

29 de noviembre, tarde

Mesa 3

Moderadores: **Dra. Paquita Sanchez**
Dr. Xavier Martínez-Lacasa

Historia de la vacuna BCG

Neus Altet Gómez. Unidad de Prevención y Control de la Tuberculosis. Barcelona.

Desde que el 24 de marzo de 1882 Roberto Koch presentó en Berlín el resultado de sus trabajos sobre la "Etiología de la Tuberculosis" comenzó la búsqueda de una vacuna contra ésta enfermedad. Tras numerosos intentos frustrados la vacuna más ampliamente utilizada es la obtenida por Albert Calmette y Camille Guérin en el Instituto Pasteur de Lille: la vacuna B.C.G. En 1906 se iniciaron las investigaciones a partir de una cepa de bacilo bovino aislada por Nocard en la leche de una vaca con mastitis tuberculosa; ésta cepa fue sembrada en un medio de cultivo de patata con bilis de buey, glicerizada al 5% y resembrada durante 13 años. Tras 230 pases se consideró que los caracteres del bacilo bovino eran inmodificables por estar fijados hereditariamente. En 1921 se inició la vacunación infantil por vía oral y el 25 de junio de 1924, Calmette comunicó el resultado de sus experiencias a la Academia de Medicina de París.

A partir de entonces se expandió su uso por Europa, aunque pronto empezaron a surgir críticas basadas en la recuperación de la virulencia por el bacilo vacunal hasta que en 1930 se produjo el desgraciado suceso de Lübeck. En ésta ciudad alemana los cultivos del BCG se contaminaron con cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) humano ocasionando la enfermedad en 103 niños de los que fallecieron 72. Este incidente redujo la utilización de la vacuna BCG hasta que en 1933 se publicaron los resultados obtenidos por Wallgren en Suecia demostrando en los niños nacidos en familias con casos de tuberculosis bacilífera una alta eficacia de la vacuna en la disminución de la tasa de mortalidad. Los datos obtenidos en las enfermeras de Noruega y en niños en Dinamarca, Francia y España que también demostraban la reducción de la mortalidad por tuberculosis en los vacunados terminaron con las reticencias y la vacuna fue aceptada universalmente.

Finalizada la Segunda Guerra Mundial la Tuberculosis se convirtió en una de las mayores preocupaciones de las naciones por lo que se

recomendó el uso masivo de la vacunación con el BCG. Iniciado por la Cruz Roja de Dinamarca en 1947, pronto se unieron Suecia y Dinamarca en la llamada Campaña Tuberculosa Internacional, más conocida como la Empresa Conjunta y en 1949 la UNICEF, y se extendió por todos los países afectados por la Gran Guerra y por los del tercer Mundo. Se recomendó sustituir la administración de la vacuna por vía oral y utilizar la intradérmica o por escarificación. A finales de 1950 comenzaron las vacunaciones en 41 países de África, Asia y Lationamérica. En los años 1970 la vacunación se practicaba en 169 países y se estimaba en 2.000 millones el número de personas vacunadas.

El BCG fue incorporado al Programa Ampliado de Vacunación en 1974 e incluido por la OMS dentro del programa de Salud para Todos en el año 2000. Actualmente existe una cobertura vacunal superior al 80% en la población infantil y se estima que aproximadamente cada año son vacunados unos 100 millones de niños.

La vacunación BCG en España comenzó en Barcelona en noviembre de 1924. El Profesor Luis Sayé la inició en el Dispensario Central Antituberculoso de Barcelona mediante una cepa vacunal proporcionada por Calmette, obteniendo gran aceptación y difusión en Cataluña. En el resto de España la introdujo en 1927 el Instituto de Higiene Alfonso XIII y a partir de 1939 el Patronato Nacional Antituberculoso se responsabilizó de la Lucha Antituberculosa. En 1948 se constituyó la Comisión Nacional de Vacunación Antituberculosa con BCG, que dictó las normas de la campaña de vacunación, basadas en las resoluciones del Primer Congreso Internacional del BCG, aunque España nunca participó en las Campañas Internacionales. En 1965 se puso en marcha el Plan Nacional de Erradicación de la Tuberculosis en el que una de sus estrategias fue la campaña de vacunación BCG masiva en recién nacidos y escolares y adolescentes negativos a la prueba de tuberculina. El Plan de Erradicación finalizó en noviembre de 1973, aunque se hizo la recomendación oficial de mantener la vacunación BCG de los recién nacidos. En febrero de 1974 se suspendió definitivamente en Barcelona y durante los años 1980 en el resto de España, aunque se siguió utilizando en algunas provincias. En 1992 la Conferencia de Consenso para el Control de la Tuberculosis en España recomendó la suspen-

si3n de la vacunaci3n BCG sistem3tica (15), no obstante se ha seguido utilizando en algunas Comunidades Aut3nomas de Espa1a. Se estima que desde 1965 hasta la actualidad se han vacunado en Espa1a unos 16 millones de individuos.

La vacuna BCG es una vacuna viva derivada de una cepa bovina que generalmente se administra por inyecci3n intrad3rmica en la regi3n deltoidea donde deja una cicatriz que en la mayor3a de individuos puede persistir durante gran parte de su vida. No impide la infecci3n con MTB pero ayuda a limitar y retrasar la multiplicaci3n de los bacilos en el foco de infecci3n primaria y previene la diseminaci3n linfohemat3gena masiva evitando las formas cl3nicas de tuberculosis consecutivas a la diseminaci3n hemat3gena del bacilo, como la meningitis y la tuberculosis miliar^{17,18}. Los ensayos cl3nicos controlados, los estudios de casos-controlos y los estudios de contactos han demostrado eficacias vacunales muy dispares, que oscilan entre un 80% y 0% (incluso en algunos se ha comprobado riesgo de enfermedad), lo que impide prever la eficacia de la vacunaci3n en todas las situaciones. Se han comprobado diferencias inmunogen3ticas, f3sicas y microbiol3gicas entre las distintas vacunas que junto factores dependientes del hu3sped, de la t3cnica vacunal y de la infecci3n por *M. tuberculosis* y otras micobacterias explicar3an las diferencias de la eficacia vacunal. Lo cierto es que bas3ndonos en nuestros conocimientos actuales, no somos capaces de predecir cual va a ser la eficacia de una determinada vacuna

BCG en una determinada poblaci3n, por cuyo motivo actualmente los programas de vacunaci3n con BCG deben de adaptarse a la situaci3n epidemiol3gica de cada pa3s.

Bibliograf3a recomendada

- Calmette A, Gu3rin C, Weill-Hall3 B, Bocquet A, N3gre L, et al. Essais d'immunisation contre l'infection tuberculeuse. Extrait du Bolet3n de l'Academ3e de Medicine (S3ance du 24 juin 1924, Tome XCI, N3 26). Ed. Masson et Cie. Par3s 1924.
- Altet G3mez MN. Estudio de casos y controles para evaluar la eficacia de la campaa de vacunaci3n con el BCG en el reci3n nacido en la poblaci3n de Barcelona. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona. Barcelona 1990.
- Say3 L, Domingo P, Miralbell M. Primera serie de observaciones sobre la vacunaci3n antituberculosa de Calmette. Rev M3dica de Barcelona 1927;IX,51:274-302.
- Alcaide J, Altet MN, Salleras LI. Vacuna BCG. En: Vacunaciones Preventivas. Principios y aplicaciones. Cap. 24. Dir. L. Salleras. Ed. Masson, 2^a Edici3n. Barcelona, 2003.
- Murray CJL, Styblo K, Rouillon A. Tuberculosis en los pa3ses en desarrollo: magnitud, intervenciones y costos. Bol Uni3n Int Tuber Enf Resp (ed. espa1ol) 1990,65:6-26.

Tabla 1. Utilidad de los Programas de Vacunaci3n BCG en el marco de las estrategias de Prevenci3n y Control de la Tuberculosis seg3n la situaci3n epidemiol3gica de un pa3s

Prevalencia de la Infecci3n	Riesgo Anual Infecci3n	Objetivos del Programa	Estrategias
Alta	> 1	Reducir Mortalidad Diagn3stico 100% Casos B(+) Aumentar Tasas Curaci3n	BCG masiva B3squeda pasiva de casos con Baciloscop3a de esputo. Quimioterapia con TDO* y drogas de alta calidad.
Media	0,2-1	Diagn3stico todos casos TB Aumentar Tasas Curaci3n (>85%) Prevenci3n Enfermedad	B3squeda pasiva B3squeda activa en grupos de alto riesgo Quimioterapia con TDO (¿Grupos BCG en grupos de riesgo de riesgo?) Tratamiento Infecci3n Latente en grupos de riesgo.
Baja	<0,2	Diagn3stico precoz Curaci3n 100% casos Prevenci3n de la enfermedad Prevenci3n de la infecci3n	B3squeda pasiva B3squeda activa en grupos de riesgo Quimioterapia con TDO Tratamiento Infecci3n Latente Tratamiento Infecci3n Probable

* T.D.O, Tratamiento Directamente Obervado. Fuente: Referencia num. 4. Elaboraci3n propia.

Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century

Ajit Lalvani, *Wellcome Senior Clinical Research Fellow, Honorary Consultant Physician, Nuffield Department of Clinical Medicine, University of Oxford, Level 7, John Radcliffe Hospital.*

AL's research programme is funded by the Wellcome Trust. AL is a Wellcome Senior Clinical Research Fellow

Conflict of interest statement: AL is a named inventor on patents relating to T cell-based diagnosis filed by the University of Oxford. Regulatory approval and commercialisation of ELISPOT is being undertaken by a spin-out company of the University of Oxford (Oxford Immunotec Ltd), in which AL has a share of equity and to which he acts as a non-executive scientific advisor.

Tuberculosis (TB) control is based on prevention as well as prompt diagnosis and treatment of active TB. Since the latter is accomplished quite effectively in developed countries, and since BCG vaccination is of limited effectiveness, better TB control will require improved diagnosis and preventative treatment of latent tuberculosis infection (LTBI). The reservoir of latently infected people is much larger than the number of active TB cases, and includes recently infected contacts of pulmonary TB cases and immigrants from high prevalence regions who acquired infection in their country of origin. This latter group is becoming increasingly important because over half the burden of TB in many low-prevalence countries is carried by immigrants, and because several higher prevalence countries will soon join the European Union.

Prophylactic treatment of LTBI is highly effective in preventing the subsequent development of active TB; the difficulty lies in identifying who is harboring latent bacilli. TB control programmes rely exclusively on the century-old tuberculin skin test (TST) for diagnosing LTBI in asymptomatic individuals with known or suspected TB exposure. The success or otherwise of TB control and elimination in the developed world thus hinges on the oldest diagnostic test in medicine and the multiple limitations of the TST constitute a major roadblock to better TB control.

The TST's main drawback is its poor specificity, because of false-positive results in BCG-vaccinated individuals due to antigenic cross-reactivity of purified protein derivative (PPD) with BCG; this confounding effect persists for 15 years after vaccination. This is a widespread problem as most of the world's population is BCG-vaccinated and, even in low-prevalence countries that have ceased BCG vaccination, most TB cases and their contacts are BCG-vaccinated immigrants. The problem is so significant that the British Thoracic Society Code of Practice for Control and Prevention of TB no longer recommends performing TST on BCG-vaccinated adults with recent TB exposure.

The recent identification of genes that are present in *M. tuberculosis* but absent from BCG raises the possibility of developing a more

specific diagnostic test. Detecting an immune response to one of these gene products could, in theory, indicate *M. tuberculosis* infection as distinct from BCG vaccination. However, humoral immune responses in LTBI are generally weak, and this has proved to be an insurmountable barrier to the development of a useful serological test. Individuals with LTBI (and most patients with active TB) do, however, mount a strong cellular immune response to *M. tuberculosis*. Fortunately, two of the proteins that are absent from BCG are major targets of the T cell response to *M. tuberculosis*: early secretory antigenic target 6 (ESAT-6) and culture filtrate protein 10 (CFP10).

Measurement of T cell responses has traditionally been confined to the research laboratory as it required specialised sterile tissue culture facilities, technical expertise and radioisotopes. However, the most sensitive assay for detecting antigen-specific T cells was recently modified to enable rapid and convenient detection of T cells directly from a blood sample. The rapid *ex vivo* enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay counts individual antigen-specific T cells. T cells from *M. tuberculosis*-infected individuals become sensitised to ESAT-6 or CFP10 *in vivo*; when the T cells re-encounter these antigens *ex vivo* in the overnight ELISPOT assay, they release a cytokine, interferon-gamma¹. By the next morning, each such T cell gives rise to a dark spot, which is the "footprint" of an individual *M. tuberculosis*-specific T cell. The read-out is thus the number of spots, which are counted using a magnifying lens or automated reader. The principle that underpins ELISPOT is that a highly sensitive T cell assay using highly specific *M. tuberculosis* antigens should result in a test with high diagnostic sensitivity and specificity. So what happens in the clinic?

ELISPOT was first validated and compared with TST in patients with culture-confirmed active TB and control patients with non-tuberculous illnesses; its sensitivity was over 90%, significantly higher than the 69% for TST¹. Importantly, non-tuberculous illnesses did not cause false-positive results. Unlike TST, ELISPOT is not susceptible to false-negative results in patients with disseminated TB, and it maintains its high sensitivity in HIV-infected TB patients². ELISPOT may thus prove clinically useful in the diagnostic assessment of patients with suspected active TB in low-prevalence regions; in particular, its high sensitivity could help clinicians to 'rule out' a diagnosis of TB³.

Demonstrating superiority of a new test for LTBI is more difficult than for active TB because there is no gold standard reference test. Thus, it is not possible to measure directly the sensitivity and specificity of a new test for LTBI. However, as airborne transmission of *M. tuberculosis* is promoted by increasing duration and proximity of contact with an infectious case, a key determinant of infection is the amount of time spent sharing room air with the source case. Hence, if ELISPOT is indeed a more sensitive and specific test, it should correlate more closely with level of exposure to *M. tuberculosis* than the TST and should be independent of BCG vaccination status.

A community study of 50 recent TB contacts at risk of LTBI found that ELISPOT correlated with the extent of recent exposure to ca-

ses of pulmonary TB, as judged by exposure history, whereas unexposed people were uniformly ELISPOT-negative⁴. Unlike TST, ELISPOT was not confounded by BCG-vaccination status⁴. However, proving a statistically significant better correlation with exposure is a major challenge, as it would require simultaneous screening by ELISPOT and TST of large numbers of people with a wide range of precisely quantified exposure to *M. tuberculosis*. In 2001, the UK suffered its largest outbreak of TB since the Second World War. It occurred in a secondary school and resulted from a single infectious source case with several hundred contacts; school timetables permitted precise quantification of the amount of time each child spent sharing room air with the source case. 535 students were tested by ELISPOT and TST in a blinded, prospective study, and correlation of each test with degree of exposure to the source case, and BCG vaccination status, was compared. Although agreement between the tests was high (89% concordance), ELISPOT correlated significantly more closely with *M. tuberculosis* exposure than TST, based on pre-defined measures of proximity and duration of exposure to the source case⁵. TST was significantly more likely to be positive in BCG-vaccinated students whereas ELISPOT was independent of BCG vaccination. Thus, although direct quantification of sensitivity and specificity of ELISPOT or TST for LTBI is not possible in the absence of a gold standard, the unique circumstances of this outbreak made it possible to rank the tests according to their diagnostic accuracy⁵.

4,000 individuals in seven countries have been tested by ELISPOT to date; results from the first 1,000 are already published, and indicate that ELISPOT is a more accurate marker of LTBI than TST. What more do we need to know before we can use ELISPOT to guide the management of LTBI? Notwithstanding the TST's numerous limitations, several decades of long term follow-up studies have shown that a strongly positive TST in exposed, asymptomatic individuals has some predictive value for subsequent development of active TB. Thus, the cross-sectional data indicating that ELISPOT is more accurate than TST should be supplemented by some longitudinal data to confirm that exposed individuals with a positive ELISPOT result really are at risk of subsequent active TB. Despite the long incubation period of tuberculosis, clinical outcome data of this sort are already beginning to emerge from several ongoing longitudinal studies around the world. In addition, we need to know how reliably ELISPOT performs in high throughput routine hospital laboratories. ELISPOT only requires a centrifuge, incubator and microscope and has been successfully transferred to several rudimentary laboratories in resource-poor settings; thus we already know that it is simple and robust. Nonetheless, commercial development of the assay through to regulatory approval, which is already underway, is making ELISPOT even faster and better suited to high throughput laboratories. Once ELISPOT enters routine practice, how will it impact on TB control? We can try to predict this on the basis of its three key attributes: high specificity; high sensitivity; and the fact that it is an *ex vivo* blood test, rather than an *in vivo* skin test. The improved specificity of ELISPOT will mean that in BCG-vaccinated populations screening and treatment for LTBI could be performed more widely and vigorously, without anxiety about false-positive results due to prior BCG vaccination. ELISPOT

would also avoid unnecessary chemoprophylaxis and its attendant toxicity. This ability to screen out false-positive TST results will become increasingly important as the prevalence of LTBI falls in low-prevalence countries. This is likely to be an enabling step for control programmes that aim to eliminate TB, such as that of the United States Centers for Disease Control and the European Working Group on Control and Elimination of TB.

Although the sensitivity of TST for LTBI cannot be directly quantified, we know that false-negative results are common in at least two important groups: HIV-infected individuals and people on immunosuppressive drugs. This is a significant problem because it is precisely these people who, once infected, are at highest risk of progression to active TB. Comparative studies to date indicate that ELISPOT has a higher sensitivity than TST in people with HIV-induced² or iatrogenic immunosuppression⁶. False-negative TST results also occur in contacts who already have active TB at the time of screening. The higher sensitivity of ELISPOT for active TB will help to minimise this problem. Thus, the improved sensitivity of ELISPOT over TST in these groups should help to reduce the burden of active TB.

The fact that ELISPOT is a blood test will have three major consequences. First, the problem of people not returning to have their skin tests read will be circumvented and this should increase the yield of contact investigations and screening for LTBI. Second, repeated testing of high risk individuals, such as health care workers, would not be confounded by the booster phenomenon, where repeated skin testing eventually induces false-positive TST results. Third, test results will be issued by hospital laboratories instead of being read by contact clinic nurses. This will increase workload in laboratories while decreasing workload in contact clinics; the operational consequences of this are hard to predict, but it could allow overburdened contact clinic personnel to focus on contact tracing and adherence with preventative treatment, rather than administering and reading TST.

Since TST is cheap, introduction of ELISPOT would initially increase the cost of TB control. However, the cost savings that would follow from avoiding unnecessary chemoprophylaxis and from lessening the number of cases of active TB could make ELISPOT very cost-effective in the long term. The World Health Organisation is undertaking a quantitative cost-benefit health economic analysis of the recent use of ELISPOT to prevent a potential outbreak of multidrug resistant TB in northern Italy.

For high-burden countries, improving prompt diagnosis and treatment of active disease remain the immediate priorities. However, better diagnosis of TB infection by ELISPOT could help TB control in high-burden countries in three ways: by improving diagnosis of asymptomatic infection (and active TB) in children; by improving diagnosis in HIV-infected people²; and by enhancing epidemiological surveys to assess the effect of TB control measures⁷. Thus, although ELISPOT's greatest impact will initially be on TB control in the developed world, it is likely that countries with a high burden of TB and HIV will also stand to benefit from this new approach to spotting TB infection.

Bibliografía

1. Lalvani A, Pathan AA, McShane H, et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(4):824-8.
2. Chapman AL, Munkanta M, Wilkinson KA, et al. Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV-positive individuals by enumeration of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells. *Aids* 2002;16(17):2285-93.
3. Barnes PF. Diagnosing latent tuberculosis infection: the 100-year upgrade. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(4):807-8.
4. Lalvani A, Pathan AA, Durkan H, et al. Enhanced contact tracing and spatial tracking of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet* 2001;357(9273):2017-21.
5. Ewer K, Deeks J, Alvarez L, et al. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet* 2003;361(9364):1168-73.
6. Richeldi L EK, Losi M, Hansell D, Roversi P FL, Lalvani A. Early diagnosis of multidrug resistant tuberculosis. *Annals of Internal Medicine* 2004;140:709-13.
7. Lalvani A, Nagvenkar P, Udawadia Z, et al. Enumeration of T cells specific for RD1-encoded antigens suggests a high prevalence of latent Mycobacterium tuberculosis infection in healthy urban Indians. *J Infect Dis* 2001;183(3):469-77.

Nuevas vacunas contra la tuberculosis

Pere-Joan Cardona. *Unitat de Tuberculosi Experimental. Servei de Microbiologia. Institut per a la Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol. Badalona*

Introducción

El diseño actual de las vacunas profilácticas contra la tuberculosis se basan en un modelo idealizado que nada tiene que ver con la patogenia en humanos.

El diseño de vacunas contra la infección por *M. tuberculosis* se ha basado esencialmente en el desarrollo de una respuesta inmune específica capaz de generar linfocitos Th1 capaces de sintetizar interferón-gamma (IFN- γ) y con ello activar a los macrófagos infectados, que serían los responsables principales de la destrucción del bacilo. Para ello se utilizan mayoritariamente, antígenos de bajo peso molecular presentes en el "pool" de péptidos generados con el crecimiento exponencial "in vitro" de *M. tuberculosis*. A principios de los años 90 se observó que estos antígenos eran los que podían generar esta respuesta. Esencialmente se están utilizando las proteínas ESAT-6 y Ag85, unidas a adyuvantes químicos, integradas en vectores como el virus del *small pox* o insertadas en células del hospedador mediante DNA.

Este diseño es la síntesis perfecta de toda una serie de dogmas e ideas sobrevaloradas referentes a la patogénesis de la tuberculosis.

Estas ideas se resumen en la Tabla 1 y, paradójicamente, parecen volver la espalda a una gran multitud de otras evidencias científicas, que no han podido ser defendidas con tanto énfasis. Muestra de ello son la característica patogenia de la tuberculosis en humanos y las características del bacilo, tal como se reflejan en la Tabla 2, hechos que habitualmente no parecen tener importancia en la valoración de modelos experimentales, hecho paradójico teniendo en cuenta que el ser humano desarrolla una resistencia muy importante contra *M. tuberculosis*: tan solo un 10% de los individuos infectados enferman, y de estos "tan solo" en un 40% ocasiona la muerte. Contrariamente, todos los ratones (el hospedador experimental seleccionado) infectados desarrollan un proceso progresivo de infiltración del parénquima pulmonar que se traduce en la ocupación total y en la muerte del hospedador. La estadística es clara: de 100 humanos que se infectan, acaban muriendo 4; de 100 ratones que se infectan mueren 100.

Fuera de esta crítica se sitúan las vacunas atenuadas, como el mutante de *M. tuberculosis* que carece del regulador *phoP*, y que potencialmente son capaces de generar la respuesta inmune global desarrollada por la cepa salvaje.

El mecanismo de acción de las vacunas profilácticas Th1 olvida las características fisiológicas del bacilo: crecimiento lento, inducción de necrosis y desarrollo de latencia, y el recambio celular en el parénquima pulmonar.

El diseño de una vacuna capaz de generar linfocitos de tipos Th1 tiene un riesgo importante. Una vez el bacilo ha invadido el macrófago del hospedador no inmunizado y este es incapaz de destruirlo, el bacilo empieza a multiplicarse hasta el punto en que un macrófago o una célula dendrítica procesa y presenta sus antígenos a un linfocito específico. Entonces este linfocito se desplazará hasta el foco infectivo para iniciar el reconocimiento de los macrófagos infectados y sintetizará IFN- γ para activarlos.

En este momento podemos lanzar al menos 2 preguntas: ¿Los macrófagos activados por IFN- γ son capaces de destruir al bacilo? y ¿Todos los macrófagos infectados pueden ser activados? La respuesta es: no.

Si bien es verdad que la activación del macrófago mediante IFN- γ genera una respuesta bactericida importante contra *M. tuberculosis* que, de otra manera, y mediante la inhibición de la unión fagosoma-lisosoma, se multiplica tranquilamente, también es verdad que un cierto porcentaje de estos bacilos son capaces de resistir a condiciones de estrés importantes y desarrollar un estado de latencia. Por otra parte, los componentes de la pared celular de *M. tuberculosis*, son capaces de inducir la generación de óxido nítrico (NO) en el interior de los macrófagos. En este caso, al sintetizar NO, el macrófago infectado que presenta los antígenos al linfocito específico le provoca una inmunosupresión, con lo que no podrá activarlo.

De todas maneras, este escenario es demasiado sencillo. El hospedador humano tiene una extraordinaria intolerancia ante los antígenos de *M. tuberculosis* y genera una respuesta inflamatoria extraordinaria, la denominada "reacción de Koch" (similar a la reacción de Shwartzmann) en este punto, desarrollando una necrosis intra-

granulomatosa. Tenemos aquí otro elemento bactericida, aunque también de generación de bacilos latentes.

Generado pues el granuloma ante los diferentes focos infectivos, de una magnitud muy inferior a la que podríamos encontrarnos en un hospedador no inmune, y que por tanto ha dejado pasar un periodo de tiempo importante para poder desarrollar linfocitos Th1 específicos. ¿Qué pasa en el interior de este granuloma? Hay al menos dos posibilidades en virtud de la magnitud espacial de este. En el caso que la necrosis sea reducida, los macrófagos penetrarán en su interior para limpiar los detritus generados con la respuesta inmune. En el caso que sea importante, sufrirá un proceso de limpieza, pero a la vez de fibrosis y de calcificación del tejido.

En ambos casos, algunos de estos macrófagos fagocitarán además bacilos latentes, incapaces de multiplicarse, y por tanto imposibles de distinguir entre los detritus de los bacilos destruidos. Estos macró-

fagos, denominados espumosos debido a su aspecto hinchado y vacuolado, generan NO y por tanto no pueden ser activados por ningún linfocito específico. Al contrario, una vez repletos de detritus abandonarán el granuloma a través del espacio intraalveolar.

A su vez, la lenta velocidad de crecimiento de *M. tuberculosis* permite que pueda iniciar su multiplicación en el interior del escenario privilegiado que es el macrófago espumoso, pero cuando este está situado en el exterior del granuloma. Este hecho da garantías a *M. tuberculosis* de volverse a multiplicarse de nuevo, puesto que si iniciara inmediatamente su crecimiento, lo haría en el interior del granuloma dónde, al destruir el macrófago, podría ser fagocitado por nuevos macrófagos que si serían capaces de volverse a activar y generar una respuesta bactericida intensa.

De esta manera, el proceso vuelve a repetirse, y el bacilo vuelve al estadio inicial, en el espacio intraalveolar, dispuesto a generar un nuevo foco infectivo.

Tabla 1. Distorsiones y dogmas sobrevalorados en el diseño de vacunas contra la infección por *M. tuberculosis*.

1. El ratón genera una respuesta ante la infección similar a la humana.
2. El ratón no genera necrosis intragranulomatosa, y genera una DTH muy débil. Su respuesta se basa en los linfocitos de tipo Th1 (respuesta de tipo Th1), que mediante la síntesis de IFN- γ activan a los macrófagos infectados. Es la respuesta "Listeria-like".
3. El cobaya es más susceptible a la infección por *M. tuberculosis*. Genera una gran DTH y una necrosis intragranulomatosa (o reacción "Koch-like" importante).
4. La necrosis intragranulomatosa se vincula a la DTH, que se califica de respuesta celular "débil".
5. La positividad de la prueba de Mantoux (basada en la DTH) no implica protección ante la infección por *M. tuberculosis*.
6. En el modelo experimental de infección por *Leishmania*, los ratones que generan una respuesta de tipo Th2 (BALB/c), en que predomina la respuesta humoral, son más susceptibles que los que generan una respuesta de tipo Th1 (C57Bl/6).
7. Extrapolación de la patogénesis de la lepra en humanos. Esencialmente dos polos opuestos: La Lepra Tuberculoide, con menor destrucción de tejidos y que mantiene una población bacilar limitada se basa en la generación de una buena respuesta celular y mala respuesta humoral. En la Lepra Lepromatosa sucede todo lo contrario.
8. La respuesta de tipo Th2 es contraria a la Th1.
9. La respuesta de tipo Th2 es responsable de la necrosis intragranulomatosa.
10. Los bacilos de *M. tuberculosis* muertos son incapaces de generar una respuesta inmune protectora. El modelo de infección experimental en macaco es el que mejor reproduce la patología en humanos.

IFN- γ : Interferón gamma; DTH: Hipersensibilidad retardada

Tabla 2. Características de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*

1. Propiedades de *Mycobacterium tuberculosis*:
 - 1.a. Es un patógeno intracelular capaz de evitar la unión fagoso malisoma.
 - 1.b. Induce una respuesta necrótica en los tejidos infectados.
 - 1.c. Es capaz de adaptarse al estrés ambiental.
 - 1.d. Tiene una velocidad de crecimiento lenta.
2. Respuesta inmune del hospedador humano infectado:
 - 2.a. La respuesta inespecífica se caracteriza por el estímulo de TNF, que induce la formación de granulomas y de necrosis intragranulomatosa y por el continuo "turnover" de las células, que permite "limpiar" constantemente el parénquima pulmonar.
 - 2.b. La respuesta específica es estimulada primordialmente por antígenos sintetizados durante el crecimiento del bacilo de bajo peso molecular (ESAT-6, CFP-10 y Ag85). Actúa cuando la concentración bacilar traspasa cierto umbral. Podemos diferenciar:
 - 2.b.1. Activación de los macrófagos infectados mediante IFN- γ sintetizado por linfocitos CD4 (esencialmente) y CD8.
 - 2.b.2. Generación de DTH, reacción artificial generada confines diagnósticos que traduce la capacidad de los linfocitos CD4 para identificar un rango amplio de antígenos y desarrollar un granuloma a su alrededor.
 - 2.b.3. Respuesta humoral importante, contra un amplio abanico de antígenos, siendo los más importantes los de 14,19 y 38 kDa.
 - 2.b.4. Destrucción de macrófagos infectados mediante células citotóxicas, esencialmente CD8 (su magnitud es relativa).

TNF: Tumor necrosis Factor; IFN- γ : Interferón gamma; DTH: hipersensibilidad retardada.

Cuando hay una necrosis de cierta magnitud, este proceso puede repetirse durante bastante tiempo. Una vez este bacilo pueda desarrollarse en un tejido que le permita un crecimiento más importante (léase el ápex pulmonar), la enfermedad podrá generarse.

Es decir, que con el planteamiento actual, las vacunas que se están diseñando no asegurarían la inmunidad del hospedador. Este hecho no hace sino corroborar un concepto antiguo inmunológico: la naturaleza local de la respuesta inmune celular. Por ello quizás, la evidencia que todavía no hay en el mercado ninguna vacuna que sea solo de tipo Th1. Por otra parte, ¿qué pasa con la respuesta Th3? Nadie parece darle importancia, aunque se trate de un tipo de respuesta antiinflamatoria.

El cribaje de las nuevas vacunas profilácticas no permite predecir su efectividad en el ser humano

La evaluación de nuevas vacunas se ha basa en el modelo de ratón y en que al menos sean capaces de igualar la protección generada por la vacuna BCG es decir, la reducción de $1 \log_{10}$ de la concentración bacilar en la fase aguda de la infección, a la semana 3 post infección. En todos los casos se sigue generando la infección crónica, y por tanto los animales acaban sucumbiendo. Esto no quiere decir que no pueda funcionar en el ser humano, simplemente significa que los resultados obtenidos en el modelo del ratón no tienen valor predictivo porque, tal como hemos analizado previamente, se basan en la inducción de una parte de la respuesta inmune protectora que debe generarse ante *M. tuberculosis*.

¿Qué modelo experimental deberá utilizarse? Probablemente el cobaya, puesto que tiene mayor capacidad para responder con intensidad contra *M. tuberculosis*. Este hecho tiene una explicación muy sencilla: el volumen del cobaya es hasta 50 veces mayor al del ratón, y por ello puede permitirse una reacción inmune más intensa, incluyendo la generación de un abundante tejido necrótico. Actualmente, este modelo también se utiliza, una vez pasado el cribaje del modelo del ratón, pero no para valorar la calidad y la intensidad de la respuesta inmune que genera, sino para probar la utilidad de la vacuna en un "hospedador susceptible". Tan solo se monitoriza la pérdida de peso en el tiempo.

Como episodio final, si la vacuna ha demostrado su utilidad en ratones y cobayas, se acaba valorando en primates no humanoides. En este sentido cabe considerar en primer lugar al enorme coste sentimental y social que implica la utilización de este animal. Por otro lado, este tipo de animales, *Rhesus* y *Cynomolgus*, tienen una envergadura demasiado pequeña (de 3 a 5 kg) como para poder hacer paralelismos en relación a su capacidad para generar reacciones inflamatorias suficientemente intensas contra *M. tuberculosis*. Por ello, nuestro grupo está trabajando para utilizar mamíferos de mayor envergadura, omnívoros y con una gran similitud con la fisiología humana como los cerdos (de unos 30 kg de peso). Volviendo al modelo del Macaco, se da además la paradoja que tras ser vacunados con BCG, el *Rhesus*, que es capaz de generar una importante producción de IFN- γ , no obtiene ninguna protección tras la vacunación, mientras que el *Cynomolgus*, con una producción mucho menor, sí.

Finalizar este apartado con el apunte que la mayoría de terapias contra tuberculosis han sido ensayadas directamente en seres humanos, sin confiar demasiado en los modelos de infección experimental. ¿Estamos repitiendo de nuevo este error?

El diseño de las nuevas vacunas terapéuticas contra *M. tuberculosis* deberá tener en cuenta necesariamente la presencia de tejido necrótico infectado y el volumen del hospedador

Una vez más, la estrategia planteada para valorar la utilidad de estas vacunas, se basa en un planteamiento que entendemos erróneo puesto que en este caso se ha implantado el modelo de Cornell, es decir, después de un tratamiento prolongado de 8 semanas con isoniacida-rifampicina, se empieza a valorar la utilidad de la vacuna, en un momento en que prácticamente no hay lesiones pulmonares en el hospedador. La crítica se basa en que no se tiene en cuenta que en los humanos, al menos en las infecciones recientes, se encuentran lesiones de cierta envergadura y perfectamente estructuradas. Siguiendo esta estrategia, ya se ha propuesto un candidato, basado en antígenos genuinamente relacionados con la latencia o la respuesta al estrés de *M. tuberculosis*, como el antígeno de 16 kDa, la alfa-cristallin, después de haber certificado el fracaso de la utilización terapéutica de vacunas como la basada en la inoculación de ESAT-6. Igualmente se ha planteado la utilización de una vacuna recombinante de BGC que integra la listeriolisina procedente de *Listeria monocytogenes*, que permite al bacilo escapar del fagosoma al citoplasma y con ello conseguir una mejor estimulación de linfocitos CD8 y con ello potenciar la respuesta citotóxica. También se ha utilizado la inoculación de *M. vaccae* y la de una vacuna de DNA codificando para la proteína de choque térmico Hsp60. Esta última demostró una gran eficacia, sin embargo en ambos casos se demostró la inducción de una toxicidad excesiva.

En nuestra opinión, la vacunación terapéutica deberá tener dos fases perfectamente definidas. En primer lugar, un corto periodo de tratamiento antibiótico para destruir los bacilos activos y favorecer la desaparición de la inflamación y la respuesta inmune local, y con ello reducir el tamaño de los granulomas y favorecer la reabsorción del tejido necrótico. En segundo lugar la inmunización con una vacuna poliantigénica, que no contenga tan solo los péptidos liberados con el crecimiento del bacilo sino que también contengan antígenos estructurales de su pared celular. Esta inmunización debe ser amplia y intensa, induciendo una respuesta celular y humoral que permita el hospedador la detección de todos los bacilos independientemente de su fase metabólica.

Siguiendo estas premisas, nuestro grupo ha optimizado una vacuna terapéutica, la RUTI, formada por la fragmentación en pequeñas partículas (de unos 100 nm de diámetro) de células de *M. tuberculosis* cultivadas en situación de estrés (con un pH bajo y en microaerobiosis) que ya ha demostrado su eficacia en el tratamiento de ratones en los que se ha inducido una infección crónica experimental en un modelo humanizado en ratón que sí genera necrosis intragranulomatosa.

Nuevos experimentos están en marcha para valorar esta vacuna en cobayas y cerdos.

Bibliografía

1. Agger EM, Andersen P. A novel TB vaccine; towards a strategy based on our understanding of BCG failure. *Vaccine* 2002;21:7-14.
2. Cardona PJ, Gordillo S, Díaz J, Tapia G, Amat I, Pallarés A, Vilaplana C, Ariza A, Ausina V. Widespread bronchogenic dissemination makes DBA/2 mice more susceptible than C57BL/6 mice to experimental aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2003;71(10):5845-54.
3. Cardona PJ, Ruiz-Manzano J. On the Nature of *Mycobacterium tuberculosis* latent bacilli. *Eur J Respir* 2004. In Press.
4. Cardona PJ, Amat I, Gordillo S, Arcos V, Guirado E, Díaz J, Tapia G, Ausina V. RUTI, a useful new immunotherapeutic vaccine for treatment of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Vaccine* 2004. In Press.
5. Olsen AW, Andersen P. A novel TB vaccine; strategies to combat a complex pathogen. *Immunol Lett* 2003;85:207-11

Nuevos sistemas diagnóstico microbiológico de tuberculosis

Manuel Casal. *Centro de Referencia de Micobacterias. Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba. España*

En la última década del siglo XX debido a la afectación de Países desarrollados por el SIDA y la Tuberculosis se produjo un gran avance tecnológico en los sistemas de diagnóstico microbiológico de la Tuberculosis que ha hecho que se haya avanzado más que los anteriores cien años desde que R. KOCH describió el *M. tuberculosis* en 1882.

Así hasta el desarrollo del SIDA en conjunción con la Tuberculosis los sistemas de diagnóstico microbiológico se basaban en la microscopía y el cultivo en medio sólido de manera directa con el complemento indirecto de la reacción de la tuberculina.

En estos últimos años han aparecido los medios de cultivo líquidos automatizados, la tecnología genética de amplificación, PCR, AMTD y similares para diagnóstico directo.

Las aplicación de esta tecnología a la identificación de las micobacterias (Accu Probe, Genotype, secuenciación complementada con la HPLC o bien aplicada al diagnóstico microbiológico epidemiológico (Spoligotyping, RFLP, VNTR - MIRU, etc).

También el diagnóstico de las resistencias a los fármacos antituberculosos bien con medios líquidos automatizados ó mediante tecnología genética de detección de genes de resistencia se ha desarrollado en gran manera.

Por su parte el diagnóstico de la infección sigue siendo un capítulo en desarrollo.