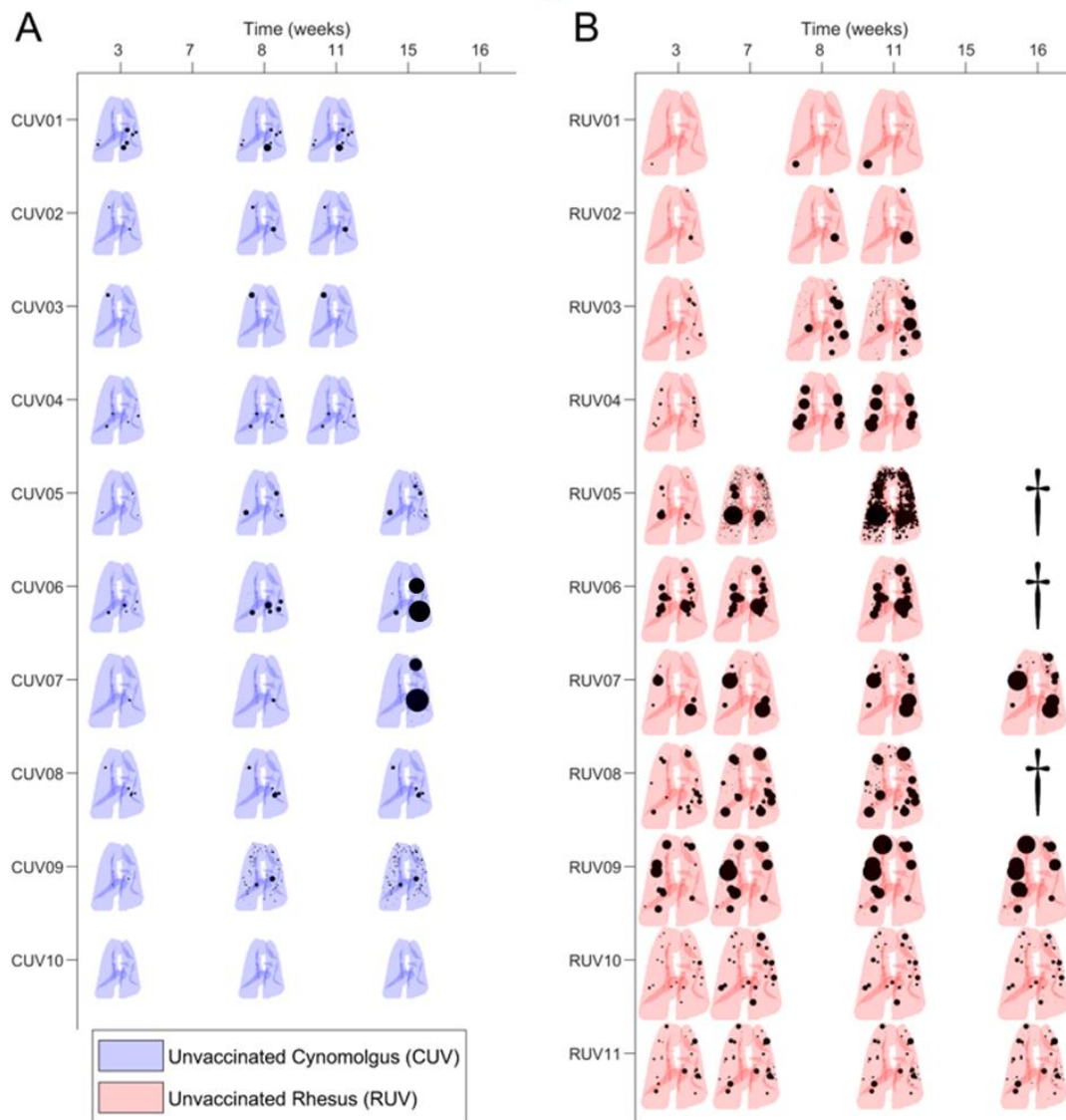


Figura 52. Esquema visual de l'afectació pulmonar tuberculosa en macacos cynomolgus i rhesus control. El símbol † indica mort prematura.

Els pulmons dels individus estan adaptats a la mida real de cadascun d'ells i estan remodelats prenent com a model la morfologia de RUV03. Les lesions es localitzen en un pla bidimensional (2D) d'acord a la seva situació segmentària recollida en la base de dades. No inclou informació sobre cavitació ni distància real fins a pleura.

Els cynomolgus inicialment generen un nombre baix de lesions i poc voluminoses, globalment ben controlades, que experimenten un increment molt lleu amb el temps. Tanmateix, els individus CUV06 i CUV07 mostren un comportament diferent amb un creixement desproporcionat de

l'afectació del pulmó esquerre a la fase final, i en aquests macacos alhora s'identifica l'oclusió del bronqui principal esquerra.

És molt interessant el comportament del macaco CUV10, que tot i demostrar-se que ha estat infectat amb èxit gràcies a la conversió del PPD i IGRAs, no desenvolupa cap lesió visible per TC durant les setmanes que dura l'estudi.

Contràriament, les lesions als rhesus són abundants i grosses des de la setmana 3, tot experimentant creixement i disseminació global amb el temps, com s'aprecia especialment en els individus RUV03, RUV04, RUV06, RUV07, RUV08 i RUV09. No obstant, alguns d'ells mostren cert control de forma inherent, com els individus RUV01 i RUV02, tot assemblant-se a l'evolució dels cynomolgus, i inclús RUV10 mostra lleu grau de regressió espontània a la fase final. A part, en destaca RUV05, que desenvolupa una afectació pulmonar extrema degut al dèbil control que fa de la malaltia, i que correspon a tuberculosi miliar profusa com ja s'ha exposat amb anterioritat.

La **Figura 53** exposa en forma de gràfiques les dades recollides en els cynomolgus i rhesus controls, i per tant, l'evolució tuberculosa natural. S'observa en la **Figura 53 A** que hi ha una diferència estadísticament significativa respecte la quantitat de condensacions, essent els rhesus els que desenvolupen més condensacions en global i de mitjana per individu.

El volum de les condensacions s'exhibeix en la **Figura 53 B** expressat en base al percentatge del parènquima pulmonar que es troba ocupat per tuberculosi, i s'observa un augment pràcticament constant en els rhesus i un augment molt contingut en els cynomolgus

Les **Figures 53 C i D** mostren l'evolució dels micronòduls, tot mostrant la quantitat mitjana per macaco dels aïllats i dels associats respectivament, observant-se un increment en ambdues espècies i que els rhesus en fan un nombre major. No obstant, les quantitats són més similars en els aïllats, tot apreciand-se una diferència àmplia entre els associats degut a que els cynomolgus en generen un nombre molt reduït.

Les condensacions es cavitzen freqüentment en els rhesus i de forma significament superior a les dels cynomolgus (només cavitzen les lesions de CUV07), tal i com s'observa a la **Figura 53 D**.

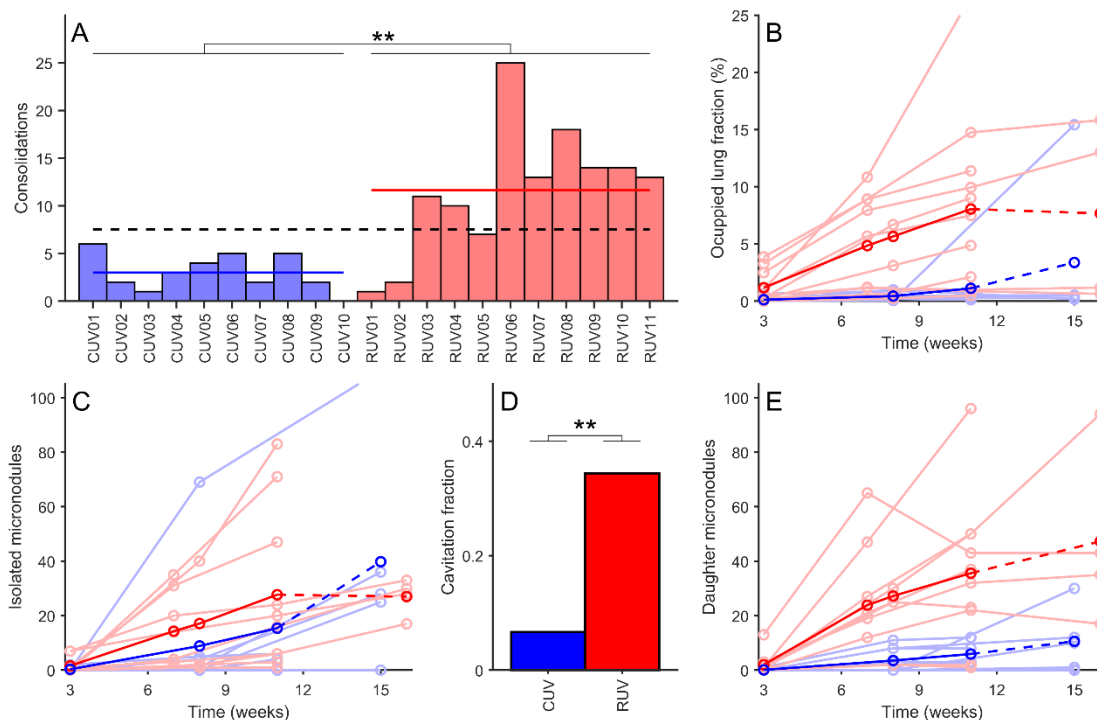


Figura 53. Gràfiques de barres i línies per l'anàlisi dels macacos no vacunats. Blau: cynomolgu; Vermell: rhesus. Diferència estadística significativa s'identifica (**). Línies de color discontinúes: etapes amb pèrdua de dades. A: Quantitat de condensacions en cada macaco; línia discontinúes: valor mitjà; línia blava: valor mitjà cynomolgu; línia vermella: valor mitjà rhesus. B: Evolució del percentatge del volum pulmonar ocupat. C: Evolució de la quantitat de micronoduls aïllats. Línia gruixuda: mitjana. D: Fracció de cavitació de les condensacions. E: Evolució de la quantitat de micronoduls associats. Línia gruixuda: mitjana

Cal remarcar que, contràriament als grups vacunats (que són mostres homogènies), els grups control són heterogenis en la fase final perquè una meitat finalitza amb un tercer escàner a la setmana 11 i l'altra meitat té un quart i últim escàner entre les setmanes 15-16. Així doncs, hi ha una pèrdua de dades que és deguda al propi disseny dels estudis de provinença així com a les morts prematures degudes a la tuberculosi. D'aquesta forma, la fase final està representada en la gràfica amb una línia discontinua i està conformada només per dades reals recollides (sense estimacions); per tant, l'estabilització de l'augment que es mostra és possible que tan sols sigui degut a una pèrdua de dades.

5.4.2. L'efecte de la vacunació i l'impacte de la seva via d'administració

Per començar l'apartat que avalua l'eficàcia del profilàctic, es mostren el nombre de lesions de cada grup experimental per cada adquisició de TC a la **Taula 8**. S'hi pot observar el total de lesions i la seva mitjana pel conjunt de macacos control i vacunats.

Taula 8. Quantificació de lesions totals per cada TC per grups experimentals.

	TC1	TC2	TC3	TC4
CUV	30	71	129	
CIDV	10	16	15	
RUV	149	505	725	389
RAEV	107	271	397	445
RIDV	80	231	434	680
Total control	179	576	854	389
Total vacunats	197	518	846	1125
Mitjana control	90	288	427	389
Mitjana vacunats	66	173	282	562

CUV: cynomolgus no vacunats; CIDV: cynomolgus vacunats; RUV: rhesus no vacunats; RAEV: rhesus amb vacuna inhalada; RIDV: rhesus amb vacuna intradèrmica.

Es posa de manifest una reducció del nombre de lesions, però en l'anàlisi estadística no s'identifiquen diferències significatives entre els grups control i vacunats.

Per continuar abordant la qüestió, es prossegueix amb una representació dels macacos vacunats que permet percebre l'escenari global. L'evolució de les lesions pulmonars es presenta de forma visual a la **Figura 54** on es reflecteix el curs de la infecció tuberculosa en cynomolgus i rhesus 21 setmanes després de l'administració del fàrmac profilàctic. S'aprecia que els cynomolgus vacunats desenvolupen un grau lleu i contingut de malaltia i que els rhesus mostren una progressió globalment similar als no vacunats.

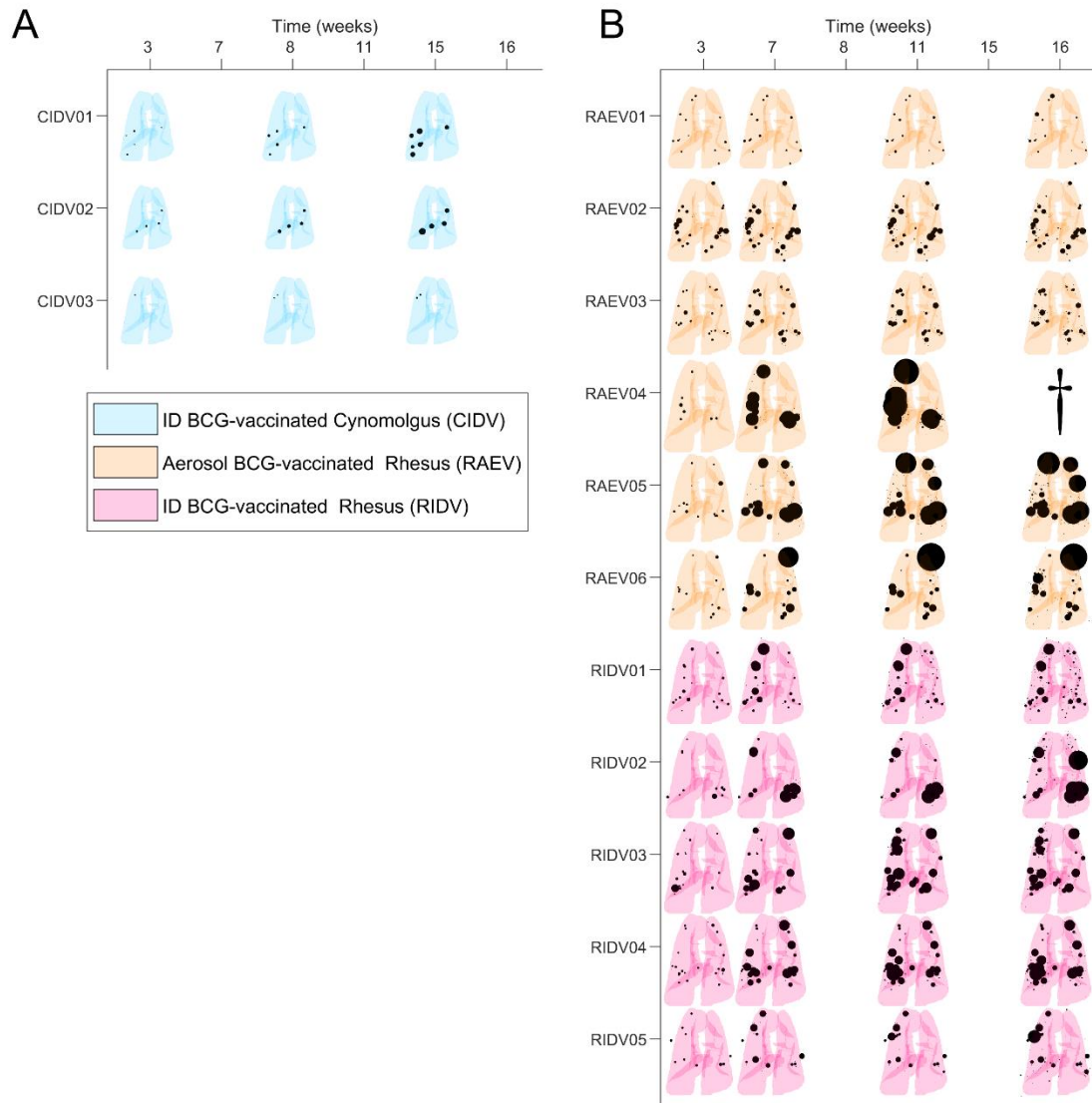


Figura 54. Esquema visual de l'afectació pulmonar tuberculosa en macacos cynomolgus i rhesus vacunats. El símbol † indica mort prematura.

Els pulmons dels individus estan adaptats a la mida real de cadascun d'ells, i estan remodelats prenent com a model la morfologia de RUV03. Les lesions es localitzen en un pla bidimensional (2D) d'acord a la seva situació segmentària recollida en la base de dades. No inclou informació sobre cavitació ni distància real fins a pleura.

En aquesta figura també es fa palès la diferència en el nombre d'individus que conformen cada grup, destacant que la mostra dels cynomolgus és petita.

En la **Figura 54 A** s'observa que tots els cynomolgus vacunats desenvolupen escasses lesions de petita mida, que són pràcticament inapreciables en la fase inicial i mostren un discret increment evolutivament.

Per contra, novament els rhesus vacunats desenvolupen una forma de malaltia tuberculosa abundant i progressiva **Figura 54 B**. Se'n destaca els individus RAEV04, RAEV05, RAEV06, RIDV02, RIDV03 i RIDV04, dels quals s'identifica obstrucció del bronqui principal esquerra en RAEV06 i RIDV02, i del dret en RAEV04. No obstant, també existeix oclusió del bronqui dret en RIDV01 i de l'esquerre en RIDV05, sense un increment rellevant de les lesions com succeeix en els altres macacos.

Tanmateix, alguns d'ells mostren una forma més continguda de la malaltia, tot generant en global força lesions però de petita mida. Queda perfectament exemplificat pel macaco RAEV01, però també són vàlids RAEV02, RAEV03 i RIDV05.

Seguidament es presenta la confrontació entre macacos control i vacunats per espècies. La **Figura 55** exposa en forma de gràfiques les dades recollides en els cynomolgus i permet comparar visualment el grup control i el vacunat. No es detecten diferències respecte a la mitjana de condensacions que desenvolupa cada cynomolgus, i hi ha un major nombre d'aquestes lesions en el grup control perquè conté més del triple de macacos, com es mostra a la **Figura 55 A**. L'evolució del volum de les lesions s'exposa en forma de percentatge pulmonar ocupat per lesions tuberculoses a la **Figura 55 B**, on s'observa que globalment es tracta de lesions petites que no afecten de forma rellevant el conjunt de l'espai pulmonar, excepte un cynomolgus no vacunat (CUV07). Com ja s'ha vist amb anterioritat (apartat 4.1.), gran part de les lesions dels cynomolgus vacunats corresponen a micronòduls perquè no són prou grossos com per ser considerats condensacions.

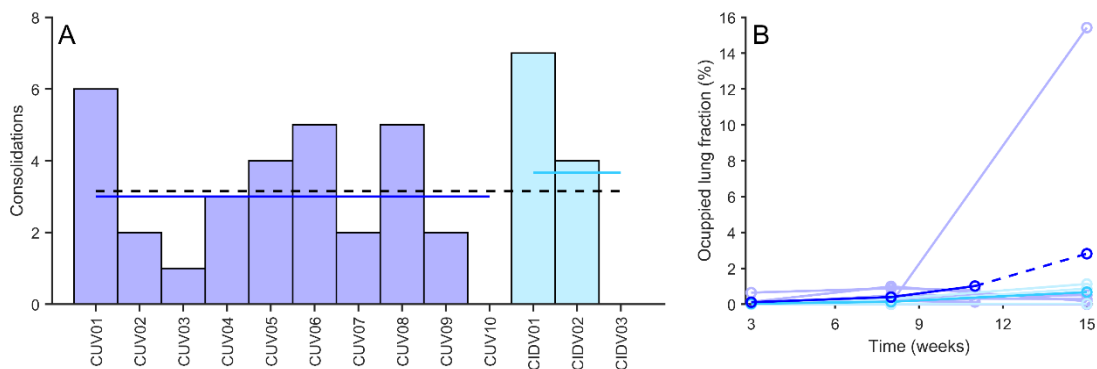


Figura 55. Gràfiques de barres i línies per l'anàlisi dels cynomolgus control (blau) i vacunats (cian). Línies de color discontinúes: etapes amb pèrdua de dades. A: Quantitat de condensacions en cada macaco; línia discontinua: valor mitjà; línia blava: valor mitjà cynomolgus; línia vermella: valor mitjà rhesus. B: Evolució del percentatge del volum pulmonar ocupat.

La **Figura 56** exposa en forma de gràfiques les dades recollides en els rhesus i permet comparar visualment els grups control i vacunats. No existeixen diferències significatives respecte les condensacions, micronòduls, taxa de cavitació ni ocupació pulmonar. Tanmateix, de forma desglossada, es poden apreciar tendències interessants com que els rhesus amb vacuna intradèrmica són els que presenten una mitjana de lesions per macaco més elevada (**Figura 56 A**) però els vacunats amb aerosol presenten major percentatge d'ocupació pulmonar per tuberculosi i per tant, genera lesions de major mida (**Figura 56 B**). Al seu torn, els rhesus control són els que presenten major percentatge de condensacions cavitades (**Figura 56 C**).

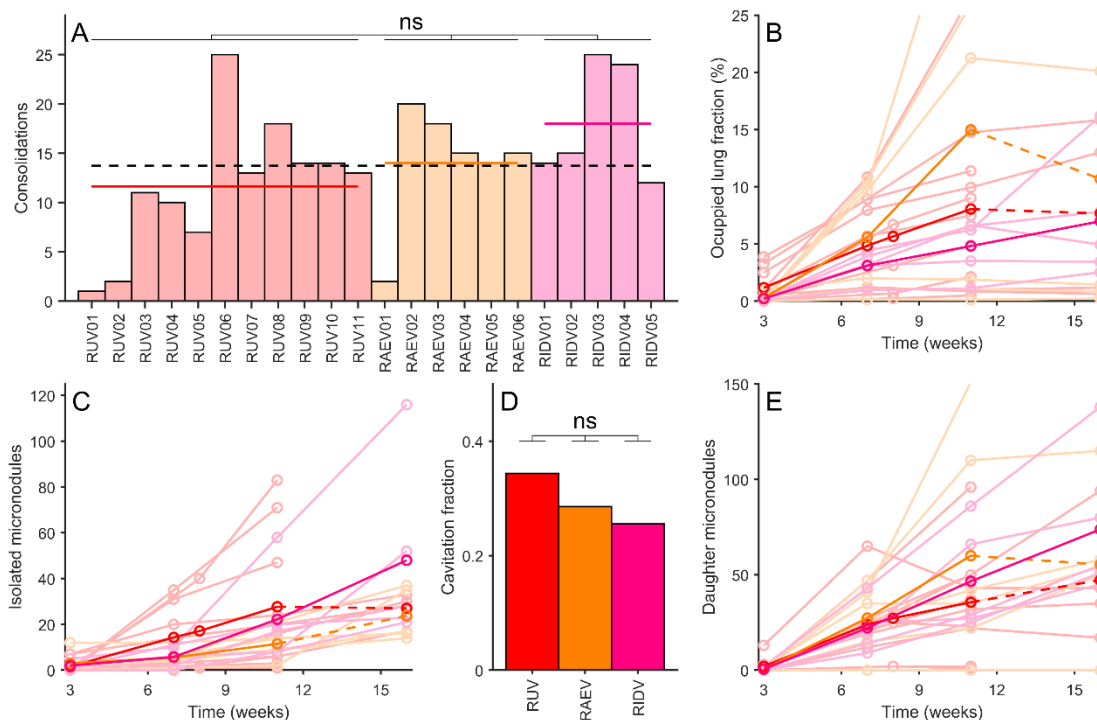


Figura 56. Gràfiques de barres i línies per l'anàlisi dels rhesus control i vacunats. Vermell: control; taronja: vacuna inhalada; magenta: vacuna intradèrmica. A: Quantitat de condensacions en cada macaco; línia discontinua: valor mitjà; línia blava: valor mitjà cynomolgus; línia vermella: valor mitjà rhesus. B: Evolució del percentatge del volum pulmonar ocupat. C: Evolució de la quantitat de micronòduls aïllats. Línia gruixuda: mitjana. D: Fracció de cavitació de les condensacions. E: Evolució de la quantitat de micronòduls associats. Línia gruixuda: mitjana

L'anàlisi de l'evolució del creixement de les condensacions es pot fer amb una normalització **Figura 57**, en què el volum màxim de cada lesió pren el valor de 1 i la resta es posicionen percentualment. S'aprecia que hi ha lesions que disminueixen el seu volum excepte els cynomolgus vacunats, en els que només s'observa creixement. No obstant, aquest decreixement es dona en condensacions de diferents macacos, sense que hi hagi individus que controlin la malaltia on predomini la disminució del volum de les lesions a l'estadi final, amb l'excepció de CUV01.

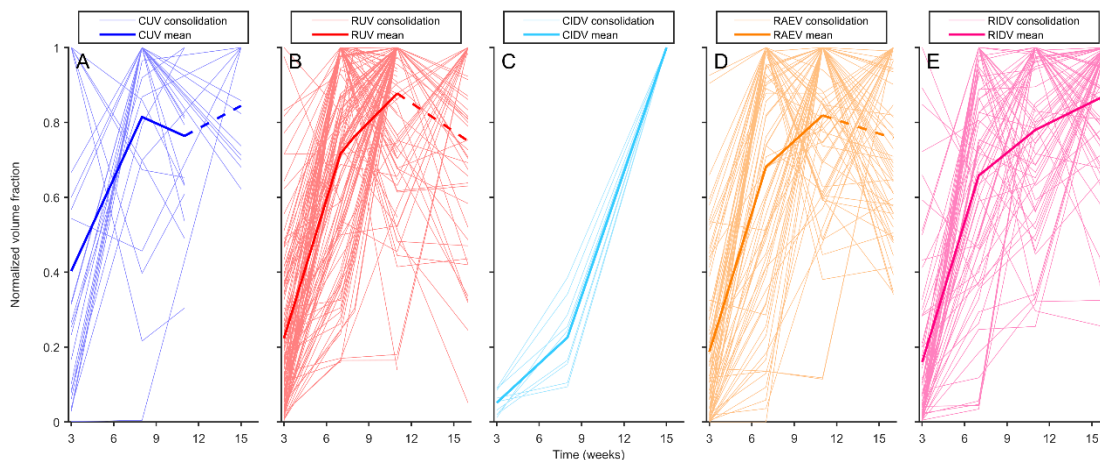


Figura 57. Normalització del creixement de les condensacions per cada grup experimental.

S'identifica un patró de creixement homogeni i equivalent entre tots els grups experimentals, amb l'excepció dels cynomolgus vacunats. La tendència general és un creixement ràpid durant la fase primerenca amb una estabilització relativa de la velocitat de creixement posterior; s'observa decreixement en la fase final en grups experimentals on hi ha pèrdua de dades i per tant, té un significat real incert.

Per contra, doncs, els cynomolgus vacunats presenten una velocitat de creixement alentida a la fase primerenca i una acceleració posterior.

La **Taula 9** exposa una anàlisi percentual dels subtipus de micronòduls respecte el total de lesions identificades en cada grup experimental.

Taula 9. Distribució de micronòduls. Nombre total i proporcions respecte el total de lesions de cada subtipus de micronòduls i per cada grup experimental.

EG	Nombre (n)	Percentatges (%)		Nombre (n)	
	Total lesions	M. Associats	M. Aïllats	M. Associats	M. Aïllats
CUV	322	23%	68%	75	218
CIDV	22	5%	50%	1	11
C	344	22%	67%	76	229
RUV	875	49%	37%	428	322
RAEV	646	66%	22%	424	141
RIDV	699	53%	35%	368	244
R	2220	55%	32%	1216	708

CUV: cynomolgus no vacunats; CIDV: cynomolgus vacunats; C: cynomolgus totals; RUV: rhesus no vacunats; RAEV: rhesus amb vacuna inhalada; RIDV: rhesus amb vacuna intradèrmica; R: rhesus totals.

Aquesta anàlisi torna a evidenciar que el pes del conjunt de lesions en els cynomolgus recau sobre els micronòduls aïllats, i en els rhesus recau sobre els micronòduls associats però de forma poc marcada, ja que el percentatge de lesions en aquests macacos queda més equilibrat.

A continuació, la distribució percentual dels subtipus de micronòduls es valora amb una taula de contingència (**Taula 10**), on es detecten associacions amb significació estadística. Així doncs, s'objectiva que els cynomolgus generen un percentatge major de micronòduls aïllats que els rhesus, o dit d'una altra forma, en els rhesus es dona un percentatge superior de micronòduls associats.

Destaquen les diferències significatives observades entre els dos grups de rhesus vacunats: els intradèrmics desenvolupen una major proporció de micronòduls aïllats, o bé, menor proporció de micronòduls associats.

També s'observa que els rhesus control generen un percentatge més elevat de micronòduls aïllats i més reduït dels associats que els rhesus amb vacuna inhalada, fet que no succeeix entre els rhesus control i els vacunats intradèrmics. Però tal i com s'ha esmentat, té un significat incert donada la pèrdua de dades en els no vacunats.

D'altra banda, no s'objectiven diferències significatives entre els cynomolgus control i vacunats, probablement per falta de potencia estadística degut al baix nombre de lesions (sobretot dels vacunats).

Taula 10. Taula de contingència. Diferències de la distribució dels micronòduls associats i aïllats basats en la seva proporció. Els números corresponen a valor de *p* amb test de Fisher.

EG	CUV	CIDV	C	RUV	RAEV	RIDV	R
CUV	ND						
CIDV	0,3057	ND					
C	ND	ND	ND				
RUV	ND	ND	ND	ND			
RAEV	ND	ND	ND	<0,0001	ND		
RIDV	ND	ND	ND	0,2431	<0,0001	ND	
R	ND	ND	<0,0001	ND	ND	ND	ND

ND: No calculat. CUV: cynomolgus no vacunats; CIDV: cynomolgus vacunats; C: cynomolgus totals; RUV: rhesus no vacunats; RAEV: rhesus amb vacuna inhalada; RIDV: rhesus amb vacuna intradèrmica; R: rhesus totals.

A la Taula 11 s'exposen dades dels rhesus, que tot i que ja s'han anat presentant al llarg de l'apartat, es mostren aquí de forma concentrada per facilitar la seva valoració.

Taula 11. Anàlisi de lesions en rhesus.

	Condensacions			Micronòduls			
	n	Me	Volum final	Associats n	Assoc. Me	Aïllats n	Aïllats Me
RUV	125	13	1.593	428	36	319	30
RAEV	81	15	2.278	424	54	137	19
RIDV	87	15	0.986	638	55	241	29
Rhesus	293	14	1.339	1220	51	697	29

n: nombre; Me: mediana per macaco; RUV: rhesus no vacunats; RAEV: rhesus amb vacuna inhalada; RIDV: rhesus amb vacuna intradèrmica; rhe: rhesus totals.

Els dos grups vacunats mostren una mediana idèntica o similar de condensacions i del nombre de micronòduls associats per cada macaco. Tanmateix, els vacunats amb aerosol desenvolupen lesions de major mida mentre generen una menor quantitat de micronòduls aïllats.

De totes formes, la comparativa del volum final de les condensacions s'ha de fer amb precaució. Cal tenir en compte que la pèrdua de dades es dona sobretot en els rhesus control, que alhora és el grup amb major nombre d'animals i que per tant, els rangs de mides més extrems queden diluïts; per un altre costat, si es revisa la **Figura 54**, s'observa que els RAEV són pocs i alguns animals amb lesions grans, que prenen més influència en el càlcul de mitjanes.

Per acabar aquest apartat, s'exposa una valoració de les lesions transicionals desglossades per les diferents etapes i els grups experimentals. Es mostren a la **Taula 12**, on el seu nombre es contextualitza en referència al nombre de condensacions identificades en la segona TC de cada etapa.

Taula 12. Lesions transicionals. Quantitat de lesions transicionals respecte el nombre de condensacions i percentatge en els grups experimentals exposades per etapes.

	TC1 a TC2		TC2 a TC3		TC3 a TC4	
CUV	15/27	56%	1/29	3.4%		
CIDV	9/9	100%	4/10	40%		
C	24/36	66.7%	5/39	12.8%		
RUV	23/120	26.7%	2/124	1.6%	2/58	3.45%
RAEV	39/77	50.7%	1/80	1.3%	0/66	0%
RIDV	50/66	75.8%	7/85	8.2%	5/87	5.8%
R	112/263	42.6%	10/289	3.5%	7/211	3.3%
Total	136/299	45.5%	15/328	4.6%		

CUV: cynomolgus no vacunats; CIDV: cynomolgus vacunats; C: cynomolgus totals; RUV: rhesus no vacunats; RAEV: rhesus amb vacuna inhalada; RIDV: rhesus amb vacuna intradèrmica; R: rhesus totals.

Per aquesta avaluació, el nombre de condensacions no és constant per cada grup experimental, ja que es tenen en compte lesions de nova aparició en els escàners de seguiment. En cada casella s'exposa el nombre de lesions transicionals respecte el total de condensacions per cada etapa i també el percentatge que representen.

Així doncs, en la fase primerenca s'observa que, grollerament, la meitat de les lesions són transicionals, és a dir, que la meitat de les condensacions són tan petites inicialment que es categoritzen com a micronòduls, i és equivalent entre tots els grups experimentals. En la fase intermèdia destaca de forma significativa que el percentatge de lesions transicionals és encara elevat (40%) en els cynomolgus vacunats, i també s'observa una tendència rellevant en els rhesus vacunats amb BCG intradèrmica, amb un percentatge superior al 8%. Les lesions transicionals presenten un percentatge molt baix durant la fase intermèdia en els macacos no vacunats i els rhesus vacunats amb BCG aerosolitzada, similar al percentatge de lesions transicionals de tots els macacos en la fase tardana (on només hi ha rhesus).

5.5. L'impacte de la pleura en la contenció de la tuberculosi pulmonar

L'avaluació de la relació entre condensacions i la pleura es mostra a la **Figura 58**. El grup de les lesions més petites (fins a 0.5 cc, que conformen el grup per mida més nombrós) principalment no estan en contacte, sobretot en els rhesus (que al seu torn, són els macacos amb els pulmons més grans). A partir d'aquest volum, les condensacions majoritàriament contacten amb la pleura en tots els grups experimentals.

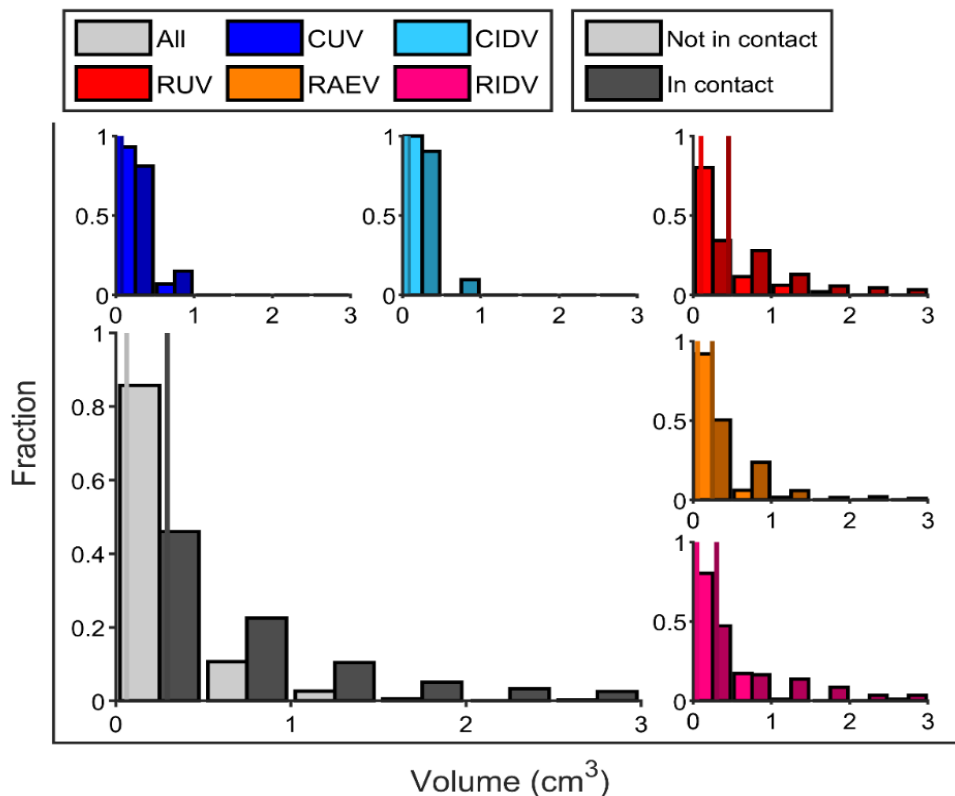


Figura 58. Gràfica de barres que mostra les proporcions de lesions que contacten o no amb la pleura distribuïts per rangs de volum de les condensacions, per cada grup experimental.

Línia vertical: mitjana de condensacions en contacte (gris clar) i no en contacte (gris fosc) amb la pleura. CUV: cynomolgi no vacunats; CIDV: cynomolgi vacunats; RUV: rhesus no vacunats; RAEV: rhesus amb vacuna inhalada; RIDV: rhesus amb vacuna intradèrmica; All: macacos totals.

Per un altre costat, s'ha valorat si el contacte amb la pleura modifica el comportament de la condensació. S'ha fet un seguiment de les lesions entre dos escàners consecutius, tot focalitzant-se en la seva distància amb la pleura i analitzant simultàniament la seva variació de la mida. Així doncs, es detecten les lesions que es mantenen allunyades de la pleura, les que hi continuen en contacte i finalment aquelles que canvien i hi fan contacte, relacionat a increments o disminucions del volum de cada lesió, com s'exposa visualment en un diagrama de *boxplot* a la **Figura 59**.

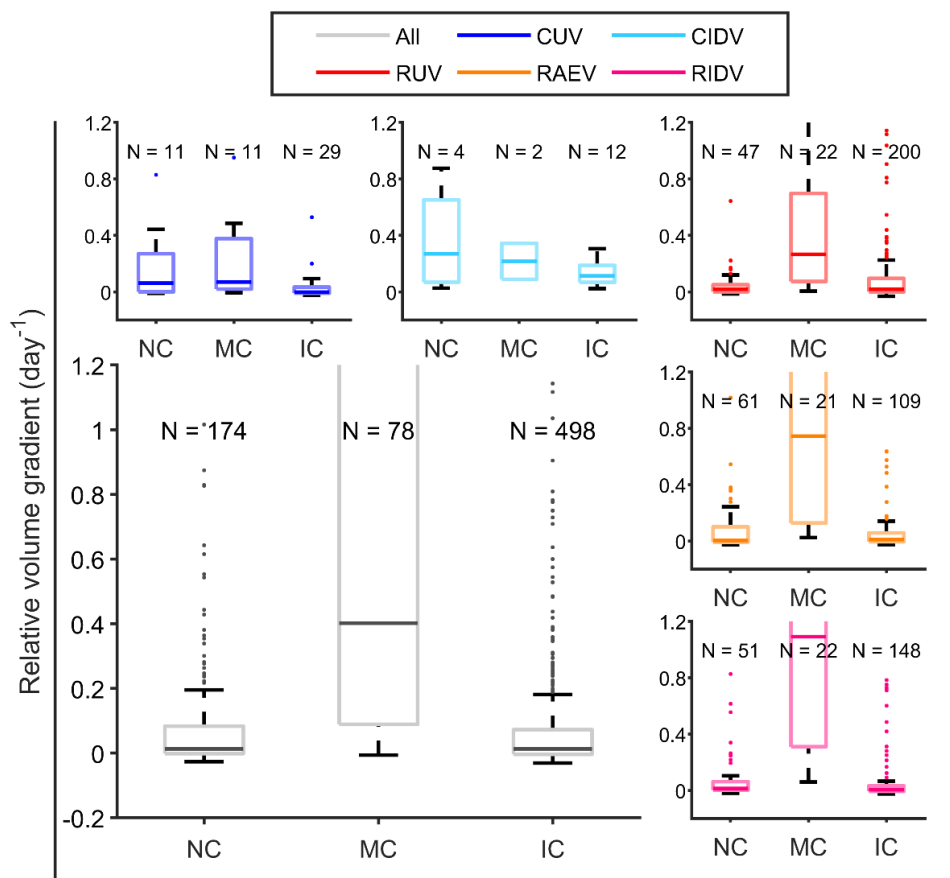


Figura 59. Diagrama de *boxplot* que mostra la relació entre les condensacions i el contacte pleural, per grups experimentals.

NC: no contacte; MC: fan contacte; IC: en contacte; CUV: cynomolgus no vacunats; CIDV: cynomolgus vacunats; RUV: rhesus no vacunats; RAEV: rhesus amb vacuna inhalada; RIDV: rhesus amb vacuna intradèrmica; All: macacos totals.

S'aprecien diferències pràcticament significatives (p value = 0.04) en els cynomolgus per aquelles condensacions que persisteixen en contacte amb la pleura, ja que resten amb estabilitat del volum, és a dir, no continuen augmentant de mida. No s'identifica cap impacte de la pleura sobre les condensacions en els rhesus, que continuen globalment augmentant de mida. Per tant, es detecta una constricció o reducció de la mida de les lesions atribuïble al contacte amb la pleura en els cynomolgus; no així en els rhesus.

Adicionalment, les condensacions que fan contacte pleural representen el conjunt menys nombrós i són també les que mostren una major variació del seu volum tot exhibint doncs una alta taxa de creixement.

6. DISCUSSIÓ

Escenari global

La tuberculosi és una malaltia infecciosa de transmissió aèria que afecta sobretot els pulmons i que té una elevada prevalença, especialment en països de rendes baixes i en persones VIH+. És una de les principals causes de mortalitat mundial i ha causat més morts que cap altra malaltia infecciosa en solitari durant segles. L'assoliment del seu control, i fins i tot l'ideal de la seva erradicació, obliga a millorar les estratègies en diagnòstic, profilaxis i tractament.

Aquesta fita crea la necessitat d'establir models experimentals animals validats que permetin simular la malaltia en humans, on els NPH tenen un paper cabdal, així com eines de monitorització i quantificació de la tuberculosi per poder comparar diferents fàrmacs i nous protocols. És en aquest camp on les tècniques d'imatge estan demostrant una gran eficiència i són capaces d'identificar i mesurar la malaltia sobretot a nivell pulmonar, i encara més, es preveu un desenvolupament i expansió futura amb la implementació de la intel·ligència artificial. En el moment actual, les imatges diferencien malaltia activa de latent o crònica en una percentatge alt dels casos, i hi ha descrits des de fa anys inclús dècades uns patrons radiològics en humans que es relacionen amb alta probabilitat de tuberculosi activa pulmonar: els nòduls cavitats i el patró d'afectació de petita via aèria en "arbre en brot".

Tanmateix, les tècniques d'imatge encara no estan àmpliament consolidades en investigació i es detecta una manca d'anàlisi profunda, en base a la semiologia radiològica, que sigui capaç de trobar i afegir nous patrons de contenció o progressió de la malaltia, especialment enfocats cap als propis models experimentals. Per tant, la identificació de nous patrons radiològics amb valor pronòstic es pot considerar un factor clau per detectar diferències en estudis comparatius. A més, es podria afegir que aquesta detecció fos el més precoç possible per tal d'escurçar els temps necessaris de monitorització en els treballs experimentals i, per tant, reduir el consum de recursos en les investigacions. Fins al moment, però, aquests estudis d'imatge fan anàlisis globalment simplificades on s'identifiquen i compten lesions més aviat amb l'objectiu de comprovar que les tècniques detecten la tuberculosi pulmonar així com el nivell d'afectació pulmonar (o càrrega tuberculosa) en els models animals.

Com s'ha comentat, un dels pilars fonamentals de la lluita contra la malaltia són els fàrmacs profilàctics antituberculosos. La BCG és una vacuna centenària però continua sent la única aprovada i és eficaç per prevenir les formes més greus de la malaltia, tot i que presenta disparitat en la prevenció de la tuberculosi pulmonar. Aquest vaccí és motiu d'investigacions ja des dels anys 1960s, que en l'actualitat estan enfocats en l'avaluació de diferents rutes d'administració, i aporten un volum rellevant d'estudis amb NHP. No obstant, no hi ha massa experiència acumulada de la valoració de la BCG fonamentada en imatges diagnòstiques en model animal, amb especial interès en macacos, tot i que han sorgit alguns estudis durant els últims anys en relació a rutes alternatives d'administració. White et al. (2020)(120) analitza imatges TC en macacos rhesus i és dels estudis que més aprofundeix en l'anàlisi radiològica, on usa un *score* qualitatiu i quantitatiu per l'estimació de la càrrega de malaltia tuberculosa pulmonar (253); Sharpe et al. (2016) (138) i més recentment Sibley et al. (2021)(229) utilitzen la RM per determinar la càrrega de tuberculosi en pulmons *ex-vivo* de macacos, a través de la tècnica d'estereologia (187), així com un comptatge dels nòduls i lesions coalescents; Darrah et al. (2020) (137) i DiFazio et al. (2016) (255) adquireixen PET-TC en macacos i avaluen el grau d'activitat tuberculosa, tot mesurant l'avidesa global del parènquima pulmonar per la FDG, així com un comptatge de lesions (a les que anomenen granulomes). A demés, existeixen algunes experiències que inclouen d'altres models animals, com Kraft et al. (2004) (186), que analitza pulmons *ex-vivo* de conillets d'Índies amb RM i descriu la seva aparença per imatge, la distribució anatòmica de les lesions i un comptatge dels nòduls.

[Escenari concret de l'estudi d'investigació actual](#)

El present estudi té com a objectiu la identificació de patrons radiològics i valoració de l'impacte de la vacuna BCG en la tuberculosi pulmonar, tot aglutinant macacos procedents d'estudis experimentals per aconseguir una mostra amb major nombre d'animals, més representativa i amb major potència estadística. Per dur-lo a terme, es fa una recollida d'imatges de TC realitzades *in-vivo* a macacos control i a macacos vacunats que han estat infectats experimentalment amb tuberculosi.

Per tant, aquests escàners provenen de diferents estudis, on a cada animal se'ls han adquirit de 3 a 4 escàners de monitorització al llarg de 16 setmanes (com a màxim) i que, per tant, permeten estudiar el comportament de la tuberculosi pulmonar amb criteris morfològics i de temporalitat.

Per un altre costat, es compta amb un nombre inusualment elevat d'individus NHP gràcies a l'addició dels diversos treballs. Aquest fet és poc freqüent en estudis experimentals amb models animals superiors i es considera que aquest treball és rellevant i d'alt valor científic, a pesar de les limitacions.

En l'estudi actual es valoren ítems radiològics amb major profunditat i detall del que s'ha realitzat anteriorment amb els resultats publicats a Sharpe et al. (2016), White et al. (2020) i White et al. (2021) (120,224,232) principalment ampliant les variables (referents a les imatges de TC) i afegint paràmetres d'evolució temporal. Per tant, es tracta d'una extensió dels propis estudis experimentals d'origen, enfocada cap a l'estudi de la tuberculosi per la imatge.

Cal destacar que els macacos són una mostra homogènia. Els animals inclosos es consideren equivalents ja que estan vacunats amb el mateix fàrmac profilàctic, han estat infectats amb el mateix mètode i amb dosis equivalents d'inòcul amb la mateixa soca de *M. tuberculosis* i, a més, han estat cuidats i tractats en idèntiques condicions.

Malauradament, els grups experimentals amb els que es treballa, però, resulten heterogenis, amb un nombre menor de cynomolgus (sobretot el grup vacunat) i una sobre representació de rhesus control, així com cert grau de disparitat temporal entre escàners de monitorització. Tanmateix, s'ha de contextualitzar que són treballs d'alta transcendència científica i ètica que consumeixen molts recursos i que s'han d'ajustar cap al mínim necessari de macacos perquè l'estudi sigui vàlid estadísticament. A més, hi ha menys estudis que tinguin el cynomolgus com a model animal NPH que de rhesus, fet que es reflexa també a l'hora de configurar la mostra actual.

En termes de l'anàlisi de les imatges TC, la seva valoració s'ha basat en la semiologia radiològica de la tuberculosi (àmpliament tractada en la literatura radiològica en humans) així com en la caracterització descrita als estudis amb models de macacos i en especial, els ítems desenvolupats al score publicat per Sharpe et al. (2018) (253).

La planificació inicial del present treball, amb l'anàlisi preliminar de les imatges per tal de definir les variables radiològiques concretes, va conduir cap a la focalització en els micronòduls per tal de fer una classificació més profunda d'aquests, amb la idea

principal de fer-la en funció de la seva densitat (calci o no) així com de la seva localització i distribució en el parènquima pulmonar.

Per un costat, es pretenia identificar els micronòduls calcificats ja que en imatges TC de tuberculosi és una troballa habitual, per tal de classificar els micronòduls en granulomes immadurs (no calcificats) o madurs (calcificats) (72). Però no se'n van detectar en cap dels escàners.

Després del desconcert inicial, la literatura consultada va aportar el fet que en les TC realitzades a macacos amb tuberculosi, la majoria dels granulomes calcificats s'identifiquen a partir de la setmana 20 post-exposició al bacil (238), i per tant, es va abandonar aquesta idea inicial.

Per un altre costat, es va decidir classificar els micronòduls en funció de la seva localització i distribució en els pulmons. L'anàlisi preliminar de les imatges va permetre percebre que es podien dividir en funció de si estaven agrupats o aïllats, valorant la seva proximitat o associació amb les condensacions, fet que no es descriu prèviament en la literatura publicada en el nostre coneixement. S'intuïa que aquesta classificació dels micronòduls podria aportar troballes rellevants, que podria relacionar-se amb el nivell d'inflamació i alhora podria ser coherent amb el Model de Bombolles (65). Simultàniament, es fa una localització espacial anatòmica (en base als segments broncopulmonars).

La semiologia de la tuberculosi pulmonar per imatge TC inclou la pneumònia broncocèntrica o l'equivalent patró radiològic "d'arbre en brot" o "*tree-in-bud*" (en anglès) com una troballa rellevant (80,195,196,200,202,259). Tanmateix, és difícil fer el seu seguiment perquè els seus marges són massa imprecisos per una valoració quantitativa (més enllà de qualitativa dicotòmica sí / no), i a més, no es diferencien sempre de forma clara de la resta de les lesions tuberculoses i en especial, dels micronòduls; per tant, són difícils de monitoritzar en estudis evolutius degut a la seva complexitat morfològica i existeix alta possibilitat d'error en la seva mesura. Per aquestes raons, no es van incloure com a variable radiològica les lesions "d'arbre en brot" en el present treball.

Adicionalment, també esmentar que en algunes investigacions experimentals prèvies es valora la confluència o coalescència de les lesions per imatge, com és el cas de Sharpe et al. (2018) (253). No obstant, és un paràmetre complex de mesurar i el propi estudi esmentat ja no l'inclou en la

seva proposta de *score*; per tant, tampoc s'ha inclòs com a descriptor en el present treball. Tanmateix, és un paràmetre exposat a la literatura tuberculosa que es vincula amb el creixement de les lesions i progressió de la malaltia, i és coherent amb el Model de Bombolles (65).

També s'ha d'exposar la decisió de no incloure per l'anàlisi estadística el macaco rhesus no vacunat RUV05, degut a que desenvolupa tuberculosi miliar (disseminació hematògena amb afectació pulmonar) enlloc de tuberculosi pulmonar amb disseminació broncopulmonar, ja que corresponen a entitats tuberculosos diferents i donen lloc a patrons d'afectació pulmonars propis i identificables. La seva inclusió, de totes formes, suposaria un biaix pel gran nombre de micronòduls que aporta (més de 1000).

6.1. Identificar patrons de distribució de la malaltia tuberculosa pulmonar en imatges TC

Els rhesus mostren una progressió globalment descontrolada de la malaltia tuberculosa pulmonar i els cynomolgus mostren contenció d'aquesta, en conformitat amb el que ja està descrit prèviament a les publicacions de Sharpe et al. (2016), White et al. (2020) i White et al (2021) (120,224,232) (basats en els mateixos estudis experimentals), així com amb la resta de literatura al respecte (210,211,222–225,228,229,260). Això corrobora que de forma natural les diferents espècies o genotips de macacos presenten una resposta immunitària variable, on el cynomolgus d'origen indonesi és capaç d'enfrontar-se a la infecció per *Mycobacterium tuberculosis* més eficaçment que el rhesus d'origen indi.

La caracterització inicial de les dades recollides posa de manifest una distribució homogènia de les condensacions dins del parènquima pulmonar, sense tendència a desenvolupar més condensacions al pulmó dret o esquerra. Aquest fet es pot vincular al mètode d'infecció

experimental del *M. tuberculosis*, ja que la seva aerolització provoca una distribució difusa de l'inòcul tal i com succeeix en la infecció natural. D'altra forma, les infeccions experimentals intratraqueal o intrabronquial sí que condicionen lateralitat de la infecció.

Adicionalment, s'ha identificat una tendència a major càrrega lesional al pulmó esquerre (major volum ocupat per malaltia tuberculosa), que en algunes ocasions s'associa a obstrucció del seu bronqui principal com a conseqüència de masses adenopàtiques mediastíniques i hilars. La obstrucció bronquial significativa (més del 70%) està associada a major expansió de la tuberculosi pulmonar homolateralment i seria atribuïble a desregulació en la dinàmica de moviment respiratori i a drenatge insuficient dels fluids alveolars%). Amb l'estenosi significativa bronquial també es pot observar atelèctasi o hiperinsuflació (195,196,253). Afegir que el bronqui principal esquerre és més llarg, tot facilitant la seva oclusió. Per tant, la oclusió bronquial probablement sigui un factor de mal pronòstic i és principalment secundari al desenvolupament de masses adenopàtiques mediastíniques i hilars; el seu control podria comportar evolucions més favorables.

En l'anàlisi quantitativa, els rhesus mostren moltes més lesions que els cynomolgus amb significança estadística, tant condensacions com micronòduls. En conseqüència, s'identifica una quantitat superior de condensacions per cada rhesus, que no obstant mostren un rang ampli de variabilitat. A la vegada, aquestes condensacions són més voluminoses i ocupen major proporció del parènquima pulmonar amb un increment evolutiu.

En la fase primerenca es destaca que els rhesus control ja generen lesions de petita-moderada mida i, en l'extrem contrari, els cynomolgus vacunats no generen condensacions.

El desenvolupament de lesions voluminoses després de la infecció amb *M. tuberculosis* requereix d'una resposta inflamatòria forta i intensa, com es descriu als estudis de Marzo et al. (2014), Prat et al. (2016) i Cardona (2015, 2016) (65,258,261,262), que donen lloc a extenses lesions exsudatives típiques de la tuberculosi activa progressiva, en concordança amb el model de Bombolles. Els rhesus produeixen lesions molt inflamatòries amb alta infiltració de neutròfils, fet que es pot relacionar amb la progressió de la malaltia i la generació de micronòduls associats. Per contra, els cynomolgus desenvolupen lesions amb poc component inflamatori i més contingudes

que es pot relacionar amb una capacitat menor de produir reinfeccions endògenes i de generar micronòduls associats.

El present treball també introdueix el concepte de les lesions transicionals, que corresponen a les condensacions que inicialment presenten la mida d'un micronòdul i no poden ser etiquetades encara com a tals. En el fons es tracta de la valoració evolutiva de la mida de les condensacions però, degut al disseny de l'estudi, corresponen a una variable diferent per sota d'un llindar establert. Tot i que en una anàlisi simplificada aquestes condensacions s'haurien començat a valorar en la següent TC consecutiva, com que és possible fer una identificació precoç i un seguiment temporal, s'opta per incloure aquest terme ja que el treball es concep des d'una perspectiva biològica, que permet percebre millor el comportament de la malaltia. Es posa de manifest que pràcticament la meitat de les condensacions, abans de desenvolupar-se, són lesions transicionals en la fase inicial. Els rhesus control presenten menys lesions transicionals que la resta de rhesus, fet atribuïble a que hi ha poc control de la infecció i les lesions detectades en el primer escàner a la tercera setmana ja són prou grans com per anomenar-les consolidacions.

Així doncs, les lesions transicionals permeten valorar una progressió o contenció de la tuberculosi que es vincula amb la velocitat d'evolució, ja que una estabilitat de les lesions transicionals comporten una restricció del seu creixement i per tant, un control de la malaltia, com es detalla ens apartats 5.2. i 5.4.2.

6.1.1. Detall de la distribució dels micronòduls

Globalment hi ha més micronòduls associats que aïllats, tot i que està influenciat pel gran nombre d'aquestes lesions en els rhesus, fet que suposaria un biaix.

Respecte la distribució dels micronòduls, es detecta un comportament diferent entre ambdues espècies ja que els rhesus desenvolupen significativament una majoria de micronòduls associats, i els cynomolgus, per contra, de micronòduls aïllats. Això es demostra en les anàlisis qualitatives i percentuals, on també s'identifica un nombre molt superior de micronòduls per animal en els

rhesus així com un rang ampli de distribució en ambdues espècies. També es pot expressar com a ràtio Micronòduls associats / Micronòduls aïllats, que és de 1.32 pels rhesus i 0.34 pels cynomolgus.

D'aquesta forma, un domini dels micronòduls associats, que equival a una ràtio associats / aïllats > 1 , presenta pitjor pronòstic. De la mateixa manera, una proporció major de micronòduls aïllats respecte els associats, que equival a una ràtio associats / aïllats < 1 , es relaciona amb contenció de la malaltia.

És interessant apreciar que en la fase primerenca, i al contrari del succeeix subsegüentment, tots els grups de macacos presenten un major percentatge de micronòduls aïllats respecte els associats. Però sobretot és un comportament magnificat en els grups vacunats, tant rhesus com cynomolgus, i per tant, la contenció inicial de la malaltia és un efecte atribuïble a la vacunació (tal i com es mostrava a la **Figura 48**).

Per tant, la presència d'una proporció major de micronòduls associats que d'aïllats correspon a un nou patró radiològic que es vincula amb progressió de la malaltia tuberculosa.

6.1.2. La relació entre les condensacions i els micronòduls associats.

Les valoracions comparatives entre diferents variables demostren que, en global, a major volum de condensació, major nombre de micronòduls associats; de la mateixa manera, a major volum pulmonar ocupat per lesions tuberculososes, major és el nombre de micronòduls aïllats, i en ambdós casos de forma estadísticament significativa. Així doncs, l'empitjorament de les condensacions es vincula fortament a l'empitjorament dels micronòduls i es contextualitza dins de la progressió de la malaltia tuberculosa pulmonar.

La investigació feta combinant diverses variables ha posat de manifest que el binomi format per les condensacions i els micronòduls associats és d'alta transcendència. Els rhesus desenvolupen una proporció molt majoritària d'aquesta combinació de lesions amb una diferència significativa

respecte els cynomolgus. A més, els cynomolgus vacunats en generen significativament menys que els no vacunats. La lesió complexa "condensacions amb micronòduls associats" és un nou element a avaluar i que implica pitjor evolució de la malaltia tuberculosa, ja que hi ha una correlació entre la seva absència i formes de tuberculosi contingudes, així com la seva presència i formes de tuberculosi amb afectació pulmonar avançada.

Per tant, les condensacions amb micronòduls associats constitueixen un nou patró radiològic que permetria pronosticar l'evolució de la malaltia tuberculosa pulmonar. La seva monitorització ha de permetre identificar els individus amb progressió o descontrol de la malaltia, inclús de forma precoç, i pot ser una variable vàlida en estudis de valoracions comparatives entre nous profilàctics i protocols terapèutics. D'aquesta forma, del present estudi es desprèn un patró radiològic per TC que s'associa a progressió de la malaltia.

El complexe lesional de condensacions amb micronòduls associats és congruent amb les reinfeccions endògenes exposades en la Hipòtesi Dinàmica (60) i amb el Model de Bombolles de sabó (65) i representen la generació de nous focus infecciosos al voltant de la condensació inicial. Aquesta lesió original (condensació) genera focus de noves infeccions al seu voltant (micronòduls associats), i aquests són atribuïbles a fenòmens de reinfecció endògena amb disseminació bronquial deguda a nous inòculs infecciosos generats amb la tos i amb els fluxos aeris de la pròpia respiració. Els nous inòculs es poden formar a partir dels mateixos focus amb tuberculosi activa o bé procedir dels productes inflamatoris-infecciosos que es troben en els fluids broncoalveolars de drenatge i que contenen, entre d'altres, macròfags espumosos amb *M. tuberculosis* viables (encara que siguin dorments). Així doncs, donen lloc a nous nuclis infecciosos satèl·lit al voltant de la condensació mare i que al seu torn poden créixer i fer coalescència entre ells, tot desenvolupant condensacions de gran mida, tal i com s'exposa en el Model de Bombolles de sabó.

Els processos que promouen la disseminació i la conformació de grans lesions tuberculoses condueixen al fracàs de l'eficàcia de la resposta immune i, en conseqüència, a la tuberculosi activa de curs progressiu. Tal i com ja exposa Prats et al. (2016) (65) la disrupció d'una resposta inflamatòria exagerada, les reinfeccions endògenes i la confluència de lesions comporten el descontrol de la malaltia pulmonar.

El present treball aporta un patró radiològic congruent amb aquests tres factors locals implicats en la progressió de la malaltia, i per tant, podria predir l'evolució de la seva progressió així com una potencial utilitat en l'avaluació comparativa de fàrmacs profilàctics i terapèutics per futurs estudis. A més, el complex lesional condensacions amb micronòduls associats és una conformació radiològica que podria ser distingible amb anàlisis d'intel·ligència artificial, tot facilitant-ne la valoració de gran quantitat d'imatges de forma més ràpida, precisa i reproduïble que amb mètodes semi-automàtics i automàtics de mesura.

Per concloure l'apartat de patrons de distribució de malaltia tuberculosa per imatge, es destaca que els micronòduls associats són claus: estan implicats en els dos nous patrons radiològics identificats i que s'associen a progressió de malaltia tuberculosa pulmonar.

6.2. La cavitació de les condensacions

La cavitació en la tuberculosi és un fenomen relacionat amb la progressió de la malaltia i amb pitjor pronòstic (44,54–58,194) ja que implica necrosi abundant del parènquima pulmonar amb intensa activitat infecciosa i inflamatòria, que es vinculen a major càrrega bacil·lar i per tant, major taxa de contagiositat tot convertint-se en un problema de salut pública (61). A més, les cavitacions no estan vascularitzades i no hi penetra el tractament antibiòtic amb pitjors taxes de resposta al tractament. Per tant, la detecció de la cavitació és un paràmetre important per definir el pronòstic, aplicar mesures més dràstiques per la prevenció de la disseminació poblacional i re-adequació del protocol terapèutic si s'escau.

La taxa de lesions cavitades en macacos rhesus al nostre estudi està al voltant del 35%, que concorda amb la incidència reportada a la literatura en NHP i que es mou en un ampli rang del 0-63% (54). Tanmateix, no s'han apreciat diferències en la distribució de la cavitació, tot i que en la

literatura es descriu una major freqüència als lòbuls superiors (54,195,196), però són conclusions que s'extreuen principalment d'estudis amb humans i que és possible que no siguin vàlids en macacos.

Destaca que la cavitació s'associa de forma significativa al volum de les lesions, de manera que a major volum, major probabilitat que aparegui; es dona especialment en consolidacions majors de 2 cc, on més de la meitat de les lesions pateixen cavitació. Tot i que no és estadísticament significatiu, es detecta que els rhesus amb vacuna intradèrmica tendeixen a una menor taxa de cavitació i, alhora, generen condensacions més petites que la resta de rhesus; tot i ser incert, podria ser degut a protecció oferta per la vacuna.

Únicament s'identifica un cynomolgus control en el què cavitaven les condensacions i correspon a un macaco amb molta malaltia tuberculosa.

6.3. L'efecte de la vacuna BCG en macacos rhesus i cynomolgus

6.3.1. Evolució natural de la tuberculosi pulmonar

Els grups control o no vacunats de macacos rhesus i cynomolgus són molt interessants perquè permeten contemplar la progressió natural de la malaltia (tot tenint en compte que es tracta d'una infecció deliberada realitzada experimentalment), aportant informació valuosa que ha de permetre avançar en el coneixement de la patogènia tuberculosa.

S'observa que els rhesus desenvolupen una càrrega significativament més elevada de tuberculosi pulmonar, en molts casos desbocada, i que els cynomolgus són capaços en general de mantenir la infecció per *M. tuberculosis* en un nivell baix de progressió, amb un lent avanç. Per tant, com ja s'ha esmentat prèviament i en concordança amb la literatura, els cynomolgus contenen la malaltia de forma innata i sense conèixer-ne clarament les causes.

Els rhesus mostren una forma de tuberculosi activa i ràpidament progressiva en tots els individus estudiats, amb un creixement accelerat en etapa intermèdia i certa estabilització als estadis

tardans, si bé és cert que alguns d'ells aconseguen alentir la velocitat i assimilar-se a la infecció dels cynomolgus menys controladors. Tanmateix, la majoria progressa veloçment i alguns d'ells de forma catastròfica.

Contràriament i molt interessant, un dels cynomolgus control mostra tuberculosi latent (CUV10), ja que no fa lesions objectivables en estudis d'imatge però es demostra infecció per conversió del PPD. La resta dels cynomolgus mostren formes de tuberculosi activa i lentament progressiva. Aquestes troballes concorden amb la literatura prèvia en què es descriu que els cynomolgus mostren un rang més ampli de malaltia pulmonar, de forma més anàloga als humans que no pas els rhesus, tot i que la taxa de tuberculosi latent estigui descrita fins a un 60% (210,223,228) i en humans s'estima en un 90% (1,2). Aquest és l'únic individu dels 13 cynomolgus, incloent els vacunats, que desenvolupa una forma latent en aquest estudi (8%), en què estan infectats amb ultra-baixa dosi d'inòcul, i la xifra del 60% sembla inassolible. Cabria la possibilitat que en alguns es faci servir el terme "tuberculosi latent" d'una forma menys restrictiva que en l'actualitat (i que inclouria contenció de la malaltia), o bé fossin estudis molt més curts; sembla que aquest concepte de latència en cynomolgus s'arrossega en la literatura tot i que podria ser poc acurat en l'actualitat. Malgrat que no hi ha un estàndard per definir en concret la tuberculosi activa o latent en NPH, en el present estudi s'assumeix el concepte que s'aplica en humans i que està exposat a la **Taula 1** de l'apartat 1.1.5. (proposta àmpliament implantada de classificació de l'espectre de la infecció tuberculosa per la ATS).

També es pot esmentar que els únics cynomolgus en els que la malaltia creix desproporcionadament existeix una oclusió del bronqui principal i és assumible que jugui un paper primordial en l'evolució d'aquests macacos.

Per finalitzar aquest apartat, i un cop discutit el curs natural de la malaltia en els genotips de macaco rhesus i cynomolgus, cal abordar l'ús d'aquests dos models experimentals en estudis amb fàrmacs antituberculosos.

Per un costat, donat que els rhesus generen una tuberculosi progressiva i freqüentment ràpida i descontrolada, es considera que són un bon model per comparar vacunes, ja que es pot identificar millor una possible contenció o absència de malaltia.

Per un altre costat, donat que els cynomolgus de forma innata poden controlar la infecció, no són en general un bon model per avaluar diferències entre fàrmacs (sobretot vacunes) perquè el fet que no mostrin malaltia tuberculosa podria ser gràcies a aquest o bé, i de forma indiferenciable, per la pròpia resposta immune de l'animal. No obstant això, és un model molt interessant per l'estudi de la tuberculosi latent o lentament progressiva, tot i que implica estudis llargs amb alt consum de recursos.

6.3.2. L'efecte de la vacunació i l'impacte de la seva via d'administració

L'evolució natural de la tuberculosi en macacos mostra un ampli espectre de formes de malaltia, des de l'evolució ràpidament progressiva a formes més contingudes i inclús s'observa un cas de lleu regressió espontània en rhesus. Globalment, i un cop més, es pot observar que els cynomolgus fan millor contenció de la malaltia amb menor càrrega de tuberculosi pulmonar i progressió alentida.

Els macacos vacunats no presenten diferències rellevants respecte els controls, sobretot els rhesus, en la valoració completa de l'evolució. No obstant, es detecta un efecte inicial de la vacuna amb una reducció del total de les lesions a la setmana 3, com ja exposa White et al. (2020) (120) en els rhesus, si bé, no s'identifica una significació estadística.

Destaca que els cynomolgus vacunats desenvolupen molt poques lesions i aquestes mostren una mida petita, tot exhibint una capacitat de restricció de l'afectació pulmonar de forma significativa respecte els rhesus i inclús major a la que ja s'observa de forma innata en els cynomolgus. No obstant, no es detecten diferències significatives respecte el control pel que fa al nombre de condensacions generades per macaco ni en la comparativa percentual entre els micronòduls i els seus dos subtipus, si bé s'aprecia una tendència a una generació menor dels associats per part dels cynomolgus vacunats. Aquest fet, però, possiblement estigui afectat pel baix nombre d'individus en la mostra.

S'observa que tres dels rhesus vacunats amb aerosol (la meitat) i un intradèrmic mostren tuberculosi activa lentament progressiva (com s'observa a la **Figura 54**), mostrant un major control

de la malaltia pulmonar; tanmateix, no és significatiu. També s'identifiquen formes ràpidament progressives, algunes associades a oclusió bronquial i d'altres no i, per tant, sense que s'aprecii una influència franca d'aquest fenomen.

L'anàlisi normalitzat del creixement de les condensacions mostra que els cynomolgus vacunats presenten un patró diferenciable a la resta de grups; aquest creix de forma alentida durant les primeres setmanes amb un augment posterior. Aquest comportament és invers a la resta de macacos, que fan un creixement ràpid o accelerat inicial, amb certa estabilització posterior.

Així doncs, aquests patrons de creixement exposen que hi ha un augment molt acusat de les lesions entre la fase inicial i la intermèdia, amb una estabilització relativa posterior (tot i que amb tendència al augment). Per contra, s'observa un increment alentit de les lesions que s'estén fins la fase intermèdia en els cynomolgus vacunats, però després augmenten el seu volum de forma més accelerada; és a dir, mostren un clar alentiment de la progressió de les lesions tot i que en un moment donat, la malaltia s'expandeix ràpidament (com es veu en fases més inicials a la resta de grups).

Respecte la distribució percentual entre els subtipus de micronòduls, es posa de manifesta una proporció molt baixa de micronòduls associats a l'inici, que augmenta per estabilitzar-se posteriorment, seguint un patró similar a l'increment de les condensacions. En la fase primerenca, un domini quantitatiu i percentual dels micronòduls aïllats és esperable ja que la malaltia és molt inicial i encara no ha desenvolupat prou les condensacions i per tant, hi ha una quantitat menor de micronòduls associats. Però la rellevància d'aquesta proporció recau en què s'objectiva una diferència de distribució entre els grups control i els vacunats, on la proporció de micronòduls associats és pràcticament nul en aquests últims (no així en els control i especialment en els rhesus), tot observant un efecte inicial de la vacuna amb la contenció dels micronòduls associats (cal recordar que l'efecte inicial de la vacuna observat per White et al. (2020) (120) fa referència al total de lesions).

Per tant, l'interès en l'estudi actual és que l'anàlisi de les lesions és més detallat i, desglossant els micronòduls, es detecta un efecte concret de la vacuna sobre les proporcions de cada subtipus.

Així doncs, una proporció molt baixa de micronòduls associats es relaciona amb la contenció inicial de la malaltia com a conseqüència de la vacunació. Per tant, no tots els micronòduls es comporten igual i pren sentit la classificació en subtipus de micronòduls per tècniques d'imatge.

L'impacte de la via d'administració de la vacuna BCG es pot analitzar en els rhesus. Tot i que cap de les rutes aconseguix reduir el nombre de condensacions i que ambdues rutes aparentment redueixen de forma similar el nombre de micronòduls, es detecten algunes diferències.

Per una banda, els rhesus amb BCG inhalada redueixen el nombre total de micronòduls, més que els rhesus amb la BCG intradèrmica, i a més generen una proporció menor de micronòduls aïllats. Així doncs, l'efecte protector del vaccí inhalat es basa en la reducció del nombre total de micronòduls amb especial influència sobre els aïllats, fet que podria relacionar-se amb una millor difusió del profilàctic pel parènquima pulmonar amb conseqüent millor estimulació del sistema immune; per contra, tindria menys efecte sobre el control del desenvolupament de micronòduls quan es generen focus amb alt component inflamatori, com és el cas dels micronòduls associats al voltant de les condensacions. Alhora, i en concordança, aquests rhesus vacunats amb BCG inhalada generen lesions de major mida al final de l'estudi, fet que es relaciona amb pitjor control de la de la malaltia i amb pitjor progressió, que a més, afegeix una major probabilitat de cavitació en les condensacions de major mida empitjorant més el pronòstic (tot i que en l'estudi present, la major taxa de cavitació s'observa en els rhesus control).

Per una altra banda, s'observa que la reducció del total de micronòduls es més dèbil en rhesus amb BCG intradèrmica, el seu efecte apareix sobre ambdós tipus de micronòduls i en grau similar. Per tant, la troballa significativa al respecte és que els intradèrmics desenvolupen una menor proporció de micronòduls associats, oferint major protecció per la progressió de la malaltia tuberculosa. Podria ser conseqüència d'una estimulació del sistema immune diferent (respecte la vacuna inhalada aerosolitzada) i que fos capaç de frenar la cascada d'inflamació i resposta cel·lular, amb menor concentració de neutròfils.

Tanmateix, el global de troballes no ha estat contundent per detectar diferències entre les vies d'administració de la BCG, ja que no es detecten diferències en el nombre de condensacions generades per macaco, sobretot, i tampoc en micronòduls aïllats. Seria precís un nou estudi dirigit

que tingués un disseny capaç de discernir comportaments diversos de la malaltia tuberculosa en funció de la ruta de la BCG.

S'afegeix el problema que els rhesus fan una càrrega de malaltia molt elevada que dificulta la valoració de diferències per imatge, i els cynomolgus fan molta contenció i la valoració de les diferències ve dificultada per l'altre extrem.

Finalment, els rhesus generen un nombre molt superior de lesions transicionals que els cynomolgus, si bé la proporció a la fase primerenca és similar entre ambdues espècies i és indiferent de l'estatus vacunal. No obstant, a la fase intermèdia, s'observa que els macacos vacunats encara mostren creixement de lesions (des de micronòduls a condensacions), i això és atribuïble a un efecte de contenció de la malaltia i una progressió alentida, tot destacant el grup de cynomolgus vacunats de forma significativa. En la mateixa fase intermèdia, els macacos no vacunats no mostren pràcticament lesions transicionals, fet que implica que les lesions ja han adquirit la mida de condensació en la fase primerenca, i el mateix succeeix a la fase tardana.

No obstant, en el fons el que succeeix és que les lesions transicionals no són rellevants *per se*: representen el nexa d'unió entre les variables "micronòdul" i "condensacions" en una anàlisi estadística, però realment corresponen totes elles al continu biològic dels focus d'infecció per *M. tuberculosis*. El veritable interès de les lesions transicionals és que es correlacionen perfectament amb la velocitat de creixement de les lesions, doncs el grup que manté més temps lesions transicionals indica que és capaç de contenir el creixement durant més temps.

6.4. L'impacte de la pleura en la contenció de la tuberculosi pulmonar

Aquest treball mostra que les consolidacions en contacte amb la pleura aturen el seu creixement, frenen la progressió de la malaltia en els cynomolgus (indiferentment del seu estatus de vacunació) i en mitiga el creixement en els rhesus. Tot i que la pleura podria actuar com una

barrera natural evitant el seu augment, s'ha de tenir en compte que les lesions podrien continuar progressant cap a la resta del pulmó, doncs les condensacions es troben bàsicament envoltades per parènquima pulmonar preservat (intacte) a les imatges de TC i per tant, no és qüestió de falta d'espai ja que un cop contacten amb la pleura tenen la possibilitat de continuar expandint-se.

Aquesta troballa s'ha de destacar perquè pot ser fonamental pel control local de la tuberculosi, més enllà del sistema immunitari, tot conformant una xarxa fibrosant de contenció en forma d'encapsulació. Aquest efecte protector no s'identifica en rhesus i podria ser degut a una major resposta inflamatòria que faria inútil l'encapsulació, ja que sobrepassaria la capacitat de contenció dels fibroblasts. Tanmateix, la malaltia tuberculosa humana s'assembla més a la que mostren els cynomolgus i per tant, aquest podria ser un mecanisme de contenció local de la malaltia important i no prou examinat ni documentat.

És conegut que en els granulomes madurs i en les lesions cavitades s'hi troben fibroblasts, miofibroblasts i fibres de col·làgena organitzada al seu voltant, que contenen la inflamació tot encerclant-la fermament (52,54,55,72) i semblen derivar dels septes interlobulillars o septes secundaris en el model murí (72), i també s'ha descrit la seva participació en bestiar (263). A més, nous estudis amb macacos descriuen que, a part dels fibroblasts residents a l'interstici pulmonar, sembla que també hi ha una contribució externa a partir de la migració de certs macròfags des de sang perifèrica, atrets per la inflamació, que fan una transformació a miofibroblasts (264), tot i que està fonamentat en investigacions sobre la fibrosi pulmonar en context de pneumopatia fibrosant en humans i que principalment donen lloc a la fibrosi idiopàtica (265–267).

Els macacos, però, no presenten aquest tipus de septes intersticial i la pleura podria jugar un rol similar gràcies a que la subcapa interna de la pleura visceral es molt rica en teixit connectiu lax amb fibroblasts (66,67). Així doncs, la pleura podria promoure la contenció d'una lesió quan aquesta hi entrés en contacte i podria generar una encapsulació de la tuberculosi conduïda per l'abundant població de fibroblasts (35).

És per aquest motiu que s'ha considerat molt rellevant avaluar la relació entre les condensacions i la pleura en les imatges TC i, per tant, s'han inclòs paràmetres que no estaven recollits en estudis precedents.

Tot i que els resultats de l'estudi present són estadísticament significatius, no són contundents i no s'aprecien clarament en anàlisis simples. Seria recomanable dissenyar estudis dirigits a l'estudi concret d'aquesta encapsulació i la participació dels septes interlobulillars i de la pleura com a mínim; per tant, s'haurien d'incloure un altre model animal experimental amb mamífer superior que contingués aquestes estructures anatòmiques i des d'aquí es proposa el model suï o el caprí, per la seva relativa accessibilitat i perquè són models experimentals animals validats que compten amb experiència prèvia i literatura publicada.

Per un altre costat, el tipus de contacte pleural que fan les consolidacions (contacte focal, moderat o ampli) no ha mostrat resultats a destacar ja que no s'han identificat diferències de comportaments entre els subgrups, possiblement per ser massa categoritzat. En tot cas, i com s'acaba d'exposar, és interessant la dicotomització entre contacte i no-contacte.

Finalment, afegir que els conceptes d'aquest treball d'investigació, aquí desenvolupat com a tesi doctoral, també han donat lloc a la publicació de l'article I. Nogueira et al (2023) [268] a la revista indexada *Pathogens*, amb factor d'impacte alt. Es pot consultar a continuació, a l'annex.

6.4. Fortaleses i limitacions del treball

La investigació translacional és fonamental per la generació de coneixement i per l'avançament científic, sobretot en ciències mèdiques. Els estudis amb model animal experimental amb NHP són el nexa d'unió entre la investigació i l'aplicació en humans, i per tant, treballar amb macacos aporta un alt valor científic.

Hi ha pocs estudis publicats de tuberculosi amb model experimental animal amb macacos que analitzin els pulmons amb escàner de TC. Per tant, el present estudi és una oportunitat per aprofundir i eixamplar aquests coneixements i aportar noves eines per l'avaluació de la malaltia.

S'ha disposat d'un nombre inusualment alt de NPH gràcies a l'addició de grups de macacos experimentalment equivalents, i que provenen de diversos estudis robustos i validats on s'han aplicat mètodes experimentals capdavanters.

Les imatges de TC de les que s'ha disposat han estat obtingudes amb tecnologia actualitzada i idèntica a la usada en el diagnòstic clínic en humans. Per tant, són d'alta qualitat i la seva avaluació pot ser tan acurada i precisa com permeti la pròpia tècnica.

Les noves aplicacions que incorporen els programaris o *softwares* de post-processat de la imatge faciliten la identificació, caracterització i seguiment de les lesions, així com la reproductibilitat d'aquesta anàlisi; un exemple és l'aplicació *Tumor Tracking*, emprada en el present estudi tal i com està exposat a l'apartat 4.3.

Els escàners de TC s'han practicat amb els animals vius (és a dir, *in-vivo*). Aquest fet es considera molt rellevant perquè s'apropa més a l'aplicació o translació en humans, ja que permet una valoració de les imatges de TC amb pulmons expandits i ventilats, que és equivalent a la valoració amb persones.

Tot i el valor científic que suposa investigar amb macacos, els treballs són dificultosos i estan subjectes a una regulació estricta que obliga a fer els estudis amb el mínim nombre possible d'animals. Això finalment comporta, tal i com succeeix en aquest estudi, que la mostra estigui composta per un nombre objectivament baix de macacos.

Per un altre costat, el fet de que la mostra s'hagi creat a partir de diferents estudis, amb un disseny i objectius diferents, ha provocat desigualtats. Els grups experimentals resultants són heterogenis; aquests no estan ben equilibrats, amb una sobre representació tant d'animals no vacunats i com de rhesus. També hi ha lleu diversitat temporal en el període entre els escàners de seguiment.

Existeix una pèrdua de dades degut a l'eutanàsia de quatre animals així com la manca d'un quart escàner de seguiment en alguns macacos degut a diferències de dissenys dels estudis originals d'on provenen les imatges.

L'avaluació de les imatges TC ha estat feta per una única persona i, per tant, no s'han considerat les possibles diferències intra i interobservador en la interpretació de les imatges.

La quantificació dels micronòduls és un procés manual subjecte a errors, que s'incrementa amb la major quantitat de nòduls, i es considera que la identificació d'un nombre major d'aquests està subjecte a un marge més ampli d'error. De totes formes, aquesta situació (més de 10 micronòduls associats i més de 20 micronòduls aïllats) s'ha donat en pocs casos.

Existeix una major complexitat per mesurar la malaltia en el macacos amb tuberculosi molt evolucionada, amb dificultat de precisió per identificar correctament els límits de cadascuna de les condensacions, que en ocasions són coalescents.

En els macacos amb major afectació pulmonar i condensacions més voluminoses, hi ha menys micronòduls (assumiblement fusionats a les condensacions). Aquest menor nombre pot ser interpretat com un comportament estadístic favorable si no es té en compte la resta de lesions i variables que aporten informació sobre una malaltia realment avançada.

L'eutanàsia precoç de quatre macacos ho han estat com a conseqüència d'un patiment innecessari degut a malaltia tuberculosa. Aquesta pèrdua de dades de tuberculosi molt avançada fa que en els grups més afectats (sobretot rhesus vacunats) hi hagi una major influència estadística dels macacos amb menys alteracions pulmonars i per tant, la malaltia estigui infradimensionada. Aquest fet pot fer perdre potència estadística en algunes comparatives de variables.

No s'han observat nòduls calcificats, que seria un aspecte cabdal de la TC per valorar granulomes madurs. No obstant, és un fet esperable donat que la literatura descriu una aparició molt tardana d'aquests en imatges TC en NHP (succeeix majorment a partir de la setmana 20) i el present estudi es perllonga com a màxim fins a la setmana 16.

Les variables usades per la valoració de la tuberculosi en imatges de TC no resolen els casos en què hi hagi una franca dominància de pneumònia broncocèntrica.

7. CONCLUSIONS

Les conclusions extretes són:

- ❖ Les imatges de TC permeten identificar patrons de distribució de la malaltia tuberculosa pulmonar en un model experimental amb macacos.
- ❖ El complex format per condensacions amb micronòduls associats constitueix un patró radiològic identificable en imatges de TC que es vincula a una pitjor progressió de la malaltia tuberculosa pulmonar i s'ajusta a la proposta del Model de Bombolles.
- ❖ Una major proporció de micronòduls associats envers els aïllats es relaciona amb progressió de la malaltia tuberculosa pulmonar.
- ❖ La vacuna BCG protegeix contra la tuberculosi pulmonar en la fase inicial de la malaltia a les dues espècies de macacos, fent una contenció temporal.
- ❖ La vacuna BCG per via intradèrmica podria conferir major efecte protector pulmonar, ja que mostra major contenció dels micronòduls associats.
- ❖ En els cynomolgus, indistintament del seu estat de vacunació, el contacte de les condensacions amb la pleura presenta un efecte de restricció del seu creixement.

8. LÍNIES DE FUTUR

Tenint en compte les limitacions exposades anteriorment, així com els canvis tecnològics que ja s'estan esdevenint, es plantegen unes línies per treballs futurs.

El desenvolupament de la intel·ligència artificial ha de permetre, en un futur proper, la identificació de patrons radiològics que contribueixin a la comprensió més profunda de la malaltia i a la recerca de noves vacunes i fàrmacs antituberculosos.

Les conclusions d'aquest estudi condueixen a la continuïtat d'aquesta línia de recerca amb noves mostres de macacos i configuració de grups experimentals homogenis.

Seria d'interès la realització d'estudis que aprofundeixin amb l'avaluació de l'efecte de la ruta d'administració de la BCG en models experimentals, tot aconseguint una mostra major.

La realització d'estudis amb model animal de mamífer superior que presenti septes interlobulillars dirigits a l'avaluació del seu rol en la contenció local de la malaltia permetria aconseguir unes conclusions més extrapolables als humans.

9. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

1. Global tuberculosis report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021
2. Global tuberculosis report 2019. Geneva: World Health Organization; 2019
3. Behr MA, Edelstein PH, Ramakrishnan L. Revisiting the timetable of tuberculosis. *BMJ*. 2018;362(August):1–10.
4. World Health Organisation. End TB Strategy. World Health Organisation. 2013;53(9):1689–99.
5. Cilloni L, Fu H, Vesga JF, Dowdy D, Pretorius C, Ahmedov S, et al. The potential impact of the COVID-19 pandemic on the tuberculosis epidemic a modelling analysis. *EClinicalMedicine*. 2020 Oct 24;28:100603.
6. Pai M, Kasaeva T, Swaminathan S. Covid-19's Devastating Effect on Tuberculosis Care - A Path to Recovery. *N Engl J Med*. 2022 Apr 21;386(16):1490-1493.
7. World Health Organization. End TB Strategy. 2015; WHO: Geneva, Switzerland, 2021.
8. Cardona PJ. What We Have Learned and What We Have Missed in Tuberculosis Pathophysiology for a New Vaccine Design: Searching for the "Pink Swan". *Front Immunol*. 2017 May 15;8:556.
9. Dartois VA, Rubin EJ. Anti-tuberculosis treatment strategies and drug development: challenges and priorities. *Nat Rev Microbiol*. 2022 Nov;20(11):685-701.
10. Wallis RS, Maeurer M, Mwaba P, Chakaya J, Rustomjee R, Migliori GB, et al. Tuberculosis-advances in development of new drugs, treatment regimens, host-directed therapies, and biomarkers. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(4):e34–46.
11. Cardona PJ, Català M, Prats C. The Origin and Maintenance of Tuberculosis Is Explained by the Induction of Smear-Negative Disease in the Paleolithic. *Pathogens*. 2022 Mar 17;11(3):366.
12. Cardona PJ, Català M, Prats C. Origin of tuberculosis in the Paleolithic predicts

- unprecedented population growth and female resistance. *Sci Rep.* 2020 Dec 1;10(1):42.
13. Brosch R, Gordon S V, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, et al. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Mar;99(6):3684–9.
 14. Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, et al. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of Mycobacterium tuberculosis with modern humans. *Nat Genet.* 2013 Oct;45(10):1176–82.
 15. Brites D, Gagneux S. Co-evolution of Mycobacterium tuberculosis and Homo sapiens. *Immunol Rev.* 2015 Mar;264(1):6–24.
 16. Chisholm RH, Trauer JM, Curnoe D, Tanaka MM. Controlled fire use in early humans might have triggered the evolutionary emergence of tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;113(32):9051–6.
 17. Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L, Martini M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J Prev Med Hyg.* 2017 Mar;58(1):E9-E12.
 18. Morse D, Brothwell DR, Ucko PJ. Tuberculosis in ancient Egypt. *Am Rev Respir Dis.* 1964 Oct;90:524–41.
 19. Cave AJE, Demonstrator A. The evidence for the incidence of tuberculosis in ancient Egypt. *Br J Tuberc.* 1939;33(3):142–52.
 20. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respir Med.* 2006;100(11):1862–70.
 21. Arriaza BT, Salo W, Aufderheide AC, Holcomb TA. Pre-Columbian tuberculosis in northern Chile: molecular and skeletal evidence. *Am J Phys Anthropol.* 1995 Sep;98(1):37–45.
 22. Hippocrates, Withington ET, Potter P, Smith WD, Heraclitus, Stanton AF. Rare Book Collection of Rush University Medical Center at the University of Chicago., J. Hippocrates. Cambridge, Mass.; London: Harvard University Press ; W. Heinemann; 1923.
 23. Frith J. History of tuberculosis. Part 1 - Phthisis, consumption and the white plague. *J Mil Veterans Health.* 2014;22(2):29–35.

24. Villemin, J.A. (1865). "Cause et nature de la tuberculose" [Cause and nature of tuberculosis]. Bulletin de l'Académie Impériale de Médecine (in French). 31: 211–216, Villemin, J.-A. (1868). Etudes sur la tuberculose: preuves rationnelles et expérimentales de sa spécificité et de son inoculabilité [Studies of tuberculosis: rational and experimental evidence of its specificity and inoculability] (in French). Paris, France: J.-B. Baillière et fils.
25. Gradmann C. Robert Koch and the pressures of scientific research: tuberculosis and tuberculin. Med Hist. 2001 Jan;45(1):1–32.
26. Schatz A, Bugie E, Waksman SA. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. 1944. Clin Orthop Relat Res. 2005 Aug;(437):3–6.
27. Woodruff HB. Selman A. Waksman, winner of the 1952 Nobel Prize for physiology or medicine. Appl Environ Microbiol. 2014 Jan;80(1):2–8.
28. Rawlins M. The disputed discovery of streptomycin. Lancet. 2012;380(9838):207.
29. Platt AE. Why don't we stop tuberculosis? World Watch. 1994;7(4):31–4.
30. World Health Organization. Framework for Implementing the "End Tb Strategy" in the African Region 2016 - 2020. WHO Libr Cat Data. 2017;1–28.
31. Dowdy DW, Behr MA. Are we underestimating the annual risk of infection with Mycobacterium tuberculosis in high-burden settings? Lancet Infect Dis. 2022;22(9):e271–8.
32. Pumarola A, Rodríguez-Torres A, García-Rodríguez JA, Piédrola-Angulo G. Microbiología y parasitología médica. Barcelona: Salvat; 1984. 885 p.
33. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 25th ed. McGraw-Hill; 2010. 814 p.
34. Farreras Valentí P, Rozman C. Medicina Interna. Madrid: Elsevier; 2004. 2789 p.
35. Cardona PJ. Pathogenesis of tuberculosis and other mycobacteriosis. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2018;36(1):38–46.

36. Cardona P-J. The Progress of Therapeutic Vaccination with Regard to Tuberculosis. *Front Microbiol.* 2016;7:1536.
37. Mitchell G, Chen C, Portnoy DA. Strategies Used by Bacteria to Grow in Macrophages. *Microbiol Spectr.* 2016 Jun;4(3).
38. Bermudez LE, Danelishvili L, Early J. Mycobacteria and Macrophage Apoptosis: Complex Struggle for Survival. *Microbe Wash DC.* 2006 Aug;1(8):372-375
39. Belogorodtsev SN, Nemkova EK, Stavitskaya N V, Schwartz YS. Pathogenic Effects of M. tuberculosis-Specific Proteins ESAT-6 and CFP-10 in Macrophage Culture and in 3D-Granulemogenesis Model In Vitro. *Bull Exp Biol Med.* 2021 Sep;171(5):656–60.
40. Lee J, Remold HG, Jeong MH, Kornfeld H. Macrophage Apoptosis in Response to High Intracellular Burden of Mycobacterium tuberculosis Is Mediated by a Novel Caspase-Independent Pathway . *J Immunol.* 2006;176(7):4267–74.
41. Behar SM, Divangahi M, Remold HG. Evasion of innate immunity by Mycobacterium tuberculosis: is death an exit strategy? *Nat Rev Microbiol.* 2010 Sep;8(9):668-74
42. Mahamed D, Boulle M, Ganga Y, Mc Arthur C, Skroch S, Oom L, et al. Intracellular growth of Mycobacterium tuberculosis after macrophage cell death leads to serial killing of host cells. *Elife.* 2017;6:1–26.
43. Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol.* 2012 Apr 20;12(5):352-66.
44. Dannenberg AMJ. Immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Hosp Pract (Off Ed).* 1993 Jan;28(1):51–8.
45. Wolf AJ, Linas B, Trevejo-Nuñez GJ, Kincaid E, Tamura T, Takatsu K, et al. Mycobacterium tuberculosis infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. *J Immunol.* 2007 Aug;179(4):2509–19.
46. Behar SM, Martin CJ, Booty MG, Nishimura T, Zhao X, Gan H-X, et al. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against Mycobacterium tuberculosis. *Mucosal Immunol.*

- 2011 May;4(3):279–87.
47. Keane J, Shurtleff B, Kornfeld H. TNF-dependent BALB/c murine macrophage apoptosis following Mycobacterium tuberculosis infection inhibits bacillary growth in an IFN-gamma independent manner. *Tuberculosis (Edinb)*. 2002;82(2–3):55–61.
 48. Oddo M, Renno T, Attinger A, Bakker T, MacDonald HR, Meylan PR. Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol*. 1998 Jun;160(11):5448–54.
 49. Peyron P, Vaubourgeix J, Poquet Y, Levillain F, Botanch C, Bardou F, et al. Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for M. tuberculosis persistence. *PLoS Pathog*. 2008 Nov;4(11):e1000204.
 50. Cáceres N, Tapia G, Ojanguren I, Altare F, Gil O, Pinto S, et al. Evolution of foamy macrophages in the pulmonary granulomas of experimental tuberculosis models. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009 Mar;89(2):175–82.
 51. Cardona PJ. A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection. *Infection*. 2009;37(2):80–6.
 52. Flynn JL, Chan J, Lin PL. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. Vol. 4, *Mucosal Immunology*. 2011. p. 271–8.
 53. Hao W, Schlesinger LS, Friedman A. Modeling granulomas in response to infection in the lung. *PLoS One*. 2016 Mar 1;11(3).
 54. Urbanowski ME, Ordonez AA, Ruiz-Bedoya CA, Jain SK, Bishai WR. Cavitory tuberculosis: the gateway of disease transmission. *Lancet Infect Dis*. 2020 Jun;20(6):e117-e128.
 55. Ihms EA, Urbanowski ME, Bishai WR. Diverse Cavity Types and Evidence that Mechanical Action on the Necrotic Granuloma Drives Tuberculous Cavitation. *Am J Pathol*. 2018 Jul 1;188(7):1666–75.
 56. Im JG, Itoh H, Shim YS, Lee JH, Ahn J, Han MC, Noma S. Pulmonary tuberculosis: CT findings-early active disease and sequential change with antituberculous therapy. *Radiology*. 1993

- Mar;186(3):653-60.
57. Behr MA, Waters WR. Is tuberculosis a lymphatic disease with a pulmonary portal? *Lancet Infect Dis.* 2014 Mar;14(3):250-5.
 58. Ong CWM, Elkington PT, Friedland JS. Tuberculosis, pulmonary cavitation, and matrix metalloproteinases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190(1):9–18.
 59. Dannenberg AM. Liquefaction and cavity formation in pulmonary TB: A simple method in rabbit skin to test inhibitors. *Tuberculosis.* 2009;89(4):243–7.
 60. Cardona PJ. Revisiting the natural history of tuberculosis: the inclusion of constant reinfection, host tolerance, and damage-response frameworks leads to a better understanding of latent infection and its evolution towards active disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2010;58(1):7–14.
 61. Turner RD, Chiu C, Churchyard GJ, Esmail H, Lewinsohn DM, Gandhi NR, et al. Tuberculosis Infectiousness and Host Susceptibility. *J Infect Dis.* 2017;216:S636–43.
 62. Davis JM, Ramakrishnan L. The Role of the Granuloma in Expansion and Dissemination of Early Tuberculous Infection. *Cell.* 2009;136(1):37–49.
 63. Dannenberg AMJ. Macrophage turnover, division and activation within developing, peak and “healed” tuberculous lesions produced in rabbits by BCG. *Tuberculosis (Edinb).* 2003;83(4):251–60.
 64. Cosma CL, Humbert O, Ramakrishnan L. Superinfecting mycobacteria home to established tuberculous granulomas. *Nat Immunol.* 2004 Aug;5(8):828–35.
 65. Prats C, Vilaplana C, Valls J, Marzo E, Cardona PJ, López D. Local Inflammation, Dissemination and Coalescence of Lesions Are Key for the Progression toward Active Tuberculosis: The Bubble Model. *Front Microbiol.* 2016 Feb 2;7:33.
 66. Dail DH, Hammar SP. *Dail and Hammar’s Pulmonary Pathology.* second ed. Springer New York LLC; 1994. XLII, 1656.
 67. Zander DS, Farver CF. *Pulmonary pathology.* second. Philadelphia: Elsevier Inc.; 2018. 759

- p.
68. Wong EA, Joslyn L, Grant NL, Klein E, Lin PL, Kirschner DE, Flynn JL. Low Levels of T Cell Exhaustion in Tuberculous Lung Granulomas. *Infect Immun*. 2018 Aug 22;86(9):e00426-18
 69. Ulrichs T, Kaufmann SHE. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol*. 2006;208(2):261–9.
 70. Orme IM, Basaraba RJ. The formation of the granuloma in tuberculosis infection. *Semin Immunol*. 2014;26(6):601–9.
 71. Vilaplana C, Marzo E, Tapia G, Diaz J, Garcia V, Cardona PJ. Ibuprofen therapy resulted in significantly decreased tissue bacillary loads and increased survival in a new murine experimental model of active tuberculosis. *J Infect Dis*. 2013;208(2):199–202.
 72. Gil O, Díaz I, Vilaplana C, Tapia G, Díaz J, Fort M, Cáceres N, Pinto S, Caylà J, Corner L, Domingo M, Cardona PJ. Granuloma encapsulation is a key factor for containing tuberculosis infection in minipigs. *PLoS One*. 2010 Apr 6;5(4):e10030..
 73. Lin PL, Ford CB, Coleman MT, Myers AJ, Gawande R, Ioerger T, et al. Sterilization of granulomas is common in active and latent tuberculosis despite within-host variability in bacterial killing. *Nat Med*. 2014;20(1):75–9.
 74. Lin PL, Flynn JL. The End of the Binary Era: Revisiting the Spectrum of Tuberculosis. *J Immunol*. 2018 Nov 1;201(9):2541–8.
 75. Català M, Bechini J, Tenesa M, Pérez R, Moya M, Vilaplana C, et al. Modelling the dynamics of tuberculosis lesions in a virtual lung: Role of the bronchial tree in endogenous reinfection. *PLoS Comput Biol*. 2020 May 1;16(5):e10030..
 76. Cadena AM, Fortune SM, Flynn JL. Heterogeneity in tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 2017 Nov;17(11):691-702..
 77. Plopper, C.G., & Harkema, J.R. (2005). CHAPTER 30 – The Respiratory System and its Use in Research.
 78. Fraser RS. Histology and gross anatomy of respiratory tract. In: Hamid Q, Shannon J, Martin

- J, eds. Physiologic basis of respiratory disease. Hamilton, Ontario; pp. 1-14, 2005.
79. Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, et al. Tuberculosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Oct 27;2:16076..
80. Nachiappan AC, Rahbar K, Shi X, Guy ES, Mortani Barbosa EJ, Shroff GS, et al. Pulmonary tuberculosis: Role of radiology in diagnosis and management. *Radiographics*. 2017;37(1):52–72.
81. Rodriguez-Takeuchi SY, Renjifo ME, Medina FJ. Extrapulmonary Tuberculosis: Pathophysiology and Imaging Findings. *Rev Publ Radiol Soc North Am Inc*. 2019;39(7):2023–37.
82. Natarajan A, Beena PM, Devnikar A V, Mali S. A systemic review on tuberculosis. *Indian J Tuberc*. 2020 Jul;67(3):295–311.
83. Harisinghani MG, McCloud TC, Shepard JAO, Ko JP, Shroff MM, Mueller PR. Tuberculosis from head to toe. *Radiographics*. 2000;20(2):449–70.
84. Mezocho A, Thakur K, Vinnard C. Tuberculous Meningitis in Children and Adults: New Insights for an Ancient Foe. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2017 Sep;17(11):85.
85. Fallon RJ, Kennedy DH. Tuberculous meningitis in children. *Lancet*. 1982 Feb 13;1(8268):392-3.
86. Solari L, Soto A, Agapito JC, Acurio V, Vargas D, Battaglioli T, et al. The validity of cerebrospinal fluid parameters for the diagnosis of tuberculous meningitis. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. 2013 Dec;17(12):e1111-5.
87. Muneer A, Macrae B, Krishnamoorthy S, Zumla A. Urogenital tuberculosis - epidemiology, pathogenesis and clinical features. *Nat Rev Urol*. 2019 Oct;16(10):573–98.
88. Naeem M, Zulfiqar M, Siddiqui MA, Shetty AS, Haq A, Varela C, et al. Imaging Manifestations of Genitourinary Tuberculosis. *Radiogr a Rev Publ Radiol Soc North Am Inc*. 2021;41(4):1123–43.
89. Matos MJ, Bacelar MT, Pinto P, Ramos I. Genitourinary tuberculosis. *Eur J Radiol*. 2005

- Aug;55(2):181–7.
90. Ministerio español de sanidad. Plan para la prevencion y control de la tuberculosis. 2019.
 91. Acharya B, Acharya A, Gautam S, Ghimire SP, Mishra G, Parajuli N, et al. Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of Mycobacterium tuberculosis. *Mol Biol Rep.* 2020;47(5):4065–75.
 92. Wattal C, Raveendran R. Newer Diagnostic Tests and their Application in Pediatric TB. *Indian J Pediatr.* 2019 May;86(5):441–7.
 93. Omar RA, Verma N, Arora PK. Development of ESAT-6 Based Immunosensor for the Detection of Mycobacterium tuberculosis. *Front Immunol.* 2021;12:653853.
 94. Kerkhoff AD, Lawn SD. A breakthrough urine-based diagnostic test for HIV-associated tuberculosis. *Lancet.* 2016;387(10024):1139–41.
 95. Kamariza M, Shieh P, Ealand CS, Peters JS, Chu B, Rodriguez-Rivera FP, et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum with a solvatochromic trehalose probe. *Sci Transl Med.* 2018;10(430) :eaam6310..
 96. I. Sutherland. The evolution of clinical tuberculosis in adolescents. *Tubercle* 47 (1966) 308.
 97. Qiu B, Wu Z, Tao B, Li Z, Song H, Tian D, et al. Risk factors for types of recurrent tuberculosis (reactivation versus reinfection): A global systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* 2022 Mar;116:14–20.
 98. Verver S, Warren RM, Beyers N, Richardson M, Van Der Spuy GD, Borgdorff MW, et al. Rate of reinfection tuberculosis after successful treatment is higher than rate of new tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171(12):1430–5.
 99. Marais BJ, Parker SK, Verver S, Van Rie A, Warren RM. Primary and postprimary or reactivation tuberculosis: Time to revise confusing terminology? *AJR Am J Roentgenol.* 2009 Apr;192(4):W198; author reply W199-200
 100. Vega V, Rodríguez S, Van der Stuyft P, Seas C, Otero L. Recurrent TB: a systematic review and meta-analysis of the incidence rates and the proportions of relapses and reinfections.

- Thorax. 2021 May;76(5):494-502
101. Sakula A. BCG: Who were Calmette and Guerin? Thorax. 1983;38(11):806–12.
 102. Periasamy M, Datta M, Kannapiran M. Lait Nocard to rBCG - Over 100 Years of Experience with BCG Vaccine. IOSR J Biotechnol Biochem. 2017;03(04):12–8.
 103. Lobo N, Brooks NA, Zlotta AR, Cirillo JD, Boorjian S, Black PC, et al. 100 years of Bacillus Calmette–Guérin immunotherapy: from cattle to COVID-19. Nat Rev Urol. 2021;18(10):611–22.
 104. World Health Assembly, 27. (1974). WHO expanded programme on immunization. World Health Organization
 105. Lancione S, Alvarez JV, Alsdurf H, Pai M, Zwerling AA. Tracking changes in national BCG vaccination policies and practices using the BCG World Atlas. BMJ Glob Heal. 2022;7(1):e007462.
 106. Zwerling A, Behr MA, Verma A, Brewer TF, Menzies D, Pai M. The BCG world atlas: A database of global BCG vaccination policies and practices. PLoS Med. 2011;8(3):e1001012
 107. Ottenhoff THM, Kaufmann SHE. Vaccines against tuberculosis: Where are we and where do we need to go? PLoS Pathog. 2012;8(5) :e1002607.
 108. Rodrigues LC, Diwan VK, Wheeler JG. Protective effect of BCG against tuberculous meningitis and miliary tuberculosis: a meta-analysis. Int J Epidemiol. 1993 Dec;22(6):1154-8
 109. Abubakar I, Pimpin L, Ariti C, Beynon R, Mangtani P, Sterne J, et al. Systematic review and meta-analysis of the current evidence on the duration of protection by bacillus Calmette-Guérin vaccination against tuberculosis. Health Technol Assess. 2013 Sep;17(37):1-372, v-vi
 110. Trunz BB, Fine P, Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. Lancet. 2006 Apr 8;367(9517):1173-80

111. Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg H V., et al. Efficacy of BCG Vaccine in the Prevention of Tuberculosis: Meta-analysis of the Published Literature. JAMA J Am Med Assoc. 1994;271(9):698–702.
112. Dockrell HM, Smith SG. What Have We Learnt about BCG Vaccination in the Last 20Years? Front Immunol. 2017 Sep 13;8:1134.
113. Martinez L, Cords O, Liu Q, Acuna-Villaorduna C, Bonnet M, Fox GJ, et al. Infant BCG vaccination and risk of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis throughout the life course: a systematic review and individual participant data meta-analysis. Lancet Glob Heal. 2022;10(9):e1307–16.
114. Mangtani P, Abubakar I, Ariti C, Beynon R, Pimpin L, Fine PEM, et al. Protection by BCG vaccine against tuberculosis: A systematic review of randomized controlled trials. Clin Infect Dis. 2014;58(4):470–80.
115. Roordink D, Williams A, Fritzell B, Laddy DJ, Gerdil E, Graffin AM, et al. The TB vaccine development pathway – An innovative approach to accelerating global TB vaccine development. Tuberculosis. 2021;126:102040.
116. Kaufmann SHE, Weiner J, von Reyn CF. Novel approaches to tuberculosis vaccine development. Int J Infect Dis. 2017;56:263–7.
117. Whitlow E, Mustafa AS, Hanif SNM. An overview of the development of new vaccines for tuberculosis. Vaccines. 2020;8(4):1–13.
118. Zhu B, Dockrell HM, Ottenhoff THM, Evans TG, Zhang Y. Tuberculosis vaccines: Opportunities and challenges. Respirology. 2018;23(4):359–68.
119. www.tbvi.eu.
120. White AD, Sarfas C, Sibley LS, Gullick J, Clark S, Rayner E, Gleeson F, Català M, Nogueira I, Cardona PJ, Vilaplana C, Dennis MJ, Williams A, Sharpe SA. Protective Efficacy of Inhaled BCG Vaccination Against Ultra-Low Dose Aerosol M. tuberculosis Challenge in Rhesus Macaques. Pharmaceutics. 2020 Apr 25;12(5):394.

121. Bannister S, Sudbury E, Villanueva P, Perrett K, Curtis N. The safety of BCG revaccination: A systematic review. *Vaccine*. 2021;39(20):2736–45.
122. Abu-Raddad LJ, Sabatelli L, Achterberg JT, Sugimoto JD, Longini IM, Dye C, et al. Epidemiological benefits of more-effective tuberculosis vaccines, drugs, and diagnostics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(33):13980–5.
123. Cardona PJ. RUTI: A new chance to shorten the treatment of latent tuberculosis infection. *Tuberculosis*. 2006;86(3-4 SPEC. ISS.):273–89.
124. Vilaplana C, Montané E, Pinto S, Barriocanal AM, Domenech G, Torres F, et al. Double-blind, randomized, placebo-controlled Phase I Clinical Trial of the therapeutical antituberculous vaccine RUTI®. *Vaccine*. 2010;28(4):1106–16.
125. Nell AS, D’Lom E, Bouic P, Sabaté M, Bosser R, Picas J, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of the novel antituberculous vaccine RUTI: Randomized, placebo-controlled phase II clinical trial in patients with latent tuberculosis infection. *PLoS One*. 2014;9(2):1–10.
126. Dockrell HM, McShane H. Tuberculosis vaccines in the era of Covid-19 – what is taking us so long? *eBioMedicine*. 2022;79:103993.
127. Dockrell HM, Butkeviciute E. Can what have we learnt about BCG vaccination in the last 20 years help us to design a better tuberculosis vaccine? *Vaccine*. 2022 Mar 8;40(11):1525-15338.
128. Verreck FAW, Tchilian EZ, Vervenne RAW, Sombroek CC, Kondova I, Eissen OA, et al. Variable BCG efficacy in rhesus populations: Pulmonary BCG provides protection where standard intra-dermal vaccination fails. *Tuberculosis*. 2017;104:46–57.
129. Tchilian EZ, Ronan EO, de Lara C, Lee LN, Franken KLMC, Vordermeier MH, et al. Simultaneous immunization against tuberculosis. *PLoS One*. 2011;6(11):e27477.
130. Davids V, Hanekom WA, Mansoor N, Gamielien H, Gelderbloem SJ, Hawkridge A, et al. The effect of bacille Calmette-Guérin vaccine strain and route of administration on induced immune responses in vaccinated infants. *J Infect Dis*. 2006;193(4):531–6.

131. Hawkrigde A, Hatherill M, Little F, Goetz MA, Barker L, Mahomed H, et al. Efficacy of percutaneous versus intradermal BCG in the prevention of tuberculosis in South African infants: Randomised trial. *Bmj*. 2008;337(7681):1275–8.
132. Lee H, Cho SN, Kim HJ, Anh YM, Choi JE, Kim CH, et al. Evaluation of cell-mediated immune responses to two BCG vaccination regimes in young children in South Korea. *Vaccine*. 2011;29(38):6564–71.
133. Clark SO, Kelly DLF, Badell E, Castello-Branco LR, Aldwell F, Winter N, et al. Oral delivery of BCG Moreau Rio de Janeiro gives equivalent protection against tuberculosis but with reduced pathology compared to parenteral BCG Danish vaccination. *Vaccine*. 2010;28(43):7109–16.
134. Cross ML, Lambeth MR, Aldwell FE. Murine immune responses to oral BCG immunization in the presence or absence of prior BCG sensitization. *Immunol Cell Biol*. 2010;88(2):224–7.
135. Balseiro A, Prieto JM, Álvarez V, Lesellier S, Davé D, Salguero FJ, et al. Protective Effect of Oral BCG and Inactivated Mycobacterium bovis Vaccines in European Badgers (Meles meles) Experimentally Infected With M. bovis. *Front Vet Sci*. 2020;7(February):1–13.
136. Eickhoff CS, Blazevic A, Killoran EA, Morris MS, Hoft DF. Induction of mycobacterial protective immunity by sublingual BCG vaccination. *Vaccine*. 2019;37(36):5364–70.
137. Darrah PA, Zeppa JJ, Maiello P, Hackney JA, Wadsworth MH, Hughes TK, et al. Prevention of tuberculosis in macaques after intravenous BCG immunization. *Nature*. 2020 Jan 2;577(7788):95–102.
138. Sharpe S, White A, Sarfas C, Sibley L, Gleeson F, McIntyre A, et al. Alternative BCG delivery strategies improve protection against Mycobacterium tuberculosis in non-human primates: Protection associated with mycobacterial antigen-specific CD4 effector memory T-cell populations. *Tuberculosis*. 2016;101:174–90.
139. Logan KE, Gavier-Widen D, Hewinson RG, Hogarth PJ. Development of a Mycobacterium bovis intranasal challenge model in mice. *Tuberculosis*. 2008;88(5):437–43.
140. Alu A, Chen L, Lei H, Wei Y, Tian X, Wei X. Intranasal COVID-19 vaccines: From bench to bed.

- eBioMedicine. 2022;76:103841.
141. Kaveh DA, Garcia-Pelayo MC, Bull NC, Sanchez-Cordon PJ, Spiropoulos J, Hogarth PJ. Airway delivery of both a BCG prime and adenoviral boost drives CD4 and CD8 T cells into the lung tissue parenchyma. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–13.
 142. Aguilo N, Alvarez-Arguedas S, Uranga S, Marinova D, Monzón M, Badiola J, Martin C. Pulmonary but Not Subcutaneous Delivery of BCG Vaccine Confers Protection to Tuberculosis-Susceptible Mice by an Interleukin 17-Dependent Mechanism. *J Infect Dis.* 2016 Mar 1;213(5):831-9.
 143. Goonetilleke NP, McShane H, Hannan CM, Anderson RJ, Brookes RH, Hill AVS. Enhanced Immunogenicity and Protective Efficacy Against Mycobacterium tuberculosis of Bacille Calmette-Guérin Vaccine Using Mucosal Administration and Boosting with a Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara. *J Immunol.* 2003;171(3):1602–9.
 144. Thomas ZRM, McShane H. Aerosol immunisation for TB: Matching route of vaccination to route of infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2014;109(3):175–81.
 145. Lewis DJM, Huo Z, Barnett S, Kromann I, Glemza R, Galiza E, et al. Transient facial nerve paralysis (Bell's palsy) following intranasal delivery of a genetically detoxified mutant of Escherichia coli Heat Labile Toxin. *PLoS One.* 2009;4(9):1–5.
 146. Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, Bopp M, Chen RT, Linder T, et al. Use of the Inactivated Intranasal Influenza Vaccine and the Risk of Bell's Palsy in Switzerland. *N Engl J Med.* 2004;350(9):896–903.
 147. White AD, Sarfas C, West K, Sibley LS, Wareham AS, Clark S, et al. Evaluation of the immunogenicity of Mycobacterium bovis BCG delivered by aerosol to the lungs of macaques. *Clin Vaccine Immunol.* 2015;22(9):992–1003.
 148. Barclay WR, Busey WM, Dalgard DW, Good RC, Janicki BW, Kasik JE, et al. Protection of monkeys against airborne tuberculosis by aerosol vaccination with bacillus Calmette-Guerin. *Am Rev Respir Dis.* 1973;107(3):351–8.
 149. Rosenthal SR, McEnery JT, Raisys N. Aerogenic BCG vaccination against tuberculosis in

- animal and human subjects. *J Asthma Res.* 1968 Jun;5(4):309-23.
150. Redmann RK, Kaushal D, Golden N, Threeton B, Killeen SZ, Kuehl PJ, et al. Particle Dynamics and Bioaerosol Viability of Aerosolized Bacillus Calmette–Guérin Vaccine Using Jet and Vibrating Mesh Clinical Nebulizers. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2021;34(0):1–7.
151. Waldrep J, Dhand R. Advanced Nebulizer Designs Employing Vibrating Mesh/Aperture Plate Technologies for Aerosol Generation. *Curr Drug Deliv.* 2008;5(2):114–9.
152. Perdomo C, Zedler U, Kühl AA, Lozza L, Saikali P, Sander LE, et al. Mucosal BCG Vaccination Induces Protective Lung-Resident Memory T Cell Populations against Tuberculosis. *MBio.* 2016 Nov;7(6):e01686-16.
153. Mahasha PW, Ndwandwe DE, Mavundza EJ, Shey M, Wiysonge CS. Systematic review protocol on Bacillus Calmette-Guerin (BCG) revaccination and protection against tuberculosis. *BMJ.* 2019;9(10):1–5.
154. Leung CC, Tam CM, Chan SL, Chan-Yeung M, Chan CK, Chang KC. Efficacy of the BCG revaccination programme in a cohort given BCG vaccination at birth in Hong Kong. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2001 Aug;5(8):717-23.
155. Barreto ML, Pereira SM, Pilger D, Cruz AA, Cunha SS, Sant'Anna C, et al. Evidence of an effect of BCG revaccination on incidence of tuberculosis in school-aged children in Brazil: Second report of the BCG-REVAC cluster-randomised trial. *Vaccine.* 2011;29(31):4875–7.
156. Barreto ML, Rodrigues LC, Cunha SS, Pereira S, Hijjar MA, Ichihara MY, et al. Design of the Brazilian BCG-REVAC trial against tuberculosis: A large, simple randomized community trial to evaluate the impact on tuberculosis of BCG revaccination at school age. *Control Clin Trials.* 2002;23(5):540–53.
157. Nemes E, Geldenhuys H, Rozot V, Rutkowski KT, Ratangee F, Bilek N, et al. Prevention of M. tuberculosis Infection with H4:IC31 Vaccine or BCG Revaccination. *N Engl J Med.* 2018;379(2):138–49.
158. World health statistics 2017: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. Geneva: World Health Organization; 2017.

159. Diemer FE. The value of chest fluoroscopy. JAMA J Am Med Assoc. 1919.
160. Singh SP, Nath H. Early radiology of pulmonary tuberculosis. AJR Am J Roentgenol. 1994 Apr;162(4):846..
161. World Health Organization. Chest Radiography in Tuberculosis. World Heal Organ. 2016;1–44.
162. Andronikou S, Grier D, Minhas K. Reliability of chest radiograph interpretation for pulmonary tuberculosis in the screening of childhood TB contacts and migrant children in the UK. Clin Radiol. 2021;76(2):122–8.
163. De Villiers RVP, Andronikou S, Van De Westhuizen S. Specificity and sensitivity of chest radiographs in the diagnosis of paediatric pulmonary tuberculosis and the value of additional high-kilovolt radiographs. Australas Radiol. 2004;48(2):148–53.
164. van Cleeff MRA, Kivihya-Ndugga LE, Meme H, Odhiambo JA, Klatser PR. The role and performance of chest X-ray for the diagnosis of tuberculosis: A cost-effective analysis in Nairobi, Kenya. BMC Infect Dis. 2005;5:1–9.
165. Pinto LM, Pai M, Dheda K, Schwartzman K, Menzies D, Steingart KR. Scoring systems using chest radiographic features for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in adults: a systematic review. Eur Respir J. 2013 Aug;42(2):480–94.
166. Chakraborty A, Shivananjaiah AJ, Ramaswamy S, Chikkavenkatappa N. Chest X ray score (Timika score): an useful adjunct to predict treatment outcome in tuberculosis. Adv Respir Med. 2018;86(5):205–10.
167. Krishnamoorthy Y, Knudsen S, Rajaa S, Lakshminarayanan S, Senbagavalli PB, Ellner J, et al. Accuracy of Timika X-ray scoring system to predict the treatment outcomes among tuberculosis patients in India. Indian J Tuberc. 2022 Oct;69(4):476-481.
168. Cuadras Collsamata, P. Desenvolupament i validació d'un índex radiològic útil per a avaluar quantitativament l'evolució del curs del malalt tuberculós [dissertation]. Badalona (Espanya): Universitat Autònoma de Barcelona; 2022

169. Nijjati M, Ma J, Hu C, Tuersun A, Abulizi A, Kelimu A, et al. Artificial Intelligence Assisting the Early Detection of Active Pulmonary Tuberculosis From Chest X-Rays: A Population-Based Study. *Front Mol Biosci.* 2022;9(April):1–9.
170. Qin ZZ, Ahmed S, Sarker MS, Paul K, Adel ASS, Naheyant T, et al. Tuberculosis detection from chest x-rays for triaging in a high tuberculosis-burden setting: an evaluation of five artificial intelligence algorithms. *Lancet.* 2021;3(9):e543–54.
171. Jeong YJ, Paeng JC, Nam HY, Lee JS, Lee SM, Yoo CG, et al. 18F-FDG positron-emission tomography/computed tomography findings of radiographic lesions suggesting old healed tuberculosis. *J Korean Med Sci.* 2014;29(3):386–91.
172. Lawal IO, Mokoala KMG, Mathebula M, Moagi I, Popoola GO, Moeketsi N, et al. Correlation Between CT Features of Active Tuberculosis and Residual Metabolic Activity on End-of-Treatment FDG PET/CT in Patients Treated for Pulmonary Tuberculosis. *Front Med.* 2022;9(February):1–10.
173. Sathekge M, Maes A, D'Asseler Y, Vorster M, Van De Wiele C. Nuclear medicine imaging in tuberculosis using commercially available radiopharmaceuticals. *Nucl Med Commun.* 2012;33(6):581–90.
174. Aly M, Revheim M-E, Alavi A. Applications of FDG-PET in infection with emphasis on management of tuberculosis. *J Nucl Med.* 2021;62(supplement 1):2017.
175. Parihar A, Mittal B, Kumar R, Singh H, Bhattacharya A. 18F-FDG PET/CT in Tuberculosis - Unravelling the myriad presentations of a master masquerader. *J Nucl Med* 2020;61(supplement 1):1153.
176. Bakheet SM, Powe J, Ezzat A, Rostom A. F-18-FDG uptake in tuberculosis. *Clin Nucl Med.* 1998 Nov;23(11):739–42.
177. More S, Marakalala MJ, Sathekge M. Tuberculosis: Role of Nuclear Medicine and Molecular Imaging With Potential Impact of Neutrophil-Specific Tracers. *Front Med (Lausanne).* 2021 Dec 10;8:758636.
178. Jones HA, Clark RJ, Rhodes CG, Schofield JB, Krausz T, Haslett C. In vivo measurement of

- neutrophil activity in experimental lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;149(6):1635–9.
179. Goletti D, Lindestam Arlehamn CS, Scriba TJ, Anthony R, Cirillo DM, Alonzi T, et al. Can we predict tuberculosis cure? What tools are available? *Eur Respir J.* 2018;52(5) :1801089..
180. Chen RY, Yu X, Smith B, Liu X, Gao J, Diacon AH, et al. Radiological and functional evidence of the bronchial spread of tuberculosis: an observational analysis. *The Lancet Microbe.* 2021;2(10):e518–26.
181. Martinez V, Castilla-Lievre MA, Guillet-Caruba C, Grenier G, Fior R, Desarnaud S, et al. 18F-FDG PET/CT in tuberculosis: An early non-invasive marker of therapeutic response. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2012;16(9):1180–5.
182. Goo JM, Im JG, Do KH, Yeo JS, Seo JB, Kim HY, et al. Pulmonary tuberculoma evaluated by means of FDG PET: Findings in 10 cases. *Radiology.* 2000;216(1):117–21.
183. Ankrah AO, Glaudemans AWJM, Maes A, Van de Wiele C, Dierckx RAJO, Vorster M, et al. Tuberculosis. *Semin Nucl Med.* 2018;48(2):108–30.
184. Malherbe ST, Shenai S, Ronacher K, Loxton AG, Dolganov G, Kriel M, et al. Persisting PET-CT lesion activity and *M. tuberculosis* mRNA after pulmonary tuberculosis cure. *Nat Med.* 2016;22(10):1094–100.
185. Harms S, Morgan TJ, Yamanashi S, Harle T, Dodd GD. Principles of nuclear magnetic resonance imaging. *RadioGraphics* 1984 4:1, 26-43
186. Kraft SL, Dailey D, Kovach M, Stasiak KL, Bennett J, McFarland CT, et al. Magnetic resonance imaging of pulmonary lesions in guinea pigs infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 2004 Oct;72(10):5963–71.
187. Sharpe SA, Eschelbach E, Basaraba RJ, Gleeson F, Hall GA, McIntyre A, et al. Determination of lesion volume by MRI and stereology in a macaque model of tuberculosis. *Tuberculosis.* 2009;89(6):405–16.
188. Hansell DM, Bankier AA, MacMahon H, McLoud TC, Müller NL, Remy J. Fleischner Society: glossary of terms for thoracic imaging. *Radiology.* 2008 Mar;246(3):697-722

189. Hansell DM, Armstrong P, Lynch DA, McAdams HP. *Imaging of Diseases of the Chest*. 4th ed. Elsevier Inc; 2005. 1219 p.
190. Goodman LR, Felson B. *Felson's Principles of Chest Roentgenology*. 3ed ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2007. 243 p.
191. Palmer PES. Pulmonary tuberculosis - Usual and unusual radiographic presentations. *Semin Roentgenol*. 1979;14(3):204–43.
192. Miller WT, MacGregor RR. Tuberculosis: frequency of unusual radiographic findings. *AJR Am J Roentgenol*. 1978 May;130(5):867-75.
193. Woodring JH, Vandiviere HM, Fried AM, Dillon ML, Williams TD, Melvin IG. Update: The radiographic features of pulmonary tuberculosis. *Am J Roentgenol*. 1986;146(3):497–506.
194. Webb WR, Müller NL, Naidich DP. *High-Resolution CT of the Lung*. 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2003. 628 p.
195. Andreu J, Cáceres J, Pallisa E, Martínez-Rodríguez M. Radiological manifestations of pulmonary tuberculosis. *Eur J Radiol*. 2004;51(2):139–49.
196. Leung AN. State of the Art Pulmonary Tuberculosis. *Radiology*. 1996;199(2):307–22.
197. Burrill J, Williams CJ, Bain G, Conder G, Hine AL, Misra RR. Tuberculosis: A radiologic review. *Radiographics*. 2007;27(5):1255–73.
198. Lee JJ, Chong PY, Lin C Bin, Hsu AH, Lee CC. High resolution chest CT in patients with pulmonary tuberculosis: Characteristic findings before and after antituberculous therapy. *Eur J Radiol*. 2008;67(1):100–4.
199. Goto A, Komiya K, Kan T, Honjo K, Uchida S, Takikawa S, et al. Factors associated with atypical radiological findings of pulmonary tuberculosis. *PLoS One*. 2019;14(7):1–11.
200. Rozenshtein A, Hao F, Starc MT, Pearson GDN. Radiographic appearance of pulmonary tuberculosis: dogma disproved. *Am J Roentgenol*. 2015 May 1;204(5):974–8.
201. Agrons GA, Markowitz RI, Kramer SS. Pulmonary tuberculosis in children. *Semin Roentgenol*.

- 1993;28(2):158–72.
202. Hunter RL. Tuberculosis as a three-act play: A new paradigm for the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*. 2016 Mar 1;97:8–17.
203. Ahn MI, Gleeson TG, Chan IH, McWilliams AM, Macdonald SL, Lam S, et al. Perifissural nodules seen at CT screening for lung cancer. *Radiology*. 2010 Mar;254(3):949–56.
204. de Hoop B, van Ginneken B, Gietema H, Prokop M. Pulmonary perifissural nodules on CT scans: rapid growth is not a predictor of malignancy. *Radiology*. 2012 Nov;265(2):611–6.
205. Mets OM, Chung K, Scholten ET, Veldhuis WB, Prokop M, van Ginneken B, et al. Incidental perifissural nodules on routine chest computed tomography: lung cancer or not? *Eur Radiol*. 2018;28(3):1095–101.
206. Lowenstine LJ, Osborn KG. Respiratory System Diseases of Nonhuman Primates. In: *Nonhuman Primates in Biomedical Research*. Elsevier Inc.; 2012. p. 413–81.
207. Scanga CA, Flynn JL. Modeling tuberculosis in nonhuman primates. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014 Sep 11;4(12):a018564.
208. Via LE, Weiner DM, Schimel D, Lin PL, Dayao E, Tankersley SL, et al. Differential virulence and disease progression following mycobacterium tuberculosis complex infection of the common marmoset (*callithrix jacchus*). *Infect Immun*. 2013;81(8):2909–19.
209. Langermans JA, Andersen P, van Soolingen D, Vervenne RA, Frost PA, van der Laan T, et al. Divergent effect of bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination on Mycobacterium tuberculosis infection in highly related macaque species: implications for primate models in tuberculosis vaccine research. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 25;98(20):11497-502.
210. Peña JC, Ho W-Z. Non-Human Primate Models of Tuberculosis. *Microbiol Spectr*. 2016 Aug 18;4(4).
211. Foreman TW, Mehra S, Lackner AA, Kaushal D. Translational research in the nonhuman primate model of tuberculosis. *ILAR J*. 2017;58(2):151–9.
212. Lin PL, Pawar S, Myers A, Pegu A, Fuhrman C, Reinhart TA, et al. Early events in

- Mycobacterium tuberculosis infection in cynomolgus macaques. *Infect Immun.* 2006 Jul;74(7):3790–803.
213. Panarella ML, Bimes RS. A naturally occurring outbreak of tuberculosis in a group of imported cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2010;49(2):221–5.
214. Payne KS, Novak JJ, Jongsakul K, Imerbsin R, Apisitsaowapa Y, Pavlin JA, et al. Mycobacterium tuberculosis infection in a closed colony of rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2011;50(1):105–8.
215. Garcia MA, Bouley DM, Larson MJ, Lifland B, Moorhead R, Simkins MD, Borie DC, Tolwani R, Otto G. Outbreak of *Mycobacterium bovis* in a conditioned colony of rhesus (*Macaca mulatta*) and cynomolgus (*Macaca fascicularis*) macaques. *Comp Med.* 2004 Oct;54(5):578–84.
216. Shrestha, S., Shrestha, D., Prajapati, M., & Shrestha, S. (2017). Study of Tuberculosis in Rhesus macaques of Nepal. *Nepalese Veterinary Journal*, 34, 113–118.
217. Schmidt LH. Studies on the Antituberculous Activity of Ethambutol in Monkeys. *Ann N Y Acad Sci.* 1966;135(2):747–58.
218. Good RC. Simian Tuberculosis: Immunologic Aspects. *Ann N Y Acad Sci.* 1968;154(1):200–13.
219. Janicki BW, Good RC, Minden P, Affronti LF, Hymes WF. Immune responses in rhesus monkeys after bacillus Calmette-Guerin vaccination and aerosol challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *Am Rev Respir Dis.* 1973 Mar;107(3):359–66.
220. Chaparas SD, Good RC, Janicki BW. Tuberculin-induced lymphocyte transformation and skin reactivity in monkeys vaccinated or not vaccinated with Bacille Calmette-Guérin, then challenged with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Am Rev Respir Dis.* 1975 Jul;112(1):43–7.
221. Rayner EL, Pearson GR, Hall GA, Basaraba RJ, Gleeson F, McIntyre A, et al. Early lesions following aerosol infection of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) with mycobacterium

- tuberculosis strain H37RV. *J Comp Pathol.* 2013;149(4):475–85.
222. Dijkman K, Vervenne RAW, Sombroek CC, Boot C, Hofman SO, van Meijgaarden KE, et al. Disparate Tuberculosis Disease Development in Macaque Species Is Associated With Innate Immunity. *Front Immunol.* 2019 Nov 1;10:2479.
223. Capuano S V., Croix DA, Pawar S, Zinovik A, Myers A, Lin PL, et al. Experimental Mycobacterium tuberculosis infection of cynomolgus macaques closely resembles the various manifestations of human M. tuberculosis infection. *Infect Immun.* 2003 Oct 1;71(10):5831–44.
224. Sharpe S, White A, Gleeson F, McIntyre A, Smyth D, Clark S, et al. Ultra low dose aerosol challenge with Mycobacterium tuberculosis leads to divergent outcomes in rhesus and cynomolgus macaques. *Tuberculosis.* 2016;96:1–12.
225. Maiello P, DiFazio RM, Cadena AM, Rodgers MA, Lin PL, Scanga CA, et al. Rhesus macaques are more susceptible to progressive tuberculosis than cynomolgus macaques: A quantitative comparison. *Infect Immun.* 2018 Feb 1;86(2) :e00505-17..
226. Gormus BJ, Blanchard JL, Alvarez XH, Didier PJ. Evidence for a rhesus monkey model of asymptomatic tuberculosis. *J Med Primatol.* 2004;33(3):134–45.
227. Walsh GP, Tan E V., Dela Cruz EC, Abalos RM, Villahermosa LG, Young LJ, et al. The Philippine cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) provides a new nonhuman primate model of tuberculosis that resembles human disease. *Nat Med.* 1996;2(4):430–6.
228. Lin PL, Rodgers M, Smith L, Bigbee M, Myers A, Bigbee C, et al. Quantitative comparison of active and latent tuberculosis in the cynomolgus macaque model. *Infect Immun.* 2009;77(10):4631–42.
229. Sibley L, White AD, Gooch KE, Stevens LM, Tanner R, Jacobs A, et al. High-dose Mycobacterium tuberculosis aerosol challenge cannot overcome BCG-induced protection in Chinese origin cynomolgus macaques; implications of natural resistance for vaccine evaluation. *Sci Rep.* 2021;11(1):1–14.
230. Zhang J, Xian Q, Guo M, Huang Z, Rao Y, Wang Y, et al. Mycobacterium tuberculosis Erdman

- infection of rhesus macaques of Chinese origin. *Tuberculosis*. 2014;94(6):634–43.
231. Zhang J, Ye YQ, Wang Y, Mo PZ, Xian QY, Rao Y, et al. M. tuberculosis H37Rv infection of Chinese rhesus macaques. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2011 Sep;6(3):362–70.
232. White AD, Sibley L, Gullick J, Sarfas C, Clark S, Fagrouch Z, et al. TB and SIV coinfection; a model for evaluating vaccine strategies against tb reactivation in asian origin cynomolgus macaques: A pilot study using bcg vaccination. *Vaccines*. 2021;9(9):1–14.
233. Sibley L, Dennis M, Sarfas C, White A, Clark S, Gleeson F, et al. Route of delivery to the airway influences the distribution of pulmonary disease but not the outcome of Mycobacterium tuberculosis infection in rhesus macaques. *Tuberculosis*. 2016;96:141–9.
234. Sharpe SA, McShane H, Dennis MJ, Basaraba RJ, Gleeson F, Hall G, et al. Establishment of an aerosol challenge model of tuberculosis in rhesus macaques and an evaluation of endpoints for vaccine testing. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(8):1170–82.
235. White AG, Maiello P, Coleman MT, Tomko JA, Frye LJ, Scanga CA, et al. Analysis of 18FDG PET/CT imaging as a tool for studying Mycobacterium tuberculosis infection and treatment in non-human primates. *J Vis Exp*. 2017 Sep 5;2017(127).
236. North RJ. Mycobacterium tuberculosis is strikingly more virulent for mice when given via the respiratory than via the intravenous route. *J Infect Dis*. 1995;172(6):1550–3.
237. Lewinsohn DM, Tydeman IS, Frieder M, Grotzke JE, Lines RA, Ahmed S, et al. High resolution radiographic and fine immunologic definition of TB disease progression in the rhesus macaque. *Microbes Infect*. 2006;8(11):2587–98.
238. Lin PL, Coleman T, Carney JPJ, Lopresti BJ, Tomko J, Fillmore D, et al. Radiologic responses in cynomolgus macaques for assessing tuberculosis chemotherapy regimens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(9):4237–44.
239. Borrell S, Trauner A, Brites D, Rigouts L, Loiseau C, Coscolla M, et al. Reference Set of Mycobacterium tuberculosis Clinical Strains: A tool for research and product development. *PLoS One*. 2019 Mar 25;14(3):e0214088.

240. Daris R. Swindler, Wood CD. An atlas of primate gross anatomy: baboons, chimpanzee, and man. University of Washington Press; 1975. 370 p.
241. Harkema JR, Plopper CG, Pinkerton KE. Comparative Structure of the Respiratory Tract: Airway Architecture in Humans and Animals. In 2000.
242. Sobotta J. Atlas de Anatomía Humana. 21th ed. Madrid: Edición Médica Panamericana; 2001.
243. Hislop A, Howard S, Fairweather DVI. Morphometric studies on the structural development of the lung in *Macaca fascicularis* during fetal and postnatal life. *J Anat.* 1984;138(1):95–112.
244. Hase RE. Lung lobation in rhesus monkey, compared with man. *AJPA.* 1942;XXIX(2):267–86.
245. Tyler NK, Hyde DM, Hendrickx AG, Plopper CG. Morphogenesis of the respiratory bronchiole in rhesus monkey lungs. *Am J Anat.* 1988 Jul;182(3):215-23.
246. Kulkarni AR, Mehrara BJ, Pusic AL, Matros E, McCarthy CM, Disa JJ. Development of a rhesus monkey lung geometry model and application to particle deposition in comparison to humans Bahman. *Inhal Toxicol.* 2016;32(3):178–82.
247. Mercer RR, Crapo JD. Lower respiratory tract structure of laboratory animals and humans: Dosimetry implications. *Aerosol Sci Technol.* 1993;18(3):257–71.
248. Boyden EA. The development of the lung in the pig-tail monkey (*Macaca nemestrina*,L.). *Anat Rec.* 1976;186(1):15–37.
249. Webb WR, Müller NL, Naidich DP. Alta resolución en TC de pulmón. 3rd ed. Marbán S.L. (edición en español); 2003. 628 p.
250. Webb WR. Thin-section CT of the secondary pulmonary lobule: Anatomy and the image - The 2004 Fleischner Lecture. *Radiology.* 2006;239(2):322–38.
251. Osborne DRS, Effmann EL, Hedlund LW. Postnatal growth and size of the pulmonary acinus and secondary lobule in man. *Am J Roentgenol.* 1983;140(3):449–54.

252. Plopper CG, Harkema JR. The Respiratory System and its use in Research. The Laboratory Primate. Elsevier Limited; 2005. 503–526 p.
253. Sharpe SA, Smyth D, McIntyre A, Gleeson F, Dennis MJ. Refinement and reduction through application of a quantitative score system for estimation of TB-induced disease burden using computed tomography. *Lab Anim.* 2018;52(6):599–610.
254. Lin PL, Maiello P, Gideon HP, Coleman MT, Cadena AM, Rodgers MA, et al. PET CT Identifies Reactivation Risk in Cynomolgus Macaques with Latent M. tuberculosis. *PLoS Pathog.* 2016 Jul 1;12(7).
255. DiFazio RM, Maiello P, Tomko J, Frye L, Bigbee C, Chedrick C, et al. Predicting vaccine efficacy against tuberculosis using immunologic and radiologic measures in the non-human primate model. *J Immunol.* 2016;196(SUPPL. 1): 141.19.
256. Bechini Bernad, J. Estudio de la tuberculosi pulmonar mediante Tomografía Computarizada Multidetector en un modelo experimental de minipig [dissertation]. Badalona (España): Universitat Autònoma de Barcelona; 2016
257. Clark SO, Hall Y, Kelly DLF, Hatch GJ, Williams A. Survival of Mycobacterium tuberculosis during experimental aerosolization and implications for aerosol challenge models. *J Appl Microbiol.* 2011 Aug;111(2):350–9.
258. Marzo E, Vilaplana C, Tapia G, Diaz J, Garcia V, Cardona PJ. Damaging role of neutrophilic infiltration in a mouse model of progressive tuberculosis. *Tuberculosis.* 2014;94(1):55–64.
259. Rossi SE, Franquet T, Volpacchio M, Giménez A, Aguilar G. Tree-in-bud pattern at thin-section CT of the lungs: radiologic-pathologic overview. *Radiographics.* 2005 May-Jun;25(3):789-801
260. Rayner EL, Pearson GR, Hall GA, Gleeson F, McIntyre A, Smyth D, et al. Early lesions following aerosol challenge of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) with Mycobacterium tuberculosis (Erdman strain). *J Comp Pathol.* 2015;152(2–3):217–26.
261. Cardona PJ. The key role of exudative lesions and their encapsulation: lessons learned from the pathology of human pulmonary tuberculosis. *Front Microbiol.* 2015 Jun 16;6:612..

262. Cardona PJ. The key role of exudative lesions and their encapsulation: lessons learned from the pathology of human pulmonary tuberculosis. *Front Microbiol.* 2015 Jun 16;6:612.
263. Palmer M V., Wiarda J, Kanipe C, Thacker TC. Early Pulmonary Lesions in Cattle Infected via Aerosolized *Mycobacterium bovis*. *Vet Pathol.* 2019 Jul 1;56(4):544–54.
264. Evans S, Butler JR, Mattila JT, Kirschner DE. Systems biology predicts that fibrosis in tuberculous granulomas may arise through macrophage-to-myofibroblast transformation. *PLoS Comput Biol.* 2020 Dec 28;16(12):e1008520.
265. Wijsenbeek M, Cottin V. Spectrum of Fibrotic Lung Diseases. *N Engl J Med.* 2020 Sep 3;383(10):958–68.
266. Moore BB, Fry C, Zhou Y, Murray S, Han MK, Martinez FJ, Flaherty KR; The COMET Investigators. Inflammatory leukocyte phenotypes correlate with disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Front Med.* 2014 Dec 22;1(56):56.
267. Zhang L, Wang Y, Wu G, Xiong W, Gu W, Wang C-Y. Macrophages: friend or foe in idiopathic pulmonary fibrosis? *Respir Res.* 2018;19(1):170.
268. Nogueira I, Català M, White AD, Sharpe SA, Bechini J, Prats C, et al. Surveillance of Daughter Micronodule Formation Is a Key Factor for Vaccine Evaluation Using Experimental Infection Models of Tuberculosis in Macaques. *Pathogens.* Feb 2023;12(2):236.

10. ANNEX

L'estudi exposat al llarg dels anteriors capítols com a treball de tesi, també ha donat lloc a la següent publicació en la revista *Pathogens*:

- Nogueira I, Català M, White AD, Sharpe SA, Bechini J, Prats C, et al. Surveillance of Daughter Micronodule Formation Is a Key Factor for Vaccine Evaluation Using Experimental Infection Models of Tuberculosis in Macaques. *Pathogens* [Internet] Feb 2023;12(2):236. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens12020236>



Article

Surveillance of Daughter Micronodule Formation Is a Key Factor for Vaccine Evaluation Using Experimental Infection Models of Tuberculosis in Macaques

Isabel Nogueira ^{1,†}, Martí Català ^{2,3,†}, Andrew D. White ⁴, Sally A Sharpe ⁴, Jordi Bechini ¹, Clara Prats ³, Cristina Vilaplana ^{5,6,7} and Pere-Joan Cardona ^{5,6,8,9,*}

- ¹ Radiology Department, 'Germans Trias i Pujol' University Hospital, 08916 Badalona, Spain
 - ² Comparative Medicine and Bioimage Centre of Catalonia (CMCiB), Germans Trias i Pujol Research Institute (IGTP), 08916 Badalona, Spain
 - ³ Escola d'Enginyeria Agroalimentària i de Biosistemes de Barcelona Departament de Física, Universitat Politècnica de Catalunya (UPC)-BarcelonaTech, 08860 Castelldefels, Spain
 - ⁴ UK Health Security Agency, Porton Down, Salisbury SP4 0JG, UK
 - ⁵ Unitat de Tuberculosi Experimental, Germans Trias i Pujol Research Institute (IGTP), 08916 Badalona, Spain
 - ⁶ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), 28029 Madrid, Spain
 - ⁷ Direcció Clínica Territorial de Malalties Infeccioses i Salut Internacional de Gerència Territorial Metropolitana Nord, 08916 Badalona, Spain
 - ⁸ Microbiology Department, North Metropolitan Clinical Laboratory, 'Germans Trias i Pujol' University Hospital, 08916 Badalona, Spain
 - ⁹ Genetics and Microbiology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, 08913 Cerdanyola del Vallès, Spain
- * Correspondence: pj.cardona@gmail.com
† These authors contributed equally to this work.



Citation: Nogueira, I.; Català, M.; White, A.D.; Sharpe, S.A.; Bechini, J.; Prats, C.; Vilaplana, C.; Cardona, P.-J. Surveillance of Daughter Micronodule Formation Is a Key Factor for Vaccine Evaluation Using Experimental Infection Models of Tuberculosis in Macaques. *Pathogens* 2023, 12, 236. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020236>

Academic Editor: Hwa-Jung Kim

Received: 27 December 2022

Revised: 29 January 2023

Accepted: 1 February 2023

Published: 2 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Tuberculosis (TB) is still a major worldwide health problem and models using non-human primates (NHP) provide the most relevant approach for vaccine testing. In this study, we analysed CT images collected from cynomolgus and rhesus macaques following exposure to ultra-low dose *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) aerosols, and monitored them for 16 weeks to evaluate the impact of prior intradermal or inhaled BCG vaccination on the progression of lung disease. All lesions found (2553) were classified according to their size and we subclassified small micronodules (<4.4 mm) as 'isolated', or as 'daughter', when they were in contact with consolidation (described as lesions ≥ 4.5 mm). Our data link the higher capacity to contain Mtb infection in cynomolgus with the reduced incidence of daughter micronodules, thus avoiding the development of consolidated lesions and their consequent enlargement and evolution to cavitation. In the case of rhesus, intradermal vaccination has a higher capacity to reduce the formation of daughter micronodules. This study supports the 'Bubble Model' defined with the C3HBe/FeJ mice and proposes a new method to evaluate outcomes in experimental models of TB in NHP based on CT images, which would fit a future machine learning approach to evaluate new vaccines.

Keywords: tuberculosis; BCG vaccine; aerosol vaccination; non-human primate; macaque; bubble model; computed tomography scanner

1. Introduction

Understanding the dynamics of tuberculosis (TB) disease is essential for the design of better strategies against it, as TB is a cause of high morbidity and mortality worldwide. *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) infects about 10 million people every year and a quarter of humanity is estimated to be infected. Moreover, it has been the deadliest single infectious disease for decades, killing nearly 1.5 million people annually [1]. Unfortunately, this mortality has been overtaken by SARS-CoV-2 in 2020, a further consequence of which has been a devastating impact on TB care resulting in an estimated additional half a million TB

deaths, thus going back to a mortality level similar to that of 2010 [2,3]. Defeating TB is not yet a feasible goal in the short term, but endeavours must continue to focus on the three cornerstones of prevention, early diagnosis and treatment, and advance the development of new vaccines, biomarkers and drugs with shortened protocols [4–6].

The granuloma is the hallmark of the host response against Mtb infection, appearing as a characteristic round histologic structure and ranging in size from 1–3 mm in diameter [7–12]. There are several studies that describe granuloma subtypes, mainly based on their cell proliferation, matrix quality and pattern distribution under a microscope [9–11,13–16]. In the context of image analysis, granulomas are expected to profusely mineralize and thus be identifiable as calcified micronodules on CT scan images collected from macaques mainly from 20 weeks after experimental infection [11].

Vaccination is one of the essentials for controlling the disease. The Bacille Calmette–Guérin (BCG) vaccine is an attenuated strain of *Mycobacterium bovis*, which was first used in 1921 and still plays a pivotal role in high endemic TB countries, despite low efficacy in some regions [17,18]. BCG has demonstrated protection against TB death and disseminated disease, especially against childhood tuberculous meningitis and miliary disease, but has also shown disparate results in the protection afforded to adults and pulmonary involvement [19–24]. Even though new vaccine candidates are in development [25–27], the centenary vaccine remains as the only licensed vaccine [1] and clinical trials are currently ongoing to explore the efficacy of BCG novel protocols, such as the use of alternative delivery routes such as inhaled (or aerosolized) [28–32], or in revaccination regimens [33,34].

The investigation of prevention strategies and treatments depends on well-characterized experimental animal models. The most clinically relevant experimental model is provided by non-human primates (NHP) as they resemble humans in almost every aspect and mimic human physiological patterns. Macaques are widely reported to manifest the same TB disease as people do [35], also sharing comparable efficacy after BCG vaccination and chemotherapy [36–39]. It is worth emphasizing that the investigation of BCG vaccination in macaques allows the exploration of the whole spectrum of the protection status seen in humans, as the vaccine confers a protective effect in cynomolgus macaques and limited protection in rhesus [28,29,40,41]. The model in rhesus macaques is the one that robustly reproduces active TB lesions [14,36,42–45]. In contrast, cynomolgus macaques reveal a greater similarity with the wide spectrum of outcomes that follow human-Mtb interaction, especially the Asian cynomolgus (with Indonesian and Chinese genotypes), which are better able to contain the progression of the infection, reflecting mainly a latent TB infection, and more limited progression towards active disease [14,15,29]. However, Mauritanian genotype cynomolgus macaques are more susceptible to TB disease, showing outcomes of TB infection more akin to those found in rhesus macaques [45,46].

One important consideration when designing experimental models is to use the route of natural infection and an optimal challenge dose that is sufficient to induce measurable disease, but not at a level that could overwhelm potentially protective effects induced by vaccination and confound the evaluation assessment [14,15,30,36,38,44,47]. The infection after experimental exposure to aerosols containing ultra-low dose inoculum has been demonstrated to closely resemble naturally occurring Mtb exposure, causing disease-induced changes in the lung that can be monitored [14,48]. The evaluation method should be sensitive to allow the detection of subtle differences among prophylactic candidates.

TB disease dynamics are not yet entirely understood. In fact, there is still no canonical hypothesis to explain the progression from latent to active disease. Daughter lesions have already been described during active TB development, appearing near larger lesions, and being associated with the advance of local infection. The 'Bubble Model', firstly conceived by Prats et al. [49] and inspired by soap bubble formation together with previous concepts [5,49–53], hypothesized that progression to active TB was the consequence of the intensity of the inflammatory response in the initial micronodules, the induction of daughter micronodules around the initial nodule and the coalescence of all these lesions that cause the formation of a consolidated lesion, with cavitation capacity. However,

this model was built on data obtained from the murine model with C3HeB/FeJ mice by Marzo et al. [54]. Supportive data obtained from the NHP model would endorse future confirmation in humans.

Image analysis plays a fundamental role in TB disease assessment. Chest X-ray was classically used for diagnosis and still remains a basic tool due to its widespread availability and sufficient sensitivity. Recently, high-quality diagnostic images such as computed tomography (CT), positron emission tomography–computed tomography (PET-CT) and magnetic resonance imaging (MRI) have emerged. However, to our knowledge, there have been limited opportunities to characterize the development of Mtb-induced disease, particularly the early events after infection. Scanning enables the collection of high-quality data in a non-invasive way, allowing the examination of features of particular interest such as lung consolidations, nodules, micronodules (daughter and isolated), cavitation, tree-in-bud lesions and their distribution [5,11,46,48,49,54–62]. CT scanning allows the acquisition of high-quality images in a few seconds (notably faster than MRI and PET-CT), thus minimizing interference caused by respiratory motion, and being also the most available and economical three-dimensional imaging technology. A score system for the estimation of TB burden disease in the NHP model based on CT images developed by Sharpe et al. [63] has been reported.

The aim of this study was to evaluate the progression of Mtb infection in experimental NHP models through the spatial monitoring of the micronodules. We found that the identification of consolidations associated with daughter micronodules would be a useful tool to evaluate the efficacy of new vaccines.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Images were obtained from 35 macaques aged 3–4 years; 13 cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*, of Indonesian genotype) and 22 rhesus macaques (*Macaca mulatta*, of Indian genotype). The macaques enrolled in the studies were obtained from established closed breeding colonies in the United Kingdom and absence of previous exposure to mycobacterial antigens was confirmed by tuberculin skin test as part of colony management procedures and by screening for IFN- γ ELISPOT (MabTech, Nacka, Sweden) responses to tuberculin-PPD (SSI, Copenhagen, Denmark), and pooled 15-mer peptides of ESAT6 and CFP10 (Peptide Protein Research LTD, Fareham, UK). BCG vaccinations were delivered to sedated animals either as a 100 μ L intradermal (ID) injection using Danish strain 1331 (SSI, Copenhagen, Denmark) delivered to the upper left arm, or by exposure to aerosolised BCG Danish strain 1331 created using an Omron MicroAir mesh nebuliser (Omron Healthcare UK Ltd., Milton Keynes, UK) and a modified paediatric anaesthesia mask. The BCG vaccine was prepared for intradermal administration according to manufacturer's instructions for administration to humans. One ml of Sautons diluent was added to a vial of BCG vaccine to give a suspension of BCG at an estimated concentration of between 2 and 8×10^6 CFU/mL. The vaccination dose was selected to be equivalent to a standard adult intradermal dose [13,14,28]. The macaques were experimentally infected with Mtb (Erdman strain K 01) ultra-low dose aerosol exposure (presented dose 19–26 CFU) as previously described [14], and following exposure to MTB, macaques were housed in facilities compliant with the Advisory Committee for Dangerous Pathogens Level 3 (ACDP3) regulations. Compatible social groups were housed in accordance with the Home Office (UK) Code of Practice for the Housing and Care of Animals Used in Scientific Procedures (1989), and the National Committee for Refinement, Reduction and Replacement (NC3Rs) Guidelines on Primate Accommodation, Care and Use, August 2006 (NC3Rs, 2006). Cages were approximately 2.5 M high by 4 M long by 2 M deep, constructed with high level observation balconies and with a floor of deep litter to allow foraging. Additional environmental enrichment was afforded by the provision of toys, swings, feeding puzzles and DVDs for visual stimulation. In addition to standard old-world primate pellets, diet was further supplemented with a selection of fresh vegetables and fruit. For each procedure,

sedation was applied by intramuscular injection with ketamine hydrochloride (10 mg/kg) (Ketaset, Fort Dodge Animal Health Ltd., Southampton, UK). None of the animals had been used previously for experimental procedures and each socially compatible group was randomly assigned to a particular study treatment. The study design and all procedures were approved by the UKHSA Porton Down Animal Welfare and Ethical Review Body, and authorised under an appropriate UK Home Office project license.

Animals were sedated at regular intervals to measure body weight and temperature, red blood cell (RBC) haemoglobin levels and erythrocyte sedimentation rate (ESR) and for collection of blood samples, X-radiographs or CT scans. Animal behaviour was observed throughout the studies for contra-indicators and the time of necropsy, if prior to the end of the planned study period, was determined by experienced primatology staff based on a combination of the following adverse indicators: depression or withdrawn behaviour, abnormal respiration (dyspnoea), loss of 20% of peak post-challenge weight, ESR levels elevated above normal (>20 mm), haemoglobin level below normal limits (<100 g/dL), increased temperature (>41 °C) and abnormal thoracic radiograph.

The studies reported describe individuals with active TB that was either controlled during the study period or progressed to levels that met humane endpoint criteria. TB was not latent in any of the subjects.

2.2. Experimental Groups

Once CT images analysis was concluded, we defined five experimental groups among the thirty-five macaques, based on the genotype and their vaccination status: cynomolgus unvaccinated (CUV, n = 10), cynomolgus intradermal-BCG-vaccinated (CIDV, n = 3), rhesus unvaccinated (RUV, n = 11), rhesus aerosolized, or inhaled, BCG-vaccinated (RAEV, n = 6) and rhesus intradermal-BCG-vaccinated (RIDV, n = 5). These groups together with CT scan schedule are shown in Figure 1 and Supplementary Figure S1.

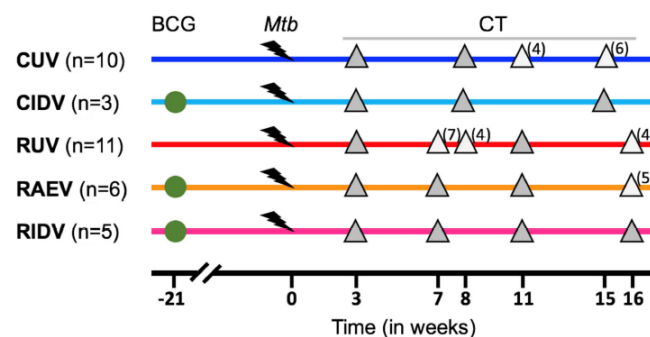


Figure 1. Study schedule. Macaques received BCG vaccination (green circles) delivered by aerosol or intradermal injection, or were left as unvaccinated controls. All animals received ultra-low dose aerosol challenge with Mtb 21 weeks after. Gray triangles indicate application of 'in vivo' CT scanning. Light grey triangles indicate the time points where not all animals were scanned and the number between brackets shows in how many of them this was effectively performed. In blue, unvaccinated cynomolgus (CUV). In cyan, intradermal-vaccinated cynomolgus (CIDV). In red, unvaccinated rhesus (RUV). In orange, aerosol-vaccinated rhesus (RAEV). In purple, intradermal-vaccinated rhesus (RIDV).

2.3. CT Images

We analysed 123 computed tomography (CT) scans obtained from subjects enrolled in different studies [13,14,28] where sequential images were acquired from each macaque on three or four occasions during the post-infection period from the 3rd to the 16th week (Figure 1 and Supplementary Figure S1).

Chest multidetector CT scans were obtained by using a 16 slice Lightspeed CT scanner (General Electric Healthcare, Milwaukee, WI, USA), from sedated subjects while free breathing. Technical parameters applied: tube voltage, 120 kVp; tube current modulation, 100–150 mA. Reconstructions were made using a high spatial frequency algorithm and lung window at a slice thickness of 0.625 mm. These technical parameters are extracted from the original animal experimental studies [13,14,28].

2.4. TB Lung Lesions Analysis from CT Images

CT scans were evaluated by a medical consultant radiologist with expertise in respiratory diseases and her supervisor. Both were blinded to vaccination status and clinical data. Data show the consensus between both. Images were then examined in Philips IntelliSpace Portal software (2015 Koninklijke Philips N.V.) by multiplanar reformatting axial, coronal and sagittal, and maximum intensity projection (MIP) to detect the smallest nodules. The Tumor Tracking tool from the mentioned software was used to analyse the volume and main axis of each lesion. We used standard image descriptors, accepted and reproducible concepts from radiologic lexicon detailed on Fleischner Society Glossary as well as in previous studies based on CT images [63].

- A. Micronodule is a small solid lung nodule with smooth margins.
- B. Consolidation (also referred to as consolidated lesion) is a pneumonic patch or necrotizing consolidative process that occupies and even destroys alveoli, and it is described in CT images as a soft tissue lesion within lung parenchyma showing irregular margins.
- C. Cavitation corresponds to the appearance of gas within lung consolidations. It is described as a central radiolucency image, which matches with gas density, surrounded by soft tissue [8,57].
- D. Pleural distance is defined as the distance between the margin of each consolidation to the closest pleura or fissure.

2.5. Statistical Assessment

To compare the mean and variance of the different observations in the two groups we used the one-way ANOVA test and Kruskal–Wallis test to determine the existence of significant differences. To compare the observed distribution of data into discrete categories, we built a contingency table and the Fisher's test. Implementation was conducted in MATLAB and Prism. We computed the mean with available data. In the plots, we indicated with a dashed line if there were missing data. Recollected data are available in the Supplementary Material (Supplementary File raw data).

3. Results

3.1. Preliminary Images' Assessment and Anatomy

We were provided with high-quality CT scan images, similar to those acquired for medical diagnosis in humans. A first anatomical examination corroborated that cynomolgus macaques had a smaller lung volume than rhesus macaques (Supplementary Figure S2). Overall, 323 consolidations were identified; 285 were found in rhesus and 38 in cynomolgus, with a median of 14 and 2 lesions per animal, respectively (Table 1). A total of 2228 micronodules were detected, the majority of which (1924) were found in rhesus macaques, while 304 micronodules were detected in cynomolgus (Table 2). Collected data revealed that lesions globally increase over time. Right lung lobes developed more consolidations in number but left lung lobes presented with a higher proportion occupied by disease. A non-significant trend was seen for the major involvement to occur in the upper lobes, which was higher in the left side (Supplementary Figure S3). Further CT scans' inspection showed the lung lobes to be separated by pleural fissures as well as bronchovascular bundles, thus presenting the same airway anatomy pattern seen in humans. The right lung is the largest and is composed of upper, middle, lower and infracardiac (or accessory or azygous) lobes, and the left lung is composed of upper, middle (or lingula) and lower lobes [64–69].

However, in our study, the fissure for the middle left lobe was frequently incomplete or even absent.

We established the following measurements per each lesion:

For micronodules, we considered all lesions with a maximum axis ranging from 1 to 4.4 mm (which equates to a maximum volume of 0.044 cm³). Their length mainly falls in the granuloma's size (1–3 mm), but we also included rounded spherical lesions with a maximum axis under 4.5 mm, as they tended to be stable. In contrast, almost all lesions above 4.5 mm increased or showed an instable size. We defined two subgroups: (a) Daughter micronodules, found around consolidations, such as satellites, that are presumably generated from that consolidated lesion [5,49,54]. They are located within an annular zone, where the amplitude of this circular crown corresponds to the consolidation's short axis; they were counted for each CT scan (Figure 2). (b) Isolated micronodules, the ones independent or not associated with a consolidated lesion (Figure 3). The size and number of them were determined together within their bronchopulmonary segment.

Consolidations are large enough to be followed up and carefully tracked over consecutive scans, and their axis (mm) and volume (cm³) were measured (Figure 4). We considered that these kinds of lesions modify their size over time and are equal or bigger than 4.5 mm.

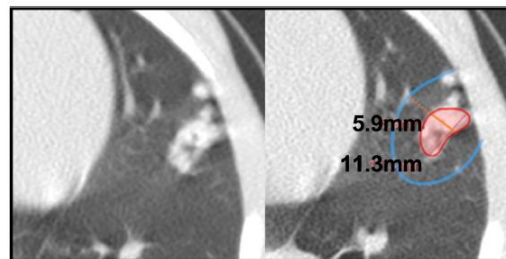


Figure 2. Consolidation with daughter micronodules. Left picture shows original CT image from a lesion located in the inferior lingular bronchopulmonary segment at 11th week scan in an unvaccinated rhesus (RUV10). Right picture exposes that daughter micronodules are those situated within a surrounding area that has the same length as the consolidation's short axis. At same time, this figure exhibits the lesional complex consisting of a consolidation with daughter micronodules.

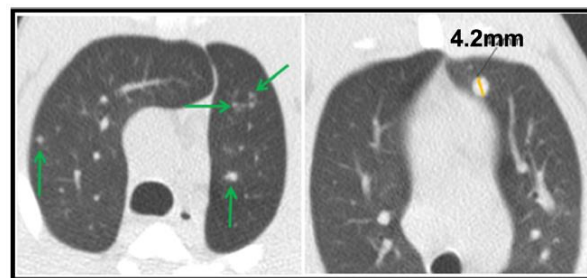


Figure 3. Isolated micronodules. Left picture shows several small isolated micronodules distributed on both upper lung lobes in an intradermic-vaccinated rhesus (RIDV02) at 3rd week scan. Right picture exhibits a large isolated micronodule (4.2 mm) located in the anterior bronchopulmonary segment in the left upper lobe at 3rd week scan in an intradermic-vaccinated rhesus (RIDV04). Notice that nodular images not labelled correspond to pulmonary vessels.

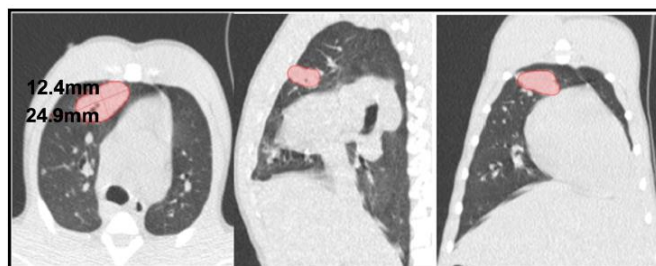


Figure 4. CT tridimensional evaluation. Example of a cavitated consolidation in an intradermic-vaccinated rhesus (RIDV02) at 16th week (pictures from left to right: axial, sagittal and coronal CT scan planes). Its main axis measures 31.4 mm and its volume reaches 2.308 cm³.

Cavitations must have a greater size than the surrounding bronchial calibre, for avoiding misinterpretation with air bronchogram. It was assessed qualitatively, being present (yes) or absent (no).

In pleural distance measurements we also determined the lung volume from each animal, using the COPD tool from the Philips IntelliSpace Portal software, which allowed the evaluation of the main airway and volume from both lungs separately.

We also observed foci of bronchocentric pneumonia, detected as a 'tree-in-bud' pattern in CT images, which is a common CT finding in active lung TB [58–61,70,71]. However, we did not include them in our analyses due to their lack of homogeneity and instability, which made them difficult to demarcate and to follow-up.

RUV05 presented with miliary tuberculous disease and developed hundreds of lung micronodules distributed diffusely and homogeneously (as well as extrapulmonary miliary disease). Such profuse dissemination is well known and has been described in other studies as 'widespread discrete pulmonary nodules' [63,72]. It is uncommon and denotes extremely uncontrolled infection with hematogenous dissemination. Our study was focused on pulmonary pneumonia and airway dissemination; hence, we removed the data collected from this animal from the statistical evaluation due to the different TB disease.

Table 1. Distribution of the lesions, comprising all time points and experimental groups.

EG	Consolidations			Daughter Micronodules			Isolated Micronodules		
	Median	Range	%	Median	Range	%	Median	Range	%
CUV (n = 320)	2	[0 6]	9	5.5	[0 30]	23	5.5	[0 110]	68
CIDV (n = 22)	4	[0 6]	45	0	[0 1]	5	4	[2 5]	50
C (n = 342)	2	[0 6]	11	3	[0 30]	22	4	[0 110]	67
RUV (n = 871)	12.5	[1 25]	14	36	[2 96]	49	30	[1 83]	37
RAEV (n = 643)	14.5	[0 19]	12	54	[0 151]	66	18.5	[14 37]	22
RIDV (n = 697)	15	[12 24]	12	55	[45 138]	53	29	[21 117]	35
R (n = 2211)	14	[0 25]	13	51	[0 151]	55	29	[1 117]	32
TOTAL (n = 2553)	10.5	[0 25]	13	27.5	[0 151]	51	20	[0 117]	37

EG: Experimental group. CUV: unvaccinated cynomolgus; CIDV: intradermal-BCG-vaccinated cynomolgus; C: total cynomolgus; RUV: unvaccinated rhesus; RAEV: aerosol-BCG-vaccinated rhesus; RIDV: intradermal-BCG-vaccinated rhesus; R: total rhesus. n means the total number of lesions per each experimental group. Median shows the value separating the higher half from the lower half of the number of each type of lesion per experimental group.

Table 2. Distribution of micronodules, comprising all time points and experimental groups.

EG	Number (n)			Fraction DM/IM
	Total	DM	IM	
CUV	293	75	218	0.34
CIDV	12	1	11	0.09
C	304	75	229	0.33
RUV	752	428	324	1.32
RAEV	564	424	140	3.03
RIDV	611	368	243	1.51
R	1924	1216	708	1.72

DM: Daughter micronodules; IM: isolated micronodules; EG: experimental group. CUV: unvaccinated cynomolgus; CIDV: intradermal-BCG-vaccinated cynomolgus; C: total cynomolgus; RUV: unvaccinated rhesus; RAEV: aerosol-BCG-vaccinated rhesus; RIDV: intradermal-BCG-vaccinated rhesus; R: total rhesus.

3.2. Mtb-Induced Disease Is Worse in Rhesus Macaques

In order to exemplify the complexity of the operational procedure, Figure 5 illustrates a particular evolution in one case (RIDV02). Overall development of the natural infection in control groups is summarized in Figure 6. The temporal evolution of the lesions is shown per animal, based on the size and localization per lobe in a 2D representation. Each pair of lungs is reshaped according to each individual volume (adapted to the image obtained from macaque RUV04).

At first sight, this summary highlights the greater severity of the infection in rhesus. In particular, at week 3, cynomolgus developed a low number of lesions, with a small volume, which were usually well controlled and exhibited minimal enlargement with time. Lesions were not identified in one individual (CUV10), although infection was confirmed by other methodologies. Other individuals showed a decline in condition only at the late phase (15th week) of the study, e.g., CUV07, in which an extraordinary growth of consolidations was detected on CT images that was probably due to total main bronchus stenosis (despite it being uncommon in cynomolgus).

In contrast, lesions in rhesus were abundant and larger at week 3, usually exhibiting enlargement and dissemination over time. Poor control leading to extreme disease was evident in RUV05 (which developed profuse miliary dissemination, described above) and also in RUV06 and RUV08; these animals had to be euthanized before finishing the monitoring period due to progressive disease that met humane endpoint criteria. However, there was at least one case in a rhesus where a spontaneous weak regression of lesions was observed (RUV10) (Figure 6).

Cynomolgus macaques developed significantly fewer lung consolidations and micronodules, resulting in a smaller pulmonary volume occupation than that seen in rhesus macaques, as shown in Table 1 and Figure 7. Cynomolgus also had a significantly lower percentage of daughter micronodules than rhesus (Tables 1 and 2, and Figure 8). The overall ratio of daughter/isolated micronodules for non-vaccinated macaques comprising all time points was 1.32 and 0.34 for rhesus and cynomolgus, respectively. Similarly, the number of consolidated lesions associated with daughter micronodules was also significantly lower in cynomolgus (Table 3). These data reflect a higher containment of lesions' progression in cynomolgus.

The size of consolidated lesions was highly dependent on the number of daughter micronodules. This is reflected in Figure 9 where a clear and significant correlation is noted between the size of the consolidated lesions and the number of daughter micronodules, regardless of the vaccination status. This positive slope is markedly higher in rhesus. In addition, a greater portion of occupied pulmonary volume is correlated to a higher number of isolated micronodules (Supplementary Figure S4), so the higher the infectious involve-

ment of lungs, the higher the rate of pulmonary dissemination (local and endobronchial reinfections, which fits with the Dynamic Hypothesis [52]).

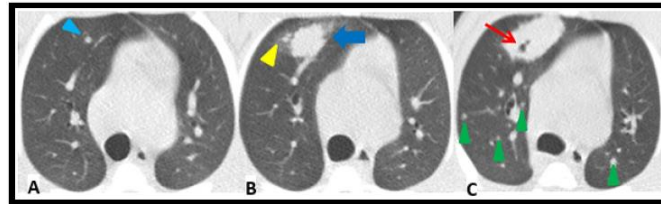


Figure 5. Pulmonary TB progression. Lesions from 3rd to 16th post-challenge week in an intradermic-vaccinated rhesus (RIDV02). (A): A 3rd week CT shows a lesion in the anterior bronchopulmonary segment in the right upper lobe that initially is a 2.1 mm isolated micronodule (light blue arrowhead). (B): An 11th week scan exhibits its progression to a consolidation (dark blue arrow) and the development of two daughter micronodules (yellow arrowhead). (C): CT performed at 16th week shows a higher enlargement of the consolidation, in which arose a cavitation (red arrow). Moreover, some small isolated micronodules (green arrowheads) appeared distributed on both lungs. Notice that nodular images not labelled correspond to pulmonary vessels.

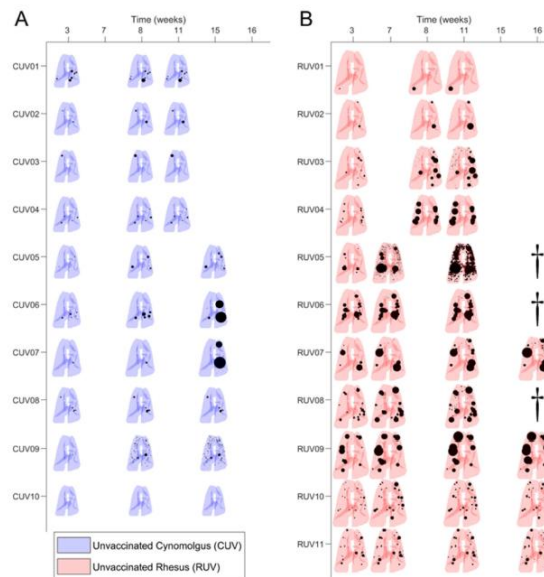


Figure 6. Evolution of lesions in unvaccinated macaques. The size and location of TB lesions determined from computed tomography (CT) scan taken at specific times after initial infection are shown in each pair of lungs. Lesions (consolidations and micronodules), in black, are represented as spheres of the measured volume and located in the segment where they are identified. (A) In blue, reconstructions of CT scans from each unvaccinated cynomolgus. (B) In red, reconstructions of CT scan collected from each unvaccinated rhesus. Macaques RUV05, RUV06 and RUV08 marked with dagger symbol were euthanized before the end of the study.

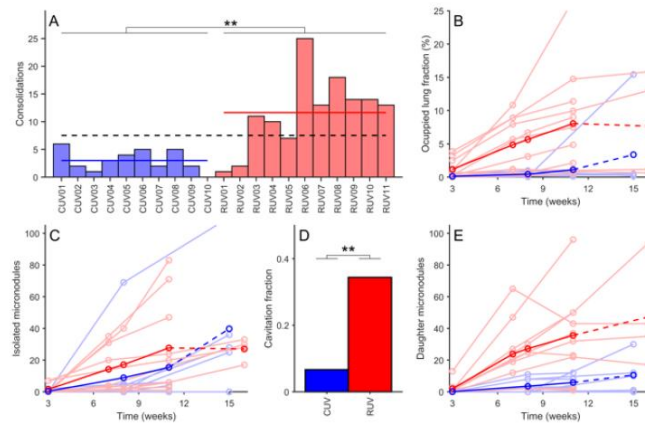


Figure 7. Analysis of unvaccinated macaques. (A) displays the number of identified consolidations for each macaque at the end of the study. In light blue, each non-vaccinated cynomolgus (CUV) macaque is represented. In blue, the mean number of lesions for CUV macaques. In light red, each non-vaccinated rhesus (RUV) macaque is represented. In red, the mean number for RUV macaques. Dotted black line shows the mean value for all non-vaccinated macaques. (B) shows the occupied lung fraction for each macaque. (C) shows the number of isolated micronodules for each macaque. (D) shows the fraction of consolidations that present cavitation in any CT scan. E shows the number of daughter micronodules for each macaque. In (B–E) each circle represents an experimental measurement from computed tomography (CT) scans. Light lines represent the evolution for each macaque. Darker lines are the mean lines' value. Dotted lines are used when one or more macaques are not considered because they were euthanized, or the study ended before that time point. Data is analysed through one-way ANOVA test (** $p < 0.01$).

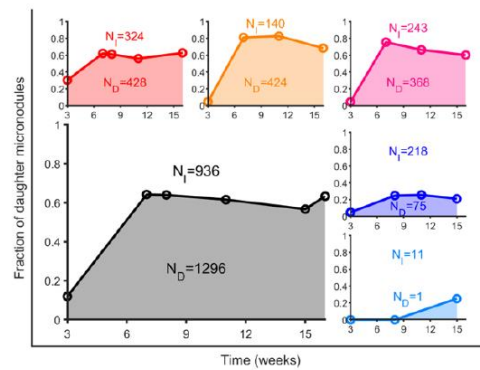


Figure 8. Fraction of daughter micronodules. Number of total isolated micronodules (N_I) and number of total daughter micronodules (N_D) are shown in grey. Total number of micronodules is computed considering all CT scans independently. Total fractions are depicted in blue for unvaccinated cynomolgus (CUV); in cyan, for intradermal-vaccinated cynomolgus (CIDV); in red, for unvaccinated rhesus (RUV); in orange, for aerosol-vaccinated rhesus (RAEV); and in purple, for intradermal-vaccinated rhesus (RIDV).

Table 3. Distribution of consolidations associated with daughter micronodules, comprising all time points and experimental groups.

EG	Consolidations with DM				DM per Consolidation	
	n	%	Median	Range	Median	Range
CUV (n = 29)	19	66	2	[0 4]	3	[1 15]
CIDV (n = 10)	1	10	0	[0 1]	1	[1 1]
C (n = 39)	20	51	1	[0 4]	3	[1 15]
RUV (n = 121)	111	92	11.5	[1 24]	3	[1 15]
RAEV (n = 80)	79	99	14.5	[0 19]	3.5	[1 15]
RIDV (n = 88)	84	95	14	[11 24]	3	[1 15]
R (n = 289)	274	95	14	[0 24]	3	[1 15]
Total (n = 328)	294	90	9	[0 24]	3	[1 15]

DM: Daughter micronodules. EG: Experimental group. CUV: unvaccinated cynomolgus; CIDV: intradermal-BCG-vaccinated cynomolgus; C: total cynomolgus; RUV: unvaccinated rhesus; RAEV: aerosol-BCG-vaccinated rhesus; RIDV: intradermal-BCG-vaccinated rhesus; R: total rhesus. n mean number of lesions.

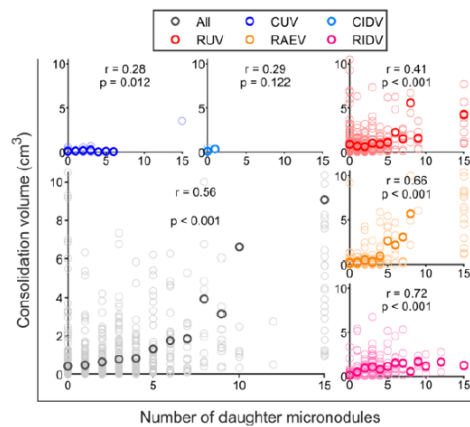


Figure 9. Correlation between the volume of consolidated lesions and the number of daughter micronodules. Light circles represent a single consolidation. Dark circles represent the mean volume value of all consolidations that present the same number of daughter micronodules. Correlation value between both quantities is written as r . The significance of correlation value is determined from the p -value that is shown under correlation value, according to the X test. In blue, unvaccinated cynomolgus (CUV); in cyan, intradermal-vaccinated cynomolgus (CIDV); in red, unvaccinated rhesus (RUV); in orange, aerosol-vaccinated rhesus (RAEV); in purple, intradermal-vaccinated rhesus (RIDV); in grey, all macaques (all).

We also detected some transitional lesions, which correspond to isolated micronodules that increased to a size of more than 4.4 mm from one CT to the next, thus becoming a consolidation (Table 1). This enlargement occurred mainly in the early phase between the third and eighth week post-challenge. Remarkably, rhesus developed directly a large number of consolidations in the early phase after infection, in contrast to cynomolgus; hence, transitional lesions represent a higher impact on cynomolgus. Importantly, there is no significant difference between both macaque genotypes considering the progression of isolated micronodules towards consolidated lesions.

3.3. BCG Vaccination in Rhesus Macaques Reduces the Number of Lesions, Although Intradermal Vaccination Better Controls Daughter Micronodules

Initial evaluation of the impact of vaccination in macaques suggested that a protective effect appeared by the 3rd week post-challenge (Figures 6, 8 and 10). However, a deeper analysis revealed that protection measured in terms of infection (i.e., occupied lung fraction at week 3), did not appear to provide a reliable indicator of later outcome (Supplementary Figures S5 and S6). When each disease volume fraction was normalized against the maximum infiltrated lung volume per macaque (Figure 11), it revealed a clear impact of the vaccination in cynomolgus macaques early after challenge, although it did not last until the end of the monitoring time.

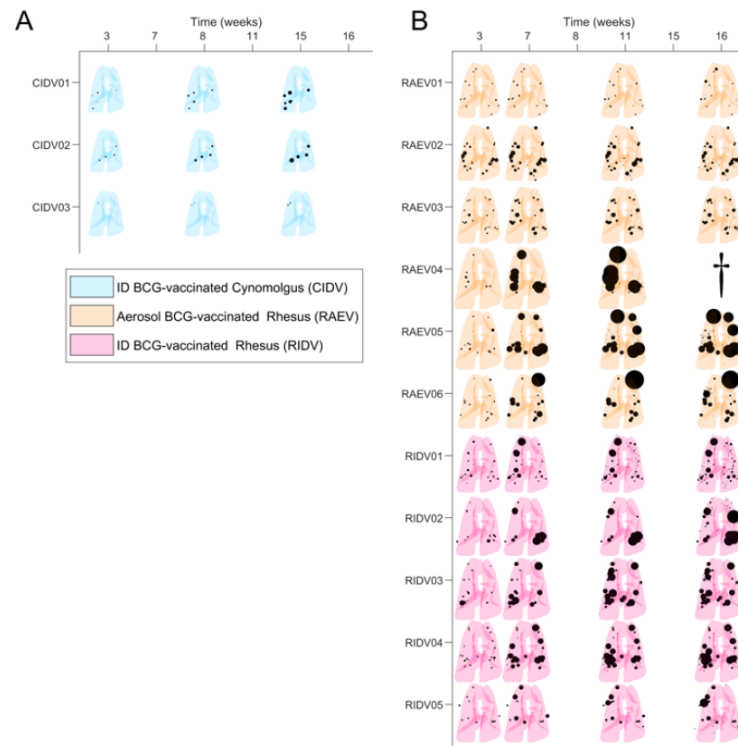


Figure 10. Lesions' evolution in vaccinated macaques. Each pair of lungs show the size and location of TB lesions determined from computed tomography (CT) scan taken after initial infection. Lesions (consolidations and micronodules), in black, are represented as spheres of the measured volume and located in the segment where they were identified. (A) In cyan, the reconstructions of lungs from intradermal-vaccinated cynomolgus (CIDV) for each CT scan. (B) In orange, the reconstructions of lungs from aerosol-vaccinated rhesus (RAEV) for each CT scan. In purple, the reconstructions of lungs from intradermal-vaccinated rhesus (RIDV) for each CT scan. Macaque RAEV04 marked with dagger symbol was euthanized before the planned end of study, according to the welfare monitoring plan.

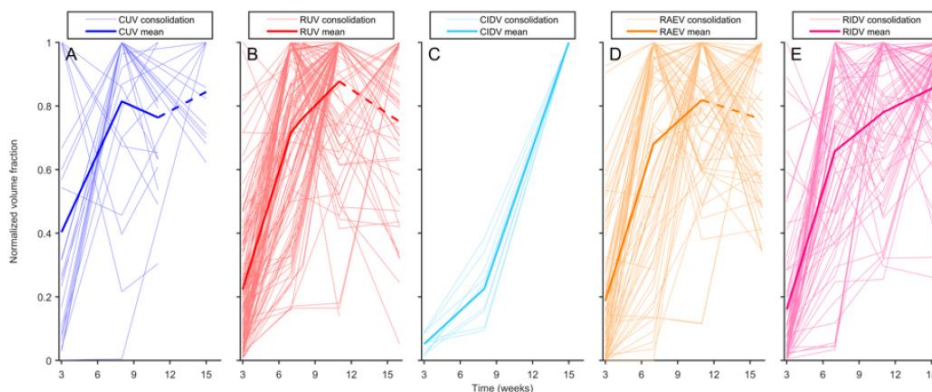


Figure 11. Evolution of normalized occupied lung volume per each individual and experimental group. Volume of each involved area is divided by the maximum occupied lung volume reached by each individual. (A) Light blue lines indicate values for unvaccinated cynomolgus (CUV). Blue line indicates the mean value of all light blue lines. (B) shows light red lines for unvaccinated rhesus (RUV). Red line is the mean value of all light red lines. (C) shows light cyan lines for intradermal-vaccinated cynomolgus (CIDV). Cyan line shows the mean value of all light blue lines. (D) shows light orange lines are for aerosol-vaccinated rhesus (RAEV). Orange line is the mean value of all light blue lines. (E) shows light purple lines are for intradermal-vaccinated rhesus (RIDV). Purple line is the mean value of all light blue lines. Dotted line appears for some lesions where data are not available due to study finalization or euthanized macaque.

Due to the correlation between the volume of the consolidated lesions and the number of daughter micronodules, we investigated if vaccination had an impact on this fraction of micronodules in relation to the enlargement of consolidated lesions, and this was the case. Looking at Figure 8, vaccination clearly reduced this fraction in all vaccinated macaques, although temporally in rhesus, as it rapidly resumed by week 7 to 8. The reduction in this parameter only prevails in cynomolgus until the 15th week.

Evaluation of the route of vaccination in rhesus revealed an interesting paradox. While aerosol vaccination (RAEV) reduced the total number of micronodules, more than intradermal vaccination (RIDV), a significantly greater fraction of daughter micronodules were present (3.03) (Table 4). Thus, the protective effect of RAEV relies on the reduction in the total number of micronodules (Tables 2 and 3) rather than the control of subsequent consolidation development. Even though the reduction in total micronodules was weaker in the RIDV, its effect was noted in both types of micronodules, even when this fraction was slightly higher in RIDV (1.51) than non-vaccinated (RUV) (1.32) (Table 2). At the end, this means that progression towards consolidation at a hypothetical later time point would be faster in the RAEV group, followed by RIDV and RUV.

The effect of vaccination in rhesus was also observed as a decrease in the proportion of consolidated lesions that were associated with daughter micronodules, which was more pronounced and significant after intradermal (95%) than after aerosol vaccination (99%) (Tables 3 and 5). This effect was even more pronounced in cynomolgus, although in this case there was no variation in the proportion of isolated and daughter micronodules between vaccinated (intradermal) and unvaccinated groups (Tables 2 and 4). This can be explained because, as indicated above, cynomolgus are able to spontaneously stop the progression of the consolidated lesions soon after the infection (i.e., before week 3 after challenge).

Table 4. Differences in the proportion of daughter and isolated micronodules per experimental group. Contingency table.

EG	CUV	CIDV	C	RUV	RAEV	RIDV	R
CUV	ND						
CIDV	0.3057	ND					
C	ND	ND	ND				
RUV	ND	ND	ND	ND			
RAEV	ND	ND	ND	<0.0001	ND		
RIDV	ND	ND	ND	0.32431	<0.0001	ND	
R	ND	ND	<0.0001	ND	ND	ND	ND

EG: Experimental group. CUV: unvaccinated cynomolgus; CIDV: intradermal-BCG-vaccinated cynomolgus; C: total cynomolgus; RUV: unvaccinated rhesus; RAEV: aerosol-BCG-vaccinated rhesus; RIDV: intradermal-BCG-vaccinated rhesus; R: total rhesus. Numbers correspond to *p*-values (Fisher's test).

Table 5. Differences in the proportion of consolidated lesions associated with daughter micronodules per experimental group. Contingency table.

EG	CUV	CIDV	C	RUV	RAEV	RIDV	R
CUV	ND						
CIDV	0.0014	ND					
C	ND	ND	ND				
RUV	ND	ND	ND	ND			
RAEV	ND	ND	ND	0.0585	ND		
RIDV	ND	ND	ND	0.0355	>0.999	ND	
R	ND	ND	<0.0001	ND	ND	ND	ND

EG: Experimental group. CUV: unvaccinated cynomolgus; CIDV: intradermal-BCG-vaccinated cynomolgus; C: total cynomolgus; RUV: unvaccinated rhesus; RAEV: aerosol-BCG-vaccinated rhesus; RIDV: intradermal-BCG-vaccinated rhesus; R: total rhesus. Numbers correspond to *p*-values (Fisher's test).

3.4. Cavitation Is More Probable in Larger Lesions and Contact with Pleura Appear to Impact on TB Progression

Cavitation occurred mostly in rhesus and especially at the late phase, where 34.4% of consolidated lesions developed cavities in non-vaccinated rhesus (RUV), closely followed by 28.4% of the aerosolized (RAEV) and by 24.3% of the ID (RIDV). Analysis of cavitation in rhesus (Figure 12) revealed a relationship with lesion size ($p < 0.0001$): the higher the consolidation volume, the higher the rate of cavitation, with cavitation more probable in lesions greater than 2 cm³, which represents a rate of 57%. In contrast, almost 80% of lesions from 0 to 2 cm³ did not cavitate. The anatomic distribution of lesions was not found to influence cavity formation.

We also evaluated the relationship between consolidations and pleura, in order to investigate if the contact with pleura favoured the encapsulation process of the lesions and stopped enlargement. As shown in Supplementary Figure S7, the group of smaller lesions (up to 0.5 cm³, which accounts for the higher number of consolidations) were mainly not in contact with the pleura, especially in rhesus (which have bigger lungs), and from this size on, consolidations were mainly in contact with the pleura.

The next step was to determine if consolidations changed between two consecutive CT scans, with respect to their size and distance from pleura. Thus, we evaluated the change in the volume together with the relationship with the contact with pleura. We explored the change in the relative volume gradient, explained through a boxplot (Figure 13). In this regard, differences are significant ($p = 0.04$ Kruskal–Wallis) in cynomolgus for those consolidations that make contact with the pleura, as they remain stable in volume. Thus, pleural contact is protective in cynomolgus, preventing the progression of consolidations, and this trend is irrespective of their vaccination status. In contrast, in rhesus, consolidations that enlarge and make contact with pleura do not experience a volume control because the increase in the size is too fast and large to benefit from the encapsulation process activated by the pleura.

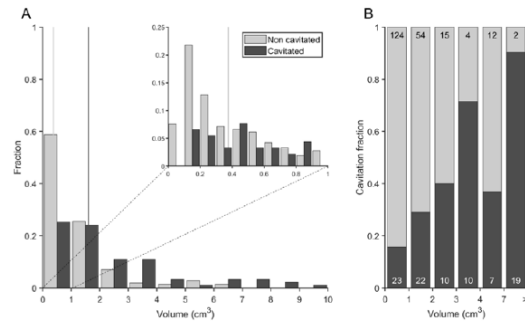


Figure 12. Relation between the fraction and the volume of cavitated consolidations in rhesus macaques. (A) Consolidation volume distribution for non-cavitated (light grey) and cavitated (dark grey) lesions. Vertical lines show the median values for each of the subsets. (B) Cavitation fraction for the consolidations that are in a desired range of volumes: 0 to 1 cm³, 1 to 2 cm³, 3 to 4 cm³, 4 to 7 cm³ and consolidations bigger than 7 cm³. The number of non-cavitated consolidations observed is shown in black, at the top. In white, at the bottom, the number of cavitated consolidations observed.

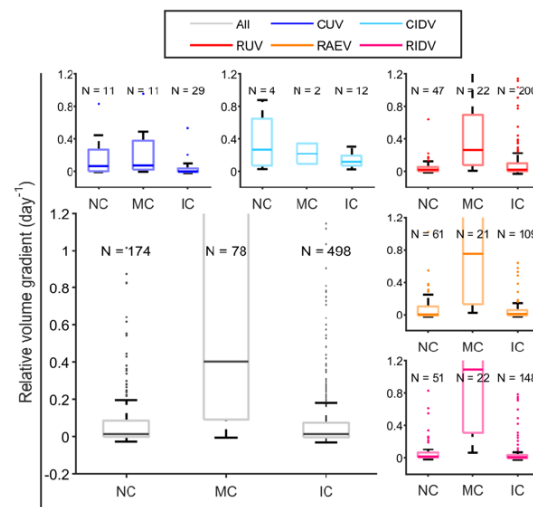


Figure 13. Volume increase in the consolidations in relation with the contract with pleura. The increase in volume is expressed as relative gradient per day between two consecutive CT scans. Consolidations are classified between: not in contact (NC), if in both CT scans it is not in contact with pleura; make contact (MC), if it is not in contact in the first CT but it is in contact in the second; and in contact (IC), if in both CT scans it is in contact with pleura. It is indicated how many cases are identified for each classification. In blue, unvaccinated cynomolgus (CUV); in cyan, intradermal-vaccinated cynomolgus (CIDV); in red, unvaccinated rhesus (RUV); in orange, aerosol-vaccinated rhesus (RAEV); in purple, intradermal-vaccinated rhesus (RIDV); in grey, all macaques (all).

4. Discussion

TB remains a major killer of humankind, and the lack of a surrogate of protection, means there is a constant need for the field to find experimental models able to elucidate

new biomarkers and correlates to assist the development of new more effective vaccines. Nowadays, the macaque is considered the most clinically relevant experimental infection model of TB given its physiological closeness with humans and the similarity in disease manifestations. However, the macaque does lack the interlobular septa, present in human lungs, which have been demonstrated to provide a protective mechanism in the minipig model [9]. The outcome of experimental infection with Mtb has been widely studied in macaques, and models established in rhesus and cynomolgus have been used to assess the efficacy of new drugs and vaccines. Mtb infection in cynomolgus resembles what occurs in humans, with the display of the whole spectrum of human TB, mainly controlling the infection and becoming latently infected. In contrast, rhesus experience a rapid dissemination of the infection in the lung, with the development of active TB in almost all the infected animals, a characteristic that enables the capacity of vaccines to protect against this progression to be assessed using manageable group sizes [73].

There are little data on vaccines showing significant protection against Mtb challenge in the macaque model with reports limited to BCG delivered intravenously (IV), for which the clinical deplorability is debatable, or a CMV-vectored vaccine [74] that is at the preclinical stage of development, and MTBVAC [28]. While there are very little data on immune responses induced in NHP and humans after exactly the same immunizations, the immune profiles induced following immunization with MTBVAC were shown to reflect those identified in human clinical trials [75–77]. This concordance between immune profiles measured in clinical trials and a macaque preclinical assessment of a novel TB vaccine candidate, demonstrating significantly improved outcomes after Mtb challenge, is a promising indication that the protection provided by MTBVAC vaccination to macaques will translate to the human population.

The ability to demonstrate vaccine efficacy is critical, and the role of the macaque models in vaccine development is underpinned by the ability to measure vaccine-associated impacts on the disease that develops following infectious challenge.

Our approach has been to test a new way to interpret data derived from these models based on the 'Bubble Model', that defines the progression from latent to active TB supported by the interpretation of disease progression defined in the studies on the C3HeB/FeJ mice [49,54,78,79]. As with humans, the C3HeB/FeJ mouse model establishes that the development of a large lesion after the Mtb infection requires a strong inflammatory response in the initial lesions, the induction of daughter micronodules around them and the coalescence of all lesions. To evaluate this concept in macaques, we used CT images obtained previously from studies using an experimental model of low-dose aerosol exposure, thus closely resembling what is thought to happen in the natural infectious process, where CT scans were collected at several time points to monitor the evolution of the infection in each animal [13,14,28]. In line with previous reports, three weeks after infection, more large lesions were identified in rhesus compared to cynomolgus, which has been related to the development of a stronger inflammatory response in the former [14,40]. These lead to an exudative lesion, a hallmark of progression towards active TB [51] and a key issue for its development, according to the bubble model.

Thus far, the assessment of new vaccines has been mainly based on the induction of an immune response and a reduction in disease burden measured using pathology scoring, which included a semiquantitative approach of the involvement of lungs and other organs, as well as imaging-based measures through PET-CT [11,45], CT evaluation [28,80], histology-based measures (e.g., granuloma staging and prevalence), together with bacterial burden in organs and changes in clinical parameters. There is quite a lot of experience in using imaging as a tool to evaluate BCG efficacy in animal models, with special interest in NPH. Some studies appeared during the last few years that mainly focused on BCG alternative routes. White et al. [28] analysed CT images in rhesus and used a quantitative score system for the estimation of TB-induced disease burden [63]; Sharpe et al. [81] and recently Sibley et al. [29] used MRI images in ex vivo lungs from macaques to determine pulmonary disease burden applying stereology [46], as well as counting discrete and coalescent lesions;

Darrah et al. [72] and DiFazio et al. [82] performed PET-CT images in macaques and mainly evaluated the grade of tuberculous activity by measuring global lung parenchyma FDG avidity, as well as counting lesions (which were called granulomas). Moreover, there are some experiences including other animal models, as Kraft et al. [83] analysed *ex vivo* lungs from guinea pigs using MRI, and described their imaging appearance, their anatomical distribution and nodule counting.

Previous analysis of these images highlighted the early reduction in micronodules after BCG vaccination [28]. Our work was able to advance deeper in the exploitation of these data by differentiating the nodules related with the consolidated lesions, daughter micronodules, from the isolated ones. According to the 'Bubble model', daughter micronodules emerge from an initial isolated micronodule, increase in size, consolidate creating larger nodules, which in turn develop more daughter micronodules, a process that enlarges the lesion to the point that it becomes visible by chest X-ray, the hallmark for classifying an *Mtb* infection as active TB [51]. Data from the C3HeB/FeJ model suggests this progression mainly develops at the beginning of the infection when there is still a lower impact of the adaptive immune response. This is characterized by the infiltration of neutrophils, which allows the extracellular growth of *Mtb*, fuelling enlargement and allowing the spread of close new infectious foci due to the drainage of infected foamy macrophages, which in turn attracts new neutrophils, causing the development of daughter lesions [54]. This led us to draw a parallel with the NHP model. On the one hand, rhesus develop highly inflammatory lesions with a high neutrophilic infiltration, a process that might be related with the progression associated to the development of daughter micronodules. Conversely, cynomolgus develop less inflammatory and more contained lesions [40], which would link to a reduced capacity to generate daughter micronodules. The lower inflammatory response, and thus the lower capacity to generate daughter cells, allows the fibroblasts to encapsulate the lesion, stopping its progression [9], and explains why the vicinity of the pleura, and its encapsulation capacity, has only a protective effect in cynomolgus.

Our data provide two new measures of pulmonary disease burden induced following infection with *Mtb*, namely, the ratio daughter/isolated micronodules and the percentage of consolidated lesions linked to daughter micronodules identified through CT in macaques. These measures provided a new tool to evaluate the protective effect of the licenced vaccine (BCG) and revealed differences in disease progression following either intradermal or mucosal (inhaled) administration, even when both routes were able to reduce the number of consolidated lesions and generated a similar reduction in the number of micronodules. While this mucosal aerosol vaccination was better able to reduce the number of isolated micronodules, potentially because of a better capacity to reach and stimulate the immune response in the whole lung, intradermal administration should have an improved ability to reduce the emergence of daughter micronodules, which are the ones responsible for the progression towards active TB.

In summary, we defined a new tool for the evaluation of pulmonary disease induced by *Mtb* infection, through the description of 'daughter micronodules', which provides a better understanding of the progression of TB and which can be applied for testing new vaccines. This is also amenable for development as a machine learning tool, as nodules are easily identifiable in CT images and can be quantified. Enhanced measures of TB disease burden and progression, such as those reported here, will refine the models used in the development of new vaccines and reduce the number of animals required, consequently providing important scientific and welfare benefits. Equally, the use of data across studies increased the power of the analysis applied and obtained more information without requiring the use of further macaques in line with the principles of the 3Rs.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pathogens12020236/s1>. Figure S1: Experimental groups and CT scan acquisition schedule; Figure S2: Lung size in macaques; Figure S3: Occupied volume fraction per lung lobe; Figure S4: Correlation between the occupied lung fraction and the number of isolated micronodules; Table S1: Summary lesions found; Figure S5: Cynomolgus vaccine effect analysis;

Figure S6: Rhesus vaccine effect analysis; Figure S7: Volume distribution of consolidations in contact and not in contact with pleura. Supplementary File S2 contains the complete raw data in an excel file.

Author Contributions: Conceptualization, I.N., M.C., P.-J.C. and C.V.; methodology, P.-J.C., C.P., J.B., I.N., M.C. and C.V.; software, J.B.; validation, S.A.S., A.D.W., J.B., C.V. and P.-J.C.; formal analysis, C.P.; investigation, I.N., M.C. and P.-J.C.; resources, S.A.S. and A.D.W.; data curation, C.P. and M.C.; writing—original draft preparation I.N. and M.C.; writing—review and editing, P.-J.C. and S.A.S.; visualization, J.B.; supervision, P.-J.C. and C.P.; project administration, C.V., P.-J.C. and J.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by 'La Caixa' Foundation (ID 100010434), under agreement LCF/PR/GN16/10290002 and AGAUR 2017 SGR 00500, 2021 SGR 00920 and 2021 SGR 00934.

Institutional Review Board Statement: The study design and all procedures were approved by the Public Health England, Porton Down Animal Welfare and Ethical Review Body, and authorised under an appropriate UK Home project license.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Raw data will be available as supplementary data.

Acknowledgments: We thank our colleagues in the Unitat de Tuberculosi Experimental for their support, as well as Ignasi Guasch and colleagues from the Thorax Radiology Department at the Hospital Universitari Germans Trias Pujol.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2021*; WHO: Geneva, Switzerland, 2021.
2. World Health Organization. *Impact of the COVID-19 Pandemic on TB Detection and Mortality in 2020*; WHO: Geneva, Switzerland, 2021.
3. Pai, M.; Kasaeva, T.; Swaminathan, S. COVID-19's devastating effect on tuberculosis care—A path to recovery. *N. Engl. J. Med.* **2022**, *386*, 1490–1493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. World Health Organization. *End TB Strategy*; WHO: Geneva, Switzerland, 2021.
5. Cardona, P.J. What we have learned and what we have missed in tuberculosis pathophysiology for a new vaccine design: Searching for the "Pink Swan". *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 556. [[CrossRef](#)]
6. Wallis, R.S.; Maeurer, M.; Mwaba, P.; Chakaya, J.; Rustomjee, R.; Migliori, G.B.; Marais, B.; Schito, M.; Churchyard, G.; Swaminathan, S.; et al. Tuberculosis—advances in development of new drugs, treatment regimens, host-directed therapies, and biomarkers. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, e34–e46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Urbanowski, M.E.; Ordonez, A.A.; Ruiz-Bedoya, C.A.; Jain, S.K.; Bishai, W.R. Cavitary tuberculosis: The gateway of disease transmission. *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20*, e117–e128. [[CrossRef](#)]
8. Ihms, E.A.; Urbanowski, M.E.; Bishai, W.R. Diverse cavity types and evidence that mechanical action on the necrotic granuloma drives tuberculous cavitation. *Am. J. Pathol.* **2018**, *188*, 1666–1675. [[CrossRef](#)]
9. Gil, O.; Diaz, I.; Vilaplana, C.; Tapia, G.; Diaz, J.; Fort, M.; Cáceres, N.; Pinto, S.; Caylà, J.; Corner, L.; et al. Granuloma encapsulation is a key factor for containing tuberculosis infection in minipigs. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e10030. [[CrossRef](#)]
10. Wong, E.A.; Joslyn, L.; Grant, N.L.; Klein, E.; Lin, P.L.; Kirschner, D.E.; Flynn, J.A.L. Low levels of T cell exhaustion in tuberculous lung granulomas. *Infect. Immun.* **2018**, *86*, e00426-18. [[CrossRef](#)]
11. Lin, P.L.; Coleman, T.; Carney, J.P.; Lopresti, B.J.; Tomko, J.; Fillmore, D.; Dartois, V.; Scanga, C.; Frye, L.J.; Janssen, C.; et al. Radiologic responses in cynomolgus macaques for assessing tuberculosis chemotherapy regimens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 4237–4244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ramakrishnan, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* **2012**, *12*, 352–366. [[CrossRef](#)]
13. White, A.D.; Sibley, L.; Gullick, J.; Sarfas, C.; Clark, S.; Fagrouch, Z.; Verschoor, E.; Salguero, F.J.; Dennis, M.; Sharpe, S. TB and SIV coinfection; a model for evaluating vaccine strategies against TB reactivation in asian origin cynomolgus macaques: A pilot study using BCG vaccination. *Vaccines* **2021**, *9*, 945. [[CrossRef](#)]
14. Sharpe, S.; White, A.; Gleeson, F.; McIntyre, A.; Smyth, D.; Clark, S.; Sarfas, C.; Laddy, D.; Rayner, E.; Hall, G.; et al. Ultra-low dose aerosol challenge with *Mycobacterium tuberculosis* leads to divergent outcomes in rhesus and cynomolgus macaques. *Tuberculosis* **2016**, *96*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Lin, P.L.; Rodgers, M.; Smith, L.; Bigbee, M.; Myers, A.; Bigbee, C.; Chiosea, I.; Capuano, S.V.; Fuhrman, C.; Klein, E.; et al. Quantitative comparison of active and latent tuberculosis in the cynomolgus macaque model. *Infect. Immun.* **2009**, *77*, 4631–4642. [[CrossRef](#)]
16. Lin, P.L.; Flynn, J.L. The end of the binary era: Revisiting the spectrum of tuberculosis. *J. Immunol.* **2018**, *201*, 2541–2548. [[CrossRef](#)]

17. Zwerling, A.; Behr, M.A.; Verma, A.; Brewer, T.F.; Menzies, D.; Pai, M. The BCG world atlas: A database of global BCG vaccination policies and practices. *PLoS Med.* **2011**, *8*, e1001012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Lancione, S.; Alvarez, J.V.; Alsdurf, H.; Pai, M.; Zwerling, A.A. Tracking changes in national BCG vaccination policies and practices using the BCG world atlas. *BMJ Glob Health* **2022**, *7*, e007462. [[CrossRef](#)]
19. Abubakar, I.; Pimpin, L.; Ariti, C.; Beynon, R.; Mangtani, P.; Sterne, J.; Fine, P.; Smith, P.; Lipman, M.; Elliman, D.; et al. Systematic review and meta-analysis of the current evidence on the duration of protection by bacillus Calmette-Guérin vaccination against tuberculosis. *Health Technol. Assess.* **2013**, *17*, 1–372. [[CrossRef](#)]
20. Rodrigues, L.C.; Diwan, V.K.; Wheeler, J.G. Protective effect of BCG against tuberculous meningitis and miliary tuberculosis: A meta-analysis. *Int. J. Epidemiol.* **1993**, *22*, 1154–1158. [[CrossRef](#)]
21. Dockrell, H.M.; Smith, S.G. What have we learnt about BCG vaccination in the last 20 years? *Front. Immunol.* **2017**, *13*, 1134. [[CrossRef](#)]
22. Trunz, B.B.; Fine, P.; Dye, C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: A meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet* **2006**, *367*, 1173–1180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Colditz, C.A.; Brewer, T.F.; Berkey, C.S.; Wilson, M.E.; Burdick, E.; Fineberg, H.V.; Mosteller, F. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis: Meta-analysis of the published literature. *JAMA* **1994**, *271*, 698–702. [[CrossRef](#)]
24. Sutherland, I.; Lindgren, I. The protective effect of BCG vaccination as indicated by autopsy studies. *Tubercle.* **1979**, *60*, 225–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kaufmann, S.H.E.; Weiner, J.; von Reyn, C.F. Novel approaches to tuberculosis vaccine development. *Int. J. Infect. Dis.* **2017**, *56*, 263–267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Whitlow, E.; Mustafa, A.S.; Hanif, S.N.M. An overview of the development of new vaccines for tuberculosis. *Vaccines* **2020**, *8*, 586. [[CrossRef](#)]
27. Cardona, P.J. The progress of therapeutic vaccination with regard to tuberculosis. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1536. [[CrossRef](#)]
28. White, A.D.; Sarfas, C.; Sibley, L.S.; Gullick, J.; Clark, S.; Rayner, E.; Gleeson, F.; Català, M.; Nogueira, I.; Cardona, P.J.; et al. Protective efficacy of inhaled BCG vaccination against ultra-low dose aerosol *M. tuberculosis* challenge in rhesus macaques. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Sibley, L.; White, A.D.; Gooch, K.E.; Stevens, L.M.; Tanner, R.; Jacobs, A.; Daykin-Pont, O.; Gleeson, F.; McIntyre, A.; Basaraba, R.; et al. High-dose *Mycobacterium tuberculosis* aerosol challenge cannot overcome BCG-induced protection in chinese origin cynomolgus macaques; implications of natural resistance for vaccine evaluation. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 12274. [[CrossRef](#)]
30. Sibley, L.; Dennis, M.; Sarfas, C.; White, A.; Clark, S.; Gleeson, F.; McIntyre, A.; Rayner, E.; Pearson, G.; Williams, A.; et al. Route of delivery to the airway influences the distribution of pulmonary disease but not the outcome of *Mycobacterium tuberculosis* infection in rhesus macaques. *Tuberculosis* **2016**, *96*, 141–149. [[CrossRef](#)]
31. White, A.D.; Sarfas, C.; West, K.; Sibley, L.S.; Wareham, A.S.; Clark, S.; Dennis, M.J.; Williams, A.; Marsh, P.D.; Sharpe, S.A. Evaluation of the immunogenicity of mycobacterium bovis BCG delivered by aerosol to the lungs of macaques. *Clin. Vaccine Immunol.* **2015**, *22*, 992–1003. [[CrossRef](#)]
32. Sharpe, S.A.; White, A.D.; Sibley, L.; Gleeson, F.; Hall, G.A.; Basaraba, R.J.; McIntyre, A.; Clark, S.O.; Gooch, K.; Marsh, P.D.; et al. An aerosol challenge model of tuberculosis in mauritian cynomolgus macaques. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0171906. [[CrossRef](#)]
33. Bannister, S.; Sudbury, E.; Villanueva, P.; Perrett, K.; Curtis, N. The safety of BCG revaccination: A systematic review. *Vaccine* **2021**, *39*, 2736–2745. [[CrossRef](#)]
34. Mahasha, P.W.; Ndwandwe, D.E.; Mavunza, E.J.; Shey, M.; Wiysonge, C.S. Systematic review protocol on bacillus Calmette-Guérin (BCG) revaccination and protection against tuberculosis. *BMJ Open* **2019**, *9*, e027033. [[CrossRef](#)]
35. Lowenstine, L.J.; Osborn, K.G. Respiratory system diseases of nonhuman primates. In *Nonhuman Primates in Biomedical Research*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2012; pp. 413–481.
36. Peña, J.C.; Ho, W.-Z. Non-human primate models of tuberculosis. *Microbiol. Spectr.* **2016**, *4*, 163–176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Foreman, T.W.; Mehra, S.; Lackner, A.A.; Kaushal, D. Translational research in the nonhuman primate model of tuberculosis. *ILAR J.* **2017**, *58*, 151–159. [[CrossRef](#)]
38. Scanga, C.A.; Flynn, J.L. Modeling tuberculosis in nonhuman primates. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2014**, *4*, a018564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Lin, P.L.; Pawar, S.; Myers, A.; Pegu, A.; Fuhrman, C.; Reinhart, T.A.; Capuano, S.V.; Klein, E.; Flynn, J.A.L. Early events in *Mycobacterium tuberculosis* infection in cynomolgus macaques. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 3790–3803. [[CrossRef](#)]
40. Langermans, J.A.; Andersen, P.; van Soolingen, D.; Vervenne, R.A.; Frost, P.A.; van der Laan, T.; van Pinxteren, L.A.; van den Hombergh, J.; Kroon, S.; Peekel, I.; et al. Divergent effect of bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination on *Mycobacterium tuberculosis* infection in highly related macaque species: Implications for primate models in tuberculosis vaccine research. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2001**, *98*, 11497–11502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Verreck, F.A.W.; Tchilian, E.Z.; Vervenne, R.A.W.; Sombroek, C.C.; Kondova, I.; Eissen, O.A.; Sommandas, V.; van der Werff, N.M.; Verschoor, E.; Braskamp, G.; et al. Variable BCG Efficacy in rhesus populations: Pulmonary BCG provides protection where standard intra-dermal vaccination fails. *Tuberculosis* **2017**, *104*, 46–57. [[CrossRef](#)]
42. Rayner, E.L.; Pearson, G.R.; Hall, G.A.; Basaraba, R.J.; Gleeson, F.; McIntyre, A.; Clark, S.; Williams, A.; Dennis, M.J.; Sharpe, S.A. Early lesions following aerosol infection of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) with *Mycobacterium tuberculosis* strain H37RV. *J. Comp. Pathol.* **2013**, *149*, 475–485. [[CrossRef](#)]

43. Dijkman, K.; Vervenne, R.A.W.; Sombroek, C.C.; Boot, C.; Hofman, S.O.; van Meijgaarden, K.E.; Ottenhoff, T.H.M.; Kocken, C.H.M.; Haanstra, K.G.; Vierboom, M.P.M.; et al. Disparate tuberculosis disease development in macaque species is associated with innate immunity. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2479. [[CrossRef](#)]
44. Capuano, S.V.; Croix, D.A.; Pawar, S.; Zinovik, A.; Myers, A.; Lin, P.L.; Bissel, S.; Fuhrman, C.; Klein, E.; Flynn, J.A.L. Experimental *Mycobacterium tuberculosis* infection of cynomolgus macaques closely resembles the various manifestations of human *M. tuberculosis* infection. *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 5831–5844. [[CrossRef](#)]
45. Maiello, P.; DiFazio, R.M.; Cadena, A.M.; Rodgers, M.A.; Lin, P.L.; Scanga, C.A.; Flynn, J.A.L. Rhesus macaques are more susceptible to progressive tuberculosis than cynomolgus macaques: A quantitative comparison. *Infect. Immun.* **2018**, *86*, e00505-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Sharpe, S.A.; Eschelbach, E.; Basaraba, R.J.; Gleeson, F.; Hall, G.A.; McIntyre, A.; Williams, A.; Kraft, S.L.; Clark, S.; Gooch, K.; et al. Determination of lesion volume by mri and stereology in a macaque model of tuberculosis. *Tuberculosis* **2009**, *89*, 405–416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Sharpe, S.A.; McShane, H.; Dennis, M.J.; Basaraba, R.J.; Gleeson, F.; Hall, G.; McIntyre, A.; Gooch, K.; Clark, S.; Beveridge, N.E.R.; et al. Establishment of an aerosol challenge model of tuberculosis in rhesus macaques and an evaluation of endpoints for vaccine testing. *Clin. Vaccine Immunol.* **2010**, *17*, 1170–1182. [[CrossRef](#)]
48. White, A.G.; Maiello, P.; Coleman, M.T.; Tomko, J.A.; Frye, L.J.; Scanga, C.A.; Lin, P.L.; Flynn, J.A.L. Analysis of 18FDG PET/CT imaging as a tool for studying *Mycobacterium tuberculosis* infection and treatment in non-human primates. *J. Vis. Exp.* **2017**, *127*, e56375.
49. Prats, C.; Vilaplana, C.; Valls, J.; Marzo, E.; Cardona, P.J.; López, D. Local inflammation, dissemination and coalescence of lesions are key for the progression toward active tuberculosis: The Bubble Model. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 33. [[CrossRef](#)]
50. Català, M.; Bechini, J.; Tenesa, M.; Pérez, R.; Moya, M.; Vilaplana, C.; Valls, J.; Alonso, S.; López, D.; Cardona, P.J.; et al. Modelling the dynamics of tuberculosis lesions in a virtual lung: Role of the bronchial tree in endogenous reinfection. *PLoS Comput. Biol.* **2020**, *16*, e1007772. [[CrossRef](#)]
51. Cardona, P.J. The key role of exudative lesions and their encapsulation: Lessons learned from the pathology of human pulmonary tuberculosis. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Cardona, P.J. A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection. *Infection* **2009**, *37*, 80–86. [[CrossRef](#)]
53. Cardona, P.J. Revisiting the natural history of tuberculosis: The inclusion of constant reinfection, host tolerance, and damage-response frameworks leads to a better understanding of latent infection and its evolution towards active disease. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **2010**, *58*, 7–14. [[CrossRef](#)]
54. Marzo, E.; Vilaplana, C.; Tapia, G.; Diaz, J.; Garcia, V.; Cardona, P.J. Damaging role of neutrophilic infiltration in a mouse model of progressive tuberculosis. *Tuberculosis* **2014**, *94*, 55–64. [[CrossRef](#)]
55. Lin, P.L.; Maiello, P.; Gideon, H.P.; Coleman, M.T.; Cadena, A.M.; Rodgers, M.A.; Gregg, R.; O'Malley, M.; Tomko, J.; Fillmore, D.; et al. PET-CT identifies reactivation risk in cynomolgus macaques with latent *M. tuberculosis*. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005739. [[CrossRef](#)]
56. Hansell, D.M.; Armstrong, P.; Lynch, D.A.; McAdams, H.P. *Imaging of Diseases of the Chest*, 4th ed.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2005; ISBN 0-323-03660-0-2005.
57. Webb, W.R.; Müller, N.L.; Naidich, D.P. *High-Resolution CT of the Lung*, 3rd ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2003; ISBN 0-0817-2278-0-2001.
58. Leung, A.N. State-of-the-art: Pulmonary Tuberculosis. *Radiology* **1996**, *199*, 307–322.
59. Andreu, J.; Cáceres, J.; Pallisa, E.; Martínez-Rodríguez, M. Radiological manifestations of pulmonary tuberculosis. *Eur. J. Radiol.* **2004**, *51*, 139–149. [[CrossRef](#)]
60. Nachiappan, A.C.; Rahbar, K.; Shi, X.; Guy, E.S.; Mortani Barbosa, E.J.; Shroff, G.S.; Ocazonez, D.; Schlesinger, A.E.; Katz, S.I.; Hammer, M.M. Pulmonary tuberculosis: Role of radiology in diagnosis and management. *Radiographics* **2017**, *37*, 52–72. [[CrossRef](#)]
61. Rozenshtein, A.; Hao, F.; Starc, M.T.; Pearson, G.D.N. Radiographic appearance of pulmonary tuberculosis: Dogma disproved. *Am. J. Roentgenol.* **2015**, *204*, 974–978. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Zeng, J.; Liu, Z.; Shen, G.; Zhang, Y.; Li, L.; Wu, Z.; Luo, D.; Gu, Q.; Mao, H.; Wang, L. MRI evaluation of pulmonary lesions and lung tissue changes induced by tuberculosis. *Int. J. Infect. Dis.* **2019**, *82*, 138–146. [[CrossRef](#)]
63. Sharpe, S.A.; Smyth, D.; McIntyre, A.; Gleeson, F.; Dennis, M.J. Refinement and reduction through application of a quantitative score system for estimation of TB-induced disease burden using computed tomography. *Lab. Anim.* **2018**, *52*, 599–610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Hislop, A.; Howard, S.; Fairweather, D.V.I. Morphometric studies on the structural development of the lung in *Macaca fascicularis* during fetal and postnatal life. *J. Anat.* **1984**, *138*, 95–112.
65. Chase, R.E. Lung Lobation in rhesus monkey, compared with man. *Amer Jour Phys Anthropol.* **1942**, *29*, 267–286. [[CrossRef](#)]
66. Tyler, N.K.; Hyde, D.M.; Hendrickx, A.G.; Plopper, C.G. Morphogenesis of the Respiratory Bronchiole in Rhesus Monkey Lungs. *Am J Anat.* **1988**, *182*, 215–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Asgharian, B.; Price, O.; McClellan, G.; Corley, R.; Einstein, D.R.; Jacob, R.E.; Harkema, J.; Carey, S.A.; Schelegle, E.; Hyde, D.; et al. Development of a rhesus monkey lung geometry model and application to particle deposition in comparison to humans. *Inhal Toxicol.* **2012**, *24*, 869–899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

68. Mercer, R.R.; Crapo, J.D. Lower respiratory tract structure of laboratory animals and humans: Dosimetry implications. *Aerosol Sci. Technol.* **1993**, *18*, 257–271.
69. Hansell, D.M.; Bankier, A.A.; MacMahon, H.; McLoud, T.C.; Müller, N.L.; Remy, J. Fleischner Society: Glossary of terms for thoracic imaging. *Radiology* **2008**, *246*, 697–722. [[CrossRef](#)]
70. Rossi, S.E.; Franquet, T.; Volpacchio, M.; Giménez, A.; Aguilar, G. Tree-in-bud pattern at thin-section CT of the lungs: Radiologic-pathologic overview. *Radiographics* **2005**, *25*, 789–801. [[CrossRef](#)]
71. Hunter, R.L. Tuberculosis as a three-act play: A new paradigm for the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* **2016**, *97*, 8–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Darrah, P.A.; Zeppa, J.J.; Maiello, P.; Hackney, J.A.; Wadsworth, M.H.; Hughes, T.K.; Pokkali, S.; Swanson, P.A.; Grant, N.L.; Rodgers, M.A.; et al. Prevention of tuberculosis in macaques after intravenous BCG immunization. *Nature* **2020**, *577*, 95–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Laddy, D.J.; Bonavia, A.; Hanekom, W.A.; Kaushal, D.; Williams, A.; Roederer, M.; Seder, R.A.; Sharpe, S.A.; Verreck, F.A.W.; Darrah, P.A. Toward tuberculosis vaccine development: Recommendations for nonhuman primate study design. *Infect. Immun.* **2018**, *86*, e00776-17. [[CrossRef](#)]
74. Plumlee, C.R.; Duffy, F.J.; Gem, B.H.; Delahaye, J.L.; Cohen, S.B.; Stoltzfus, C.R.; Rustad, T.R.; Hansen, S.G.; Axthelm, M.K.; Picker, L.J.; et al. Ultra-low dose aerosol infection of mice with *Mycobacterium tuberculosis* more closely models human tuberculosis. *Cell Host Microbe* **2021**, *29*, 68–82. [[CrossRef](#)]
75. Spertini, F.; Audran, R.; Chakour, R.; Karoui, O.; Steiner-Monard, V.; Thierry, A.-C.; Mayor, C.E.; Rettby, N.; Jatou, K.; Vallotton, L.; et al. Safety of human immunisation with a live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine: A randomised, double-blind, controlled phase I trial. *Lancet. Respir. Med.* **2015**, *3*, 953–962. [[CrossRef](#)]
76. Tameris, M.; Mearns, H.; Penn-Nicholson, A.; Gregg, Y.; Bilek, N.; Mabwe, S.; Geldenhuys, H.; Shenje, J.; Luabeya, A.K.K.; Murillo, I.; et al. Live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine MTBVAC versus BCG in adults and neonates: A randomised controlled, double-blind dose-escalation trial. *Lancet. Respir. Med.* **2019**, *7*, 757–770. [[CrossRef](#)]
77. Aguilo, N.; Gonzalo-Asensio, J.; Alvarez-Arguedas, S.; Marinova, D.; Gomez, A.B.; Uranga, S.; Spallek, R.; Singh, M.; Audran, R.; Spertini, F.; et al. Reactogenicity to major tuberculosis antigens absent in BCG is linked to improved protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 16085. [[CrossRef](#)]
78. Vilaplana, C.; Marzo, E.; Tapia, G.; Diaz, J.; Garcia, V.; Cardona, P.J. Ibuprofen therapy resulted in significantly decreased tissue bacillary loads and increased survival in a new murine experimental model of active tuberculosis. *J. Infect. Dis.* **2013**, *208*, 199–202. [[CrossRef](#)]
79. Cardona, P.J. Reactivation or reinfection in adult tuberculosis: Is that the question? *Int. J. Mycobacteriol.* **2016**, *5*, 400–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Hansen, S.G.; Zak, D.E.; Xu, G.; Ford, J.C.; Marshall, E.E.; Malouli, D.; Gilbride, R.M.; Hughes, C.M.; Ventura, A.B.; Ainslie, E.; et al. Prevention of tuberculosis in rhesus macaques by a cytomegalovirus-based vaccine. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 130–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Sharpe, S.; White, A.; Sarfas, C.; Sibley, L.; Gleeson, F.; McIntyre, A.; Basaraba, R.; Clark, S.; Hall, G.; Rayner, E.; et al. Alternative BCG delivery strategies improve protection against *Mycobacterium tuberculosis* in non-human primates: Protection associated with mycobacterial antigen-specific CD4 effector memory T-Cell populations. *Tuberculosis* **2016**, *101*, 174–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. DiFazio, R.M.; Maiello, P.; Tomko, J.; Frye, L.; Bigbee, C.; Chedrick, C.; Updike, C.; Lin, P.; Agger, E.M.; Andersen, P.; et al. Predicting vaccine efficacy against tuberculosis using immunologic and radiologic measures in the non-human primate model (VAC7P974). *J. Immunol.* **2014**, *192*, 141–149. [[CrossRef](#)]
83. Kraft, S.L.; Dailey, D.; Kovach, M.; Stasiak, K.L.; Bennett, J.; McFarland, C.T.; McMurray, D.N.; Izzo, A.A.; Orme, I.M.; Basaraba, R.J. Magnetic resonance imaging of pulmonary lesions in guinea pigs infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **2004**, *72*, 5963–5971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

