

Factores de virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*

NANCY P. MAULÉN^{1,2,a}

Virulence factors of *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis, the etiological agent of human tuberculosis, causes annually three million deaths and latently infects about two billion people. Immunodeficiency caused by malnutrition, senescence or co-infection with HIV enhances the risk of developing active tuberculosis, either from a primary infection or by reactivation of a latent infection. The increasing appearance of multidrug-resistant strains to existing drugs is worrisome, since it leaves patients practically without treatment options. The understanding of the mechanisms of transmission, pathogenesis and virulence of *M. tuberculosis* is important. The analysis of its genome shows the presence of alternative sigma factors, transcriptional repressors and activators, two component signaling systems, metabolic enzymes and cellular secretory systems, that are associated with virulence in a series of pathogenic micro-organisms. Environmental stimuli such as pH, temperature, osmolality, oxygen availability are processed, activating or repressing virulence genes. The molecular mechanisms of action of these genes have been elucidated in *in vitro* and *in vivo* models.

(Rev Med Chile 2011; 139: 1605-1610).

Key words: Etiology; *Mycobacterium tuberculosis*; Virulence; Pathophysiology.

¹Bachillerato en Ciencias, Universidad San Sebastián, Puerto Montt. Chile. Bioquímica; Doctora en Ciencias.

²Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Andrés Bello, Viña del Mar, Chile.

^aBioquímica. Doctora en Ciencias.

Trabajo financiado por Proyecto FONDECYT 1040978.

Recibido el 27 de mayo de 2010, aceptado el 18 de junio de 2011.

Correspondencia a:
Dra. Nancy Maulén.
Directora Bachillerato en Ciencias. Universidad San Sebastián. Lago Panguipulli 1390. Pichi Pelluco Alto. Puerto Montt. Chile.
Tel: (56)-65-325512;
(56) 9-98447445.
E-mail: n.maulen@gmail.com

Situación mundial de la tuberculosis

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*), agente etiológico de la tuberculosis (TB) humana, causa anualmente alrededor de tres millones de muertes e infecta de manera latente entre uno y dos billones de personas. El resurgimiento mundial de la TB se atribuye al aumento de la migración internacional, fallas en los sistemas de salud público, ineficacia de la vacuna BCG, la pobreza de ciertos países de África, Asia y América Latina, la baja sensibilidad de los métodos de diagnóstico, pero por sobre todo a la pandemia VIH/SIDA^{1,2}. Se estima que 4% de los casos corresponden a *Mtb* resistentes a más de una droga antituberculosa (MDR-TB), condición difícil de tratar, costosa y no siempre curable. En el caso de cepas ultra resistentes (MDXR-TB) prácticamente no hay opción de tratamiento. Más aun, las drogas disponibles son ineficaces para el tratamiento de individuos infectados de manera latente³⁻⁶.

La Organización Mundial de la Salud reporta

que la carga mundial de TB está disminuyendo. Se espera que tres regiones alcancen en el 2015 las metas mundiales. No obstante, se estima que 37% de los casos incidentes de TB no está siendo tratado en programa DOTS (*Directly observed therapy short-course*), que 96% de los casos MDR-TB no está siendo diagnosticados y tratados, que la mayoría de los casos TB-VIH-positivos desconocen que lo son, y que la mayoría de los casos TB-VIH-positivos, que lo saben, no tiene acceso a farmacoterapia².

En Chile, la endemia ha evolucionado favorablemente con una tendencia declinante de la morbilidad, lo que permite pensar en un importante progreso hacia la eliminación de la TB. Sin embargo, la extrema variabilidad entre regiones es una de las características epidemiológicas relevantes de la situación actual y de los problemas que se deberán superar para avanzar hacia la fase de "eliminación avanzada"⁷.

Las actuales medidas mundiales de control de la TB no han sido suficientes para interrumpir la

transmisión y erradicar la TB, posiblemente porque los indicadores de medida ignoran la duración del estado infeccioso, la frecuencia de reactivación y el riesgo de progresión entre los contactos infectados, permitiendo así la perpetuación de la enfermedad entre la población mundial.

Cabe entonces avocarse a la revisión de los mecanismos moleculares de virulencia de *Mtb*, lo que se espera permita el desarrollo de nuevas estrategias inmuno profilácticas y terapéuticas para la tuberculosis.

Ciclo infeccioso y persistencia de *Mycobacterium tuberculosis*

Un individuo con TB pulmonar expone aerosoles cargados con *Mtb*, los que al ser inhalados son fagocitados por los macrófagos alveolares. Mientras, los macrófagos de individuos inmuno competentes controlan eficazmente la proliferación del bacilo, éste crece rápidamente dentro de los macrófagos de hospederos inmuno comprometidos, progresando hacia una tuberculosis primaria activa. En algunos casos ocurre diseminación hematogena del patógeno, permitiendo su establecimiento con diversa fortuna por todo el organismo, de preferencia en un sistema retículoendotelial abundante y con alta tensión de oxígeno, y eventualmente con la ocurrencia de TB extrapulmonar^{10,11}.

En 95% de los casos, los hospederos inmuno competentes controlan la infección primaria, ya que forman un granuloma caseoso, el cual encierra al bacilo y controla su proliferación^{10,11}; sin embargo, el patógeno nunca es erradicado del organismo (infección persistente)⁹, razón por la cual *Mtb* se considera como el patógeno bacteriano más hábil en el establecimiento y mantención de un estado de latencia con una opción de reactivación en el futuro⁸. Se estima que individuos con infección latente y sin factores de riesgo asociados tienen 2 a 23% de riesgo de desarrollar en toda su vida una reactivación a largo plazo de la TB. Por el contrario, individuos co-infectados con HIV o inmuno deprimidos, por otra causa, tienen un riesgo de 5 a 10% anual de reactivación¹².

Los factores que influyen la habilidad inicial de *Mtb* de replicar o alternativamente establecer una infección persistente, con una oportunidad de reactivación en el futuro, son aún desconocidos;

Dicho conocimiento es clave para comprender la patogénesis de *Mtb* a nivel molecular.

Genoma de *Mycobacterium tuberculosis*

El genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, codifica alrededor de 4.000 genes, posee características únicas, tales como el alto número de genes que codifican enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos grasos o para la familia de proteínas PE y PPE, que se localizan en la pared y membrana celular, quizá asociadas a la variación antigénica de *Mtb* durante la infección. Asimismo, se deduce la codificación de trece factores sigma alternativos putativos y más de cien proteínas reguladoras de los tipos represor/activador transcripcional, sistemas de señalización de dos componentes, sistemas serina-treonina quinasas (STPKs) y otros genes reguladores. Existe el potencial para codificar once sistemas completos de transducción de señales de dos componentes, recurrentemente asociados a patogénesis y virulencia en microorganismos patógenos. Éstos procesan estímulos medioambientales, tales como pH, temperatura, osmolaridad, disponibilidad de oxígeno, fase de crecimiento, estrés oxidativo del macrófago o desnutrición, provocando la activación o represión coordinada de los genes bacterianos de virulencia^{13,14,17,20}. A la fecha, se han caracterizado parcialmente los sistemas de dos componentes: MprA-MprB (o MtrA-MtrB), SenX3-RegX3, TrcS-TrcR, DevR-DevS y PrrA-PrrB. Se sabe que la mutación de PrrAB impide el crecimiento de *Mtb* dentro de macrófagos murinos en cultivo. Por el contrario, TrcS-TrcR y SenX3-RegX3 no son regulados dentro del macrófago, es decir, durante la fase inicial de infección. MprAB regula su propia expresión, resulta esencial para el crecimiento de *Mtb* dentro de un granuloma artificial (modelo de infección latente) y se induce dentro de monocitos-macrófagos humanos en cultivo y durante la privación de nutrientes^{16,18,19}. Llama la atención la presencia de STPKs putativos, considerados patognómicos de células eucariontes, pero recientemente también descritos en bacterias, tales como, *Mycococcus xanthus*, *Streptomyces granaticolor*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se postula, que uno de ellos, *pknB* homólogo, está involucrado en la progresión hacia el estado latente o "dormido" de *Mtb*, lo cual correspondería a un

nuevo estado de crecimiento, análogo a la fase de esporulación, único momento en su ciclo de vida en que se expresa el gen *pknB*²¹.

Factores de virulencia

La habilidad de un patógeno bacteriano para sobrevivir dentro de un organismo hospedero requiere de la expresión de una serie de determinantes genéticos involucrados en la interacción patógeno-hospedero, situación que le permite resistir el estrés fisiológico y ambiental. La expresión diferencial de los genes de virulencia, en el caso de *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi*, *Helicobacter pylori* y *Vibrio cholerae*, permite, entre otros, inhibir la apoptosis del macrófago, modular el nivel de producción de IL-12, disminuir las especies reactivas del nitrógeno (RNI) o modular la secreción de proteínas de invasión a través de los sistemas de secreción tipo III codificados dentro de islas de patogenicidad, y en donde dichos "factores" resultan esenciales para su patogénesis, pero no para su crecimiento en medios de cultivo *in vitro*^{14,15,23,24}.

Desafortunadamente, no hay una respuesta concreta acerca de los factores de virulencia relevantes para la progresión de la tuberculosis en el ser humano. Sin embargo, ésta puede ser cuantificada a través de la estimación de morbilidad y mortalidad de aislados clínicos o cepas mutantes en modelos animales (conejo, ratón, primates, bovino, entre otros). De esta manera, cepas de *M. tuberculosis* mutantes respecto de su virulencia han sido clasificadas como fenotipos SGIV ("severe growth in vivo"), GIV ("growth in vivo") y PER ("persistence genes")^{11,17}. Asimismo, se ha descrito diferencias entre el perfil de expresión génica de *Mtb* dentro de los pulmones y bazo de ratón, así como diferencias entre la expresión de ciertos genes de éstos con respecto al pulmón de pacientes con tuberculosis crónica activa^{25,26}. Cabe mencionar, que la respuesta inflamatoria del hospedero es clave para contener el crecimiento de *Mtb*, donde TNF- α es necesario para el control de la infección y la formación del granuloma. Por otro lado, la respuesta inflamatoria puede ocasionar daño tisular como la licuefacción del granuloma³².

De igual manera, la virulencia se puede determinar *ex vivo* (estudio primera etapa de la infección), utilizando macrófagos de ratón o humanos, células dendríticas o neumocitos. En

algunos casos, macrófagos aislados de distintos órganos de un mismo animal han respondido diferencialmente a la infección como se demostró en un estudio comparativo de la interacción entre *M. tuberculosis* H37Rv y los macrófagos aislados de ratones sensibles (I/St) y resistentes (A/Sn) a la tuberculosis¹⁷. Por otro lado, en un modelo de persistencia *in vitro*, mediante análisis "microarrays de ADN" y estudios del proteoma, se evaluó la respuesta a la desnutrición, demostrándose la disminución de la transcripción, del metabolismo energético, de la síntesis de lípidos y la división celular junto a la inducción de una serie de otros genes "desconocidos" que podrían tener un papel en la persistencia de *Mtb*²⁷.

La combinación de las citadas estrategias experimentales ha permitido identificar una serie de genes relevantes para la patogenicidad de *Mtb*, los que se han agrupado en base a su función en distintos tipos de factores de virulencia: Envoltura y secreción celular; componentes de superficie celular; enzimas del metabolismo celular; incorporación de metales y reguladores transcripcionales.

El primer grupo se refiere a las proteínas que se espera sean expuestas al medio ambiente en que crece *Mtb*, ya sea *in vitro* o dentro del micofagosoma, tales como las CFPs (*Culture Filtrate Proteins*), que se encuentran en el medio de cultivo del bacilo o asociadas a células. Se conoce alrededor de doscientas (KatG, SodA, *HspX*, ESAT6/CF-10, 19-kDa, Glutamina sintasa, entre otras), algunas de éstas son reconocidas por el suero de pacientes con tuberculosis activa (*HspX*, ESAT-6, CFP-10, 19-kDa, otras). ESAT-6 y CFP-10 son secretados por el sistema de secreción ESX-1 (tipo VII) de *Mtb*, el cual se encuentra codificado en la región RD-1 del cromosoma de *Mtb*. ESX-1 resulta crítico para la virulencia de *Mtb*, al igual que la región RD-1 de *M. bovis* BCG atenuadas. ESX-1 media la exportación de factores de virulencia que desarmar al macrófago permitiéndole modular la respuesta inmune innata del hospedero en las primeras etapas de la infección. El rol biológico de ESAT-6 y CFP-10 sigue siendo debatido, pero se sabe que ambos son los antígenos inmuno dominantes en los pacientes con tuberculosis y ambos protegen contra la tuberculosis en modelos animales. Por ello, son componentes importantes de las vacunas actualmente a prueba^{17,28,29}.

Acerca del grupo de factores de virulencia de superficie celular se sabe, que son exclusivos de

la pared celular de los *Mycobacterium* patógenos, y que es una estructura compleja y única, que contiene proteínas, lípidos y carbohidratos (Erp, Mas, FadD26, FadD28, MmpL7, FbpA, MmaA4, PcaA, OmpA, HbhA, LAM, entre otros), por tanto, eventualmente excelentes blancos para contrarrestar la virulencia de *Mtb*. Las proteínas FbpA, B y C (micolil-transferasas) se definen como los antígenos inmuno dominantes 85A, B y C. Las cepas *fbpA*⁻ resultan atenuadas en el hombre y macrófagos murinos¹⁷.

Los factores de virulencia del grupo de las enzimas involucradas en el metabolismo celular general, se relacionan con el hecho de que *Mtb* utiliza preferentemente carbohidratos cuando crece *in vitro* y ácidos grasos cuando infecta a su hospedero. Actualmente, se describen más de 200 genes (*icl*, *lipF*, *fadD33*, Fosfolipasas C, *panC/panD*, entre otros) involucrados en el metabolismo de los lípidos y ácidos grasos. Por ejemplo, Icl (isocitratoliasa) convierte isocitrato en succinato, permitiendo que *Mtb* crezca en ácidos grasos o acetato vía ciclo de Krebs. La actividad de Icl se incrementa en fase estacionaria (*in vitro*) y el mRNA aumenta dentro del macrófago humano¹⁷.

Con respecto a los factores de virulencia involucrados en la biosíntesis de aminoácidos y purinas (*leuD*, *trpD*, *proC*, *purC*, entre otros), se ha realizado varios intentos para aislar *Mtb* auxótrofos y crear una vacuna atenuada viva semejando la estrategia utilizada para la obtención una vacuna contra *S. enterica* serovar *Typhimurium*. En este caso, *Mtb trp*⁻ (antranilato fosforribosil transferasa) resulta muy atenuada en macrófago murino y no mata a los ratones SCID y cepas *purC*⁻ (1-fosforribosilamino-imidazol-succinocarboxamida sintasa) resultan severamente atenuadas en ratón (fenotipo SGIV)^{17,29}.

En cuanto a los estudios realizados con el grupo de factores de virulencia asociados a la respiración anaeróbica y el estrés oxidativo, estos sugieren que la anaerobiosis y la microaerofilia son importantes para la fisiología de *Mtb* durante la infección, especialmente en las fases tardías de la infección (granuloma pulmón). Además, *Mtb* codifica enzimas (SodA, SodC, KatG, AhpC) que combaten los ROIs generados durante la respiración aeróbica y aparentemente también los generados dentro del macrófago^{17,33}.

Los factores de virulencia asociados a la captura de metales (Fe^o y Mg⁺²), los cuales son esenciales

para la vida, pueden exacerbar la progresión de la tuberculosis en los humanos y modelos animales como lo es en el caso del Fe^o. A menudo, defectos en sus sistemas de incorporación (MgtC, MbtB, IdeR) se traducen en la atenuación de los patógenos. Por ejemplo, IdeR es esencial para *Mtb*¹⁷.

En relación a los factores de virulencia del tipo regulador transcripcional, encargados de controlar la transcripción de numerosos genes [RpoS; Reguladores de respuesta (PhoP); Sigma alternativos (SigA, SigB, SigE, SigF, SigH)], se espera que sean importantes para la virulencia de *Mtb*, similar a lo descrito para otros patógenos humanos. Tal es el caso del factor sigma SigA, el cual es esencial y el principal factor para la transcripción de la mayoría de los genes "housekeeping". Su mutación afecta la virulencia de *Mtb* en forma indirecta, ya que no existe interacción con los genes de virulencia. PhoP, corresponde a un sistema de dos componentes que responde a señales ambientales a través de un sensor (histidina quinasa), que activa un efector (regulador de respuesta). PhoP de *Mtb*, semejante a PhoP de *S. enterica* serovar *Typhimurium*, sensa la desnutrición de Mg⁺² y controla la expresión de genes de virulencia aun no completamente identificados¹⁴. Mutantes *Mtb* MT103 *phoP*⁻ y H37Rv *phoP*⁻ son severamente atenuadas para su crecimiento en macrófagos humanos y ratones, y altamente atenuada en órganos de ratón (fenotipo SGIV). Asimismo, el sistema de dos componentes PhoPR resulta esencial para la secreción de proteínas de virulencia en modelos animales¹². De hecho, se determinó que la mutación del gen *phoP* ha ocurrido en forma natural en algunos subtipos atenuados de la vacuna *M. bovis* BCG que circulan hoy en día en el mundo. Por ello, y debido al rol fundamental de PhoPR para la patogénesis de *Mtb*, se le considera un excelente candidato para la construcción de una vacuna *Mtb* mutante y/o recombinante^{17,29,34}. Se ha estudiado otros mutantes en los sistemas de dos componentes (RegX3, TrcS, MprAB, PrrA) pero sólo PhoP ha afectado la virulencia de *Mtb* en macrófagos humanos^{22,28}.

Vacuna BCG

El bacilo Calmette-Guérin (BCG) es una cepa viva atenuada de *Mycobacterium bovis*, que corresponde a la única vacuna disponible en el mundo contra la tuberculosis (TB). BCG protege a los niños con más de 80% de eficacia contra formas

severas de la TB. Sin embargo, la protección contra la TB pulmonar en adolescentes y adultos oscila entre 0 y 80 %. Los respondedores altos no presentan signos clínicos de la enfermedad y comprenden al 95% de la población que arresta la infección sin necesidad de vacuna. El 5% restante son los respondedores bajos, que desarrollan tuberculosis activa e incluso mueren de ella. Una nueva vacuna podría bajar a 1% este grupo. El motivo de esta heterogeneidad no se conoce bien pero se atribuye a las diferencias entre las cepas utilizadas tradicionalmente como vacuna, así como a las diferencias nutricionales y genéticas de los individuos, siendo ninguna mutuamente excluyente^{11,29,34}.

BCG comprende a varias subespecies que exhiben diferencias en su fenotipo, propiedades bioquímicas y virulencia residual. Se conoce, que la BCG que circula actualmente ha experimentado dos fases de atenuación; La fase inicial (~1921), que corresponde al pasaje 230 realizado por Calmette y Guérin, para producir la vacuna original, y la segunda, (~1924) al momento de comenzar su distribución a nivel mundial. Recientemente, mediante análisis molecular, se corroboró la delección de la región cromosomal RD-1 en todas las cepas de BCG analizadas y se identificó polimorfismos genéticos de un nucleótido (SNPs) entre *Mtb* H37Rv y múltiples cepas de BCG. De esta manera, se explica que la pérdida de virulencia se debe a la pérdida de RD-1 así como a la acumulación de lesiones genéticas adicionales del tipo SNPs. Asimismo, estudios comparativos del genoma de distintas cepas de BCG permitieron la construcción de un árbol filogenético molecular que resultó consistente con las datos históricos y geográficos registrados para BCG y donde se observa que las cepas de BCG son dos grupos mayoritarios que difieren significativamente en sus niveles de virulencia³⁴.

En base a estos antecedentes, en el año 2007, la OMS recomendó no vacunar a niños VIH positivos, debido a que el riesgo de diseminación de BCG es más importante que la potencial protección contra formas severas de la TB. Dicha medida ha sido difícil de implementar, ya que implica contar con la confirmación diagnóstica al momento del nacimiento. En estas condiciones, en los países con alta carga de VIH/SIDA, la mejor opción, parece ser, la vacunación previa selección específica de la cepa de BCG menos virulenta en esa región geográfica^{29,34}.

Conclusiones

La TB continua ofreciendo desafíos intelectuales complejos, que atraen a científicos de diversas disciplinas en un intento por comprender su biología y patogénesis. Ello requiere conocer en detalle los determinantes bacterianos involucrados en la virulencia de *Mtb*, así como también de la caracterización de la respuesta inmune que instaura el ser humano en las distintas etapas de la infección. Dentro de los desafíos pendientes se encuentra la identificación de "blancos" alternativos para el tratamiento de la TB activa y latente, el desarrollo de una vacuna, posiblemente recombinante, que sea verdaderamente eficaz y que reemplace o mejore a las cepas de BCG que se producen hoy en día.

Referencias

1. Perkins MD, Kritski AL. Diagnostic testing in the control of tuberculosis. Bulletin WHO 2002; 80 (6): 512-3.
2. http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/key_points/es/index.html. OMS, 2009.
3. Dye C, Espinal MA, Watt CJ, Mbiaga C, Williams BG. Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis. J Inf Dis 2002; 185 (8): 1197-202.
4. Pablos-Méndez A, Gowda DK, Frieden TR. Controlling multidrug-resistant tuberculosis and access to expensive drugs. Bulletin WHO 2002; 80 (6): 489-95.
5. <http://www.cdc.gov/tb>. CDC, 2010.
6. Mathema B, Kurepina NE, Bifani P, Kreiswirth BN. Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current Insights. Clin Microbiol Rev 2006; 19: 658-85.
7. Ministerio de Salud de Chile. Manual de procedimientos Programa de Tuberculosis, 2005. <http://www.redsalud.gov.cl/archivos/TUBERCULOSIS.pdf>
8. GlickmanMS, Jacobs Jr WR. Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: Dawn a discipline. Cell 2001; 104: 477-85.
9. Kaufmann SHE. Immune response to tuberculosis: Learning from natural infection for rational vaccine design. WHO; 4th World Congress on TB 2002. Washington, DC; USA; June 3-5: 10.
10. Knechel NA. Tuberculosis: Pathophysiology, clinical features, and diagnosis. Crit Care Nurse 2009; 29: 34-43.
11. Van Cravel R, Ottenhoff THM, van der Meer JWM. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Rev 2002; 15 (2): 294-309.
12. Parrisch NM, Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. Trends Microbiol 1998; 6: 107-12.

13. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al., and Barrell, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998; 393: 537-44.
14. Groisman E, Ochman H. How to become a pathogen. *Trends Microbiol* 1997; 2: 289-93.
15. Galán JE. MicroReview: Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol Microbiol* 1996; 20(2): 263-71.
16. Zahrt T, Deretic V. *Mycobacterium tuberculosis* signal transduction system required for persistent infections. *PNAS* 2001; 98 (22): 12706-11.
17. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16 (3): 463-96.
18. Zahrt T, Deretic V. An Essential Two-Component Signal Transduction System in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 2000; 182 (13): 3832-8.
19. Ewann F, Jackson M, Pethe K, Cooper A, Mielcarek N, Ensergueix D, et al, and Supply, P. Transient requirement of the PrrA-PrrB two-component system for early intracellular multiplication of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2002; 70 (5): 2256-63.
20. <http://www.sangercentre.uk>. Sanger Centre. Secuencia del genoma de *Mycobacterium tuberculosis*.
21. Av-Gay Y, Jamil S, Drews SJ. Expression and Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* Serine/Threonine Protein Kinase PknB. *Infect Immun* 1999; 67 (11): 5676-82.
22. Ryndak M, Wang S, Smith I. PhoP, a key player in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Trends Microbiol* 2008; 16 (11): 528-34.
23. Lee CA. Type III secretion systems: Machines to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells? *Trends Microbiol* 1997; 5 (4): 148-56.
24. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Mycobacterium*. In: *Medical Microbiology*. Edited by Mosby, Inc. 4th Ed. St. Louis., 2002. p.: 368-9.
25. Gowel J-P. Pathogen-host cell molecular interactions: Knowledge and challenge. *Cell* 2000; 103: 550-2.
26. Talaat AM, Howard ST, Hale W4th. Lyons R, Garner H, And Johnston, S. A. Genomic DNA standards for gene expression profiling in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nuclei Acids Res* 2002; 30 (20): e104.
27. Betts JC, Lukey PT, Robb LC, McAdam RA, Duncan K. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol* 2002; 43(3): 717-31.
28. Shiloh MU, DiGiuseppe PA. To catch a killer. What can mycobacterial models teach us about *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis? *Curr Opin Microbiol* 2009; 13: 1-7.
29. Dannenberg Jr. AM. Perspectives on clinical and preclinical testing of new tuberculosis vaccines. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23 (4): 781-94.
30. Beisiegel M, Mollenkopf HJ, Hahnke K, Koch M, Dietrich I, Reece ST, Kaufmann SH. Combination of host susceptibility and *Mycobacterium tuberculosis* virulence define gene expression profile in the host. *Eur J Immunol* 2009; 39 (12): 3369-84.
31. Basset C, Holton J, O'Mahony R, Roitt I. Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine*. 2003; 21 (2):S12-23.
32. Byrd TF. Tumor necrosis factor a (TNF-a) promotes growth of virulent *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes. *J Clin Invest* 1997; 99 (10): 2518-29.
33. Zahrt T, Deretic, V. Reactive Nitrogen and Oxygen Intermediates and Bacterial Defenses: Unusual Adaptations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4 (1): 141-59.
34. Liu J, Tran V, Leung A, Alexander D, Zhu B. BCG vaccines. *Human Vaccines* 2009; 5 (2): 70-8.