

MESA I. TESIS DOCTORALES

Moderadores: **Pere Joan Cardona.** Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol. Badalona.
Fernando Alcaide. Hospital Universitari de Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat.

Aplicación de la espectrometría de masas por MALDI-TOF para la identificación de las especies del género *Mycobacterium*

David Rodríguez Temporal

Hospital de Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat.

Correspondencia:

David Rodríguez Temporal

E-mail: davrotem@hotmail.com

Actualmente, la tuberculosis sigue siendo uno de los mayores problemas de salud en el mundo. Por otro lado, las micobacterias no tuberculosas (MNT) están ganando protagonismo en los países con baja prevalencia de tuberculosis, llegando a representar al menos un 50% del total de micobacterias aisladas en los laboratorios de microbiología. Debido a la gran diversidad existente de MNT, el diagnóstico microbiológico es un auténtico reto. La identificación convencional basada en pruebas fenotípicas ha quedado en desuso, y las técnicas moleculares utilizadas actualmente (PCR-hibridación reversa y/o secuenciación), a pesar de su alta fiabilidad, son costosas, requieren una infraestructura específica, y los sistemas comerciales de PCR-hibridación reversa identifican un número limitado de especies micobacterianas. El MALDI-TOF ha supuesto un gran revulsivo en el diagnóstico microbiológico, siendo un método rápido, de bajo coste y fiable para la identificación de bacterias convencionales y levaduras. Sin embargo, en las micobacterias presenta algunos desafíos debido principalmente a la complejidad de su pared celular, que dificulta una adecuada extracción proteica.

El objetivo de esta tesis fue evaluar de forma global la aplicación del MALDI-TOF para la identificación de las especies del género *Mycobacterium*. Para ello, los estudios llevados a cabo se centraron en los aspectos críticos que pueden influir en la eficacia de éste sistema sobre los aislamientos micobacterianos obtenidos en el laboratorio.

En un primer estudio, se evaluó la importancia actualizar las bases de datos de micobacterias del sistema MALDI Biotyper (Bruker Daltonics), observando que los dos factores que tienen

mayor impacto en la identificación micobacteriana son la incorporación de nuevas especies y espectros proteicos a la base de datos. Posteriormente, se estudiaron diversos procedimientos de extracción proteica mediante la aplicación de congelación y agitación mecánica, lo que identificó un mayor número de aislamientos que el método oficial. A través de un grupo de estudio europeo, se evaluó un procedimiento de sonicación, que apunta a ser el método de elección para la identificación de micobacterias mediante el MALDI-TOF.

Los últimos tres estudios se focalizaron en aspectos más específicos. En el primero de ellos, se introdujo la posibilidad de diferenciar algunas especies del complejo *M. tuberculosis*. Mediante la creación de un dendrograma se pudieron separar los aislamientos de *M. tuberculosis* del conjunto formado por *M. bovis* y *M. bovis*-BCG. El siguiente se centró en el medio de cultivo líquido, que muestra menor tasa de identificación. Se realizaron análisis en distintos períodos de tiempo tras ser positivos, observando que una incubación prolongada podría ser recomendable para aumentar el número de cepas identificadas. Finalmente, en el último estudio se evaluaron los puntos de corte del *score* proporcionado por el MALDI Biotyper. Con ello, se determinó que un *score* $\geq 1,60$ es adecuado para identificar la mayor parte de las especies más frecuentemente aisladas. No obstante, en el caso de aquellas relacionadas filogenéticamente, sería recomendable un *score* $\geq 2,00$.

En conclusión, mediante la incorporación de diversas mejoras en los diferentes aspectos críticos del MALDI-TOF, será posible su implementación para la adecuada identificación micobacteriana en los laboratorios de microbiología clínica.

Utilidad de las técnicas de inmunodiagnóstico de la infección tuberculosa en niños menores de 5 años

Eneritz Velasco

Hospital Universitari Sant Joan de Déu. Esplugues de Llobregat.

Correspondencia:

Eneritz Velasco

E-mail: evelasco@sjdhospitalbarcelona.org

Los lactantes y niños menores de 5 años constituyen una de las poblaciones más vulnerables a la infección por *M. tuberculosis*. El rendimiento de la prueba de tuberculina (PT) y los *Interferon-gamma release assays* (IGRA) en la infancia es menor que el de los adultos y la evidencia sobre su utilidad en los menores de 5 años es limitada. Asimismo, los datos sobre el uso de biomarcadores para el diagnóstico de TB en las guías pediátricas son escasos.

Este trabajo de tesis, compendio de 3 artículos publicados y uno bajo revisión, describe y analiza la estrategia de inmunodiagnóstico en menores de 5 años sin inmunosupresión conocida en riesgo de ITBL y/o TB en un área de baja prevalencia de TB.

El estudio descrito en el primer artículo se desarrolla en 383 niños y niñas en dos Unidades de TB Pediátrica de Barcelona entre 2005 y 2015 y compara el rendimiento diagnóstico de la PT y del *QuantiFERON-TB Gold-In-Tube* (QFT-GIT). Concluye que en los niños autóctonos con contacto con un caso índice de TB, la concordancia entre la PT y el QFT-GIT es alta y no se justifica el estudio doble con ambos test; en los niños con sospecha clínica de TB y en aquellos vacunados con BCG, el estudio doble con la PT y el QFT-GIT aumenta la sensibilidad y la especificidad diagnóstica y parecería justificado. Los resultados indeterminados en el QFT-GIT se deben a respuesta insuficiente al mitógeno y son más frecuentes cuanto menor es la edad.

El estudio descrito en el segundo artículo constituye un subestudio en los niños evaluados tras contacto con un caso índice. Tras el periodo ventana, el resultado del QFT-GIT es independiente de la PT basal y de haber recibido o no quimioprofilaxis primaria con isoniazida. El riesgo de progresión a ITBL o TB durante el periodo ventana es bajo pero no inexistente, y la quimioprofilaxis lo reduce de forma significativa.

El tercer artículo se centra en los niños de una de las Unidades entre 2012 y 2016 y analiza la influencia de factores del huésped, técnicos y ambientales en el rendimiento del QFT-GIT. La edad menor y los valores de VSG más altos asocian una menor respuesta en el tubo de control positivo y la edad menor además aumenta la tasa de resultados indeterminados. Hasta donde sabemos, es el primer estudio exploratorio sobre el impacto potencial de la exposición a humo del tabaco en los IGRA en niños menores de 5 años en riesgo de TB.

En el cuarto artículo se incluyen menores de 6 años con TB entre 2012 y 2016 y 2 grupos control (neumonía neumocócica y controles sanos) y se analiza la utilidad de la procalcitonina (PCT) en el diagnóstico de la TB y en el diagnóstico diferencial con la neumonía neumocócica. Los valores de PCT son significativamente más altos en la enfermedad TB confirmada y grave que en los niños sanos, pero inferiores a los de los niños con neumonía neumocócica, y siempre dentro del rango de normalidad.

The Study of the Human Tuberculosis Lesions (SH-TBL): Circulant and transcriptional biomarkers in a cohort of tuberculosis patients undergoing therapeutic surgery

Albert Despuig

Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol. Badalona.

Correspondencia:
 Albert Despuig
 E-mail: adespuig@igtp.cat

Tuberculosis (TB) is the worldwide leading cause of death among infectious diseases. Therapeutic surgery is still an invaluable tool to resolve the most complicated TB cases, for instance, if the patient is experiencing persistent lung cavities despite good adherence to chemotherapy. The TB scientific community efforts are focused on identifying which clinical-epidemiological factors lead a patient to evolve poorly during treatment and to identify biomarkers that can predict the treatment response, health status, and potentially fatal outcomes. Nonetheless, none of the current proposed strategies and/or techniques are reflecting the in-situ lung pathology exerted by *Mycobacterium tuberculosis*, therefore the local host-to-pathogen response is misrepresented. In this thesis, we hypothesized that the study of the systemic immune response and the local transcriptional activity from patients undergoing therapeutic surgery for their pulmonary TB could help us to identify potential diagnostic and prognostic TB biomarkers as well as essential information regarding the role of the host in the mechanisms associated to the generation of the TB cavitory lesions. Clinical-epidemiological data of a cohort of 137 patients undergoing therapeutic surgery for pulmonary TB were retrospectively analyzed according to the macroscopic features of the removed TB lesions. Next, in a new cohort of 40 patients also receiving therapeutic surgery, namely the SH-TBL Cohort, we assessed the levels of circulating immune markers and we performed RNA-seq upon the removed fresh human TB granuloma biopsies, to be correlated with the pathophysiological phenotype of the participants together with the macroscopic lesions' characteristics. We found the persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in surgical TB cavitory biopsies despite proving microbiological clearance in sputum culture after anti-TB treatment. Sex and toxic habits are important factors that may determine the evolution of the disease. Circulant biomarkers correlated with the size of the lesion, with multi-drug resistant forms, and factors considered to indicate the worst disease outcomes for the cohort

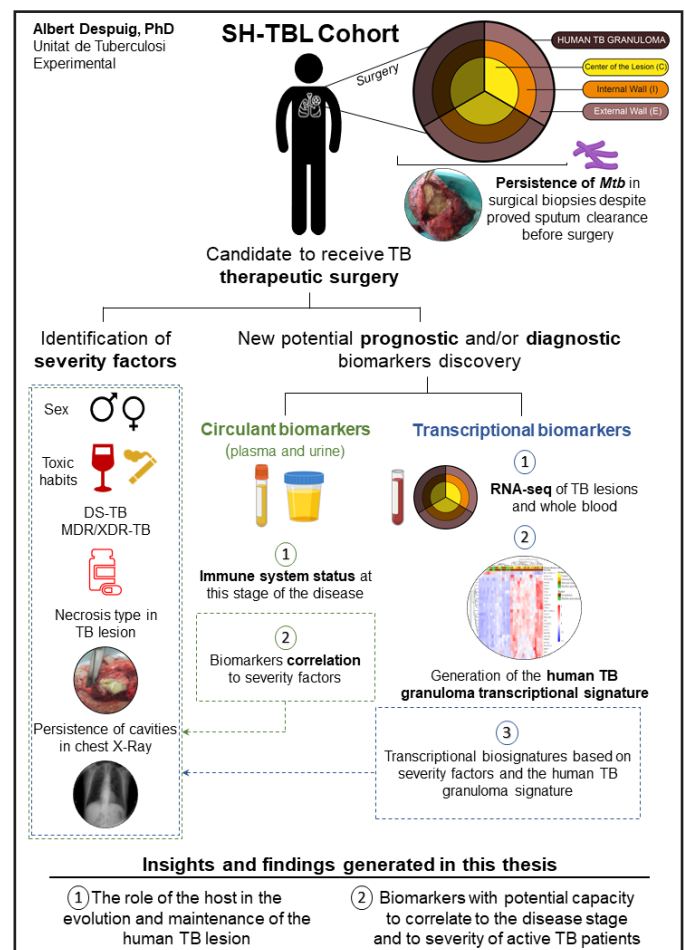


Figure 1.

participants. We noted an immunosuppressive effect exerted by the presence of the TB lesions, suggested by the immune-markers and the human TB granuloma transcriptome. For the first time, we generated a 6056-gene signature of the human TB granuloma including drug-sensitive and drug-resistant individuals and a list of genes of interest gathering the total-RNA expression of the

main pathophysiological traits of the cohort. Finally, we positively validated most of the genes of interest through NanoString in a bigger set of patients from the SH-TBL Cohort. The transcriptomic signatures generated from this thesis do add more insights about future putative biomarkers role in the TB lesions physiology and

could be used as a validating tool of circulant and transcriptional biosignatures. The set of genes of interest could become part of a potential transcriptional biosignature and therefore become an important tool for daily clinical routine in the TB patient management.
