

DÍA 12

MESA: Estudios en curso (II)

Moderadores: **Montserrat Garrigó.** Servicio de Microbiología. Hospital de Sant Pau. Barcelona.

Pere Godoy. Servicio de Medicina Preventiva. Facultad de Medicina. Universidad de Lleida. Hospital Santa Maria de Lleida-GSS. Lleida.

Deciphering the difference in local and systemic immune response and its role against TB

Sergio Díaz-Fernández, José Domínguez, Irene Latorre

Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol.

Correspondence:

Irene Latorre

E-mail: ilatorre@igtp.cat

Mycobacterium tuberculosis immune mechanisms involved in protection are still poorly understood. It is widely accepted that CD4 T-cells that secrete IFN- γ play an essential role in the immune responses against mycobacteria, however, they are not sufficient in the control and containment of the infection¹. Since *M. tuberculosis* is transmitted via aerosols and then contained in local tissues, it is also crucial to study responses at the site of infection for a better understanding of host-pathogen interaction. Additionally, the study of tuberculosis immune biomarkers has also benefitted greatly from animal experiments, providing a more comprehensive understanding of the disease thanks to the strict control of experimental conditions. One of the strengths of using mice for tuberculosis studies lies in the fact that immune responses in the lung can be investigated, and at the same time, the different phases of the infection/disease can be modeled by controlling the route of infection and the bacterial load challenge. Altogether, immune response investigation in human and animal models can allow the discovery of individual risk assessment for disease development, help the understanding of host-pathogen interactions, and provide rationale in vaccine development, shedding light on the immunological process driving from infection to disease.

Our studies in humans are focused on the investigation by flow cytometry of different activation/maturation markers such as CD27, CD38, HLA-DR, and Ki-67 in *M. tuberculosis*-specific T-cells for evaluating their performance characterizing latency, active disease, and treatment monitoring. The results obtained have shown that these markers are differentially expressed depending

on the clinical situation, opening the possibility of evaluating their use in the therapy monitoring^{2,3}.

It is also known that *M. tuberculosis* immunity depends on the existence of certain lung-localized subsets that do not recirculate into the blood⁴. It is then crucial to study these cells and cytokines involved in the local immune response, which could provide a rationale for novel therapies or vaccine regimens. To address this goal, we have established an experimental mice model infected with *M. tuberculosis* and a 34-colour spectral flow cytometry panel for deep immune profiling of the systemic and lung responses. Analyses reveal that lymphocytes within the lung parenchyma exhibit T-cells with a tissue residency phenotype, different from those observed in peripheral blood.

Immune responses have been also investigated under different BCG vaccination strategies. It is believed that the underlying mechanism behind poor BCG efficacy may be due to discrepancies associated with the natural route of infection (*M. tuberculosis* infection via the lung versus inoculation with BCG via the skin). The alveolar lining fluid (ALF), composed of surfactant, can attenuate *M. tuberculosis* pathogenicity by exposing new antigenic motifs on its surface and reducing virulence. In this sense, a new vaccination strategy with BCG previously exposed to an ALF has been established, as this can improve efficacy against the *M. tuberculosis* challenge⁵. At this point, the group has identified notable compartmentalization of T and B cell immune responses between lung and blood after BCG vaccination, observing an enhancing role of ALF-BCG vaccination on the immune mechanisms elicited by the classical BCG administration. Further

research is needed to fully understand the mechanisms driving these protective effects and their implications for tuberculosis vaccination strategies.

Bibliography

1. Coppola MT, et al. *Front Immunol.* 2020;11:103. doi: 10.3389/fimmu.2020.00103.
2. Latorre I, et al. *Front Immunol.* 2019;9:3094. doi: 10.3389/fimmu.2018.03094.
3. Díaz-Fernández S, et al. *Front Microbiol.* 2022;22:13:885312. doi: 10.3389/fmicb.2022.885312.
4. Ogongo P, et al. *Front Immunol.* 2019;10:992. doi: 10.3389/fimmu.2019.00992.
5. Moliva JI, et al. *J Infect Dis.* 2019;220(3):514-523. doi: 10.1093/infdis/jiz138.

Detección rápida de *M. tuberculosis complex* y resistencia a rifampicina e isoniazida mediante Standard™ M10 MDR-TB

Lucía Fernández Delgado L¹, Erika García de Cara¹, Cristina Arín¹, Fernando Alcaide^{1,2}

¹Servicio de Microbiología. IDIBELL-Hospital Universitario de Bellvitge. ²Departament de Patologia y Terapèutica Experimental. Universitat de Barcelona. FUITB. GEIM. Barcelona.

Correspondencia:

Lucía Fernández

E-mail: lfernandezd@bellvitgehospital.cat

Introducción

El diagnóstico rápido y sensible de la enfermedad tuberculosa (TB) y de la multirresistencia (MDR) son dos de los pilares básicos en el control mundial de la tuberculosis. Recientemente, se ha desarrollado un sistema automático y rápido (<90 min) de PCR a tiempo real (STANDARD™ M10 MDR-TB) que integra la extracción del ADN, la amplificación genómica (PCR), la detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) y la resistencia a la rifampicina (RMP; gen *rpoB*) e isoniazida (INH; genes *KatG* e *inhA*) en un mismo cartucho de reacción.

Objetivo

Evaluar la capacidad y fiabilidad del sistema STANDARD™ M10 MDR-TB (M10) para el diagnóstico rápido de la tuberculosis y de la posible multirresistencia en muestras clínicas en un área con baja prevalencia de TB.

Material y método

Se estudiaron un total de 100 muestras clínicas de origen respiratorio, todas sometidas a un proceso de descontaminación. La mayoría de ellas habían sido congeladas previamente (n = 75), 65 con cultivo positivo de MTBC (4 resistentes a la INH y 2 resistentes a la INH y RMP) y 10 con micobacterias no tuberculosas (MNT).

En una segunda fase se seleccionaron para su análisis 25 muestras clínicas frescas con baciloscopia o PCR positiva de muestra directa mediante un método distinto. De estas, 22 presentaron cultivo positivo de MTBC (1 resistente a la INH) y en 3 se aisló una MNT. En todas las muestras se realizó: tinción de Ziehl-Neelsen, cultivos sólidos (Lowenstein-Jensen) y líquidos (7H9) en sistemas automatizados, detección directa con el sistema M10 y pruebas de sensibilidad a la INH y RMP con el BACTEC MGIT960.

Resultados

Del conjunto de las muestras congeladas, el M10 detectó material genético de MTBC en el 92% (60/65) de las muestras con cultivo positivo de MTBC, logrando un 100% de detección en las muestras con baciloscopia positiva. Se detectó MTBC en el 94% (49/52) de los esputos y el 85% (11/13) de las muestras broncoscópicas. En 4 de las 5 muestras con PCR negativa, el cultivo fue positivo a los 42 días. Las muestras con M10 positivo tuvieron un tiempo de crecimiento significativamente menor que las muestras con M10 negativo (media: 11 días vs. 22,6 días; p <0,0001). En todas las muestras con aislamiento de MNT, el M10 fue negativo.

Respecto a las muestras con MTBC resistentes a la RMP (n = 2) y/o INH (n = 6), el M10 fue positivo en la detección de MTBC en el 100% (6/6) de las muestras; pero la resistencia geno-

Tabla 1. Resultados de la detección de MTBC y resistencia a RMP e INH en las muestras con cultivo positivo para MTBC. Detección de sensibilidad: completa (resultado para INH y RIF), parcial (resultado sólo para INH o RIF) o indeterminada (indeterminada para INH y RIF).

	Detección de MTBC	Detección de resistencia antibiótica		
		Completa	Parcial	Indeterminada
Muestras congeladas				
Cepas RMP-R (n = 2)	2	0	NA	2
Cepas INH-R (n = 6)	6	3	NA	3
Baciloscopia negativa (n = 22)	17	8	1	8
Baciloscopia positiva (n = 43)	43	39	2	2
Total (n = 65)	60	47	3	10
Muestras frescas				
Cepas INH-R (n = 1)	1	1	NA	0
Baciloscopia negativa (n = 4)	3	0	0	3
Baciloscopia positiva (n = 18)	18	17	1	0
Total (n = 22)	21	17	1	3

típica sólo pudo detectarse en aquellas cepas con mayor carga bacilar: se detectó resistencia a INH en 3 de las 6 cepas resistentes. En el resto de cepas no se pudo determinar la resistencia antibiótica por PCR, obteniendo un resultado indeterminado (Tabla 1).

Hubo además 10 muestras con crecimiento de MTBC sensible a la INH y RMP en las que no se pudo determinar la sensibilidad antibiótica por PCR: en 8 casos el resultado fue indeterminado para ambos antibióticos y en 2 casos se pudo determinar la sensibilidad a la INH pero no a la RMP.

En las muestras en las que sí se pudo determinar la sensibilidad o resistencia antibiótica por PCR (47/65), hubo un 100% de concordancia con pruebas fenotípicas, obteniendo una especificidad del 100%.

Para evaluar el rendimiento del M10 en muestras clínicas frescas, se analizaron 25 descontaminadas recientemente. De nuevo, el M10 fue negativo en todas las muestras con aislamiento de MNT (3/3). Se detectó material genético de MTBC en el 95,5% (21/22) de las muestras con cultivo positivo de MTBC. El M10 identificó correctamente la única cepa resistente a INH y todas las cepas clasificadas como sensibles por PCR fueron confirmadas por antibiograma. En 4 muestras (con crecimiento de MTBC sensible) no se pudo determinar la resistencia antibiótica por PCR: en 3 muestras con baciloscopia negativa fue indeterminado tanto el resultado para los genes implicados en la resistencia a RMP como a INH, y en una muestra con baciloscopia positiva sólo el resultado de la resistencia a INH fue indeterminado.

Conclusiones

El sistema STANDARD™ M10 MDR-TB ha demostrado ser un sistema de detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* sencillo, muy rápido, específico y bastante sensible a partir de muestras clínicas respiratorias. Además, permite la detección simultánea de genes implicados en la resistencia a la rifampicina e isoniacida, si bien su sensibilidad no alcanza la de los niveles de detección del microorganismo, y en especial, en las muestras paucibacilares.

Globalmente, no se observaron diferencias en el rendimiento del sistema M10 a partir de muestras clínicas frescas o congeladas. Las variaciones de los resultados observados con esta plataforma, probablemente están condicionadas por las diferentes cargas bacilares de las muestras incluidas en el estudio. Actualmente el sistema ha sido probado con muestras descontaminadas, y tal vez el uso de muestra clínica directa podría mejorar el rendimiento de esta técnica. Con todo, en más de tres cuartas partes de las muestras con baciloscopia negativa (paucibacilares), MTBC fue detectado mediante este sistema y la sensibilidad alcanzó el 100% en los casos con baciloscopia positiva. Esto subraya el valor del M10 como una buena herramienta diagnóstica de tuberculosis, pudiendo tener un valor añadido en la detección de la sensibilidad genotípica a la INH y RMP en determinadas circunstancias.

Comparación entre el aspirado bronquial y el lavado broncoalveolar en el diagnóstico de la TB pulmonar

María Teresa Tórtola Fernández

Unidad de Micobacterias. Servicio de Microbiología. Hospital Vall d'Hebron. Barcelona.

Correspondencia:

M. Teresa Tórtola

E-mail: mariateresa.tortola@vallhebron.cat

Introducción

La detección microbiológica de la tuberculosis (TB) es fundamental porque permite diagnosticar correctamente a los pacientes e iniciar el tratamiento más eficaz y lo antes posible.

El esputo es la muestra más frecuentemente utilizada para realizar el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar. El problema surge cuando el paciente no expectora o no se puede obtener un esputo de la calidad adecuada para realizar el diagnóstico. En estos casos se puede recurrir al esputo inducido, o a técnicas más invasivas como el aspirado gástrico o a las muestras obtenidas por técnicas broncoscópicas como el aspirado bronquial (BAS) y el lavado broncoalveolar (LBA).

Nuestro objetivo principal fue comparar el rendimiento diagnóstico del BAS y del LBA en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar y como objetivo secundario evaluar el rendimiento diagnóstico del BAS y del LBA para las micobacterias no tuberculosas (MNT).

Material y método

Durante los años 2022 y 2023 a todos los pacientes adultos provenientes del Servicio de Neumología del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona con sospecha de TB pulmonar y con baciloscopia negativa o con esputo escaso se les recogió un BAS y un BAL. Tanto al BAS como al LBA se les realizó tinción de auramina y Ziehl-Neelsen para comprobar la positividad de la tinción fluorescente, cultivo en BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson Diagnostic Instrument System, Baltimore, MD) y el ensayo Xpert MTB/RIF Ultra (Xpert ultra) (Cepheid, Sunnyvale, CA). El cultivo se consideró el *gold standard*.

Resultados

El total de muestras estudiadas fue de 443. La edad media de los pacientes fue de 58 años, y 190 (42,8%) fueron mujeres y 253 hombres (57,1%) con una media de edad de 57 y 58 años respectivamente.

El número total de muestras con cultivo positivo a *M.tb* fue de 14, el total de Xpert ultra positivos a *M.tb* complex fue de 16 y por último, el total de muestras con diagnóstico microbiológico positivo para *M.tb* (con cultivo y/o Xpert ultra positivos a *M.tb*) fue de 17.

El porcentaje de muestras con cultivo positivo a *M.tb* fue un 21,4% superior en las muestras de BAS con respecto a las muestras del LBA, sin embargo, este incremento no es significativo porque los límites del intervalo de confianza incluyen el valor cero.

En las muestras con diagnóstico microbiológico positivo para *M.tb* (con cultivo y/o Xpert RIF/MTB ultra positivos a *M.tb*) el porcentaje del BAS fue un 11,4% superior con respecto al LBA (58,8%, 10/17), sin embargo, este incremento no es significativo porque los límites del intervalo de confianza incluyen el valor cero.

El número total de muestras con cultivo positivo a MNT fue de 7, los cultivos positivos para el BAS y el LBA fue de 7 (100%) y 4 (57,1%) respectivamente.

Conclusión

Con el BAS se obtuvo un mejor rendimiento diagnóstico que con el LBA tanto en los pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar como en la infección respiratoria por una micobacteria no tuberculosa.

Aspectos destacados, resultados y lecciones del proyecto SMA-TB

Cristina Vilaplana^{1,2,3,4}, en representación del Consorcio SMA-TB

¹Unitat de Tuberculosi Experimental (UTE). Germans Trias i Pujol Foundation & Hospital (IGTP-HUGTIP). Can Ruti Campus. Badalona. Barcelona. ²Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. Barcelona. ³Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES). Madrid. ⁴Microbiology Department. Northern Metropolitan Clinical Laboratory. Hospital Universitari "Germans Trias i Pujol". Badalona. Barcelona.

Correspondencia:

Cristina Vilaplana

E-mail: cvilaplana@igtp.cat

La investigación biomédica enfrenta crecientes desafíos debido a su complejidad y altos costos. El acceso rápido y exhaustivo a la literatura, junto con las herramientas de colaboración remota y los avances tecnológicos, ha facilitado la realización de proyectos más ambiciosos. Para financiar estos proyectos, es habitual recurrir a múltiples fuentes de financiación. Los programas públicos de la Comisión Europea (CE) representan una oportunidad clave, ya que no solo cubren gastos esenciales sino que también proporcionan un entorno para crear redes de colaboración que suelen perdurar más allá del proyecto. Sin embargo, estas convocatorias son extremadamente competitivas, y solo alrededor del 10% de las propuestas logran financiación, requiriendo una preparación intensiva de varios meses. El consorcio SMA-TB, formado por 9 instituciones de 7 países, fue uno de los afortunados en obtener una subvención Horizon 2020. El proyecto se organiza en tres paquetes de trabajo científicos, cada uno vinculado a un objetivo específico. Partiendo de la hipótesis de que la hiperinflamación causa daño pulmonar y se asocia a peores resultados, evaluamos dos antiinflamatorios como coadyuvantes del tratamiento estándar^{1,2}. Aunque habíamos preparado la documentación con antelación, la pandemia de COVID-19 retrasó las aprobaciones éticas en dos meses, lo que nos llevó a iniciar el ensayo ocho meses más tarde de lo previsto. Además, la reducción global de casos de tuberculosis debido a la pandemia afectó el reclutamiento de participantes. Aun así, gracias a un esfuerzo adaptativo considerable, logramos superar el 50% de reclutamiento requerido por la CE, alcanzando un 67% y obteniendo una colección de más de 18.000 muestras de 223 pacientes con datos asociados. Actualmente estamos analizando los resultados. En cuanto al segundo paquete de trabajo, identificamos 12 determinaciones clave (del patógeno y del huésped) relevantes para evaluar la evolución del tratamiento y discriminar entre pacientes con buen y mal pronóstico, validando clínicamente tres pruebas. Hasta la fecha, este paquete ha generado 10 publicaciones científicas y varios protocolos³. Para el tercer paquete de trabajo, partimos de la premisa de que un algoritmo capaz de predecir la respuesta al tratamiento o el resultado final sería crucial para el control de la tuberculosis. Desarrollamos una

estrategia de estratificación utilizando enfoques de biología de sistemas y ciencia de datos. Hasta ahora, hemos identificado 14 biomarcadores moleculares que permiten discriminar entre respondedores y no respondedores a las terapias dirigidas contra el huésped, y estamos avanzando en la definición detallada del algoritmo médico.

A tres meses del cierre del proyecto, los beneficios son claros. Se ha fortalecido la capacidad investigadora mediante la incorporación y formación de personal, la publicación de artículos de acceso abierto y el desarrollo de protocolos para la difusión del conocimiento, accesibles en Zenodo⁴. La validación clínica de tres pruebas y la identificación de biomarcadores clave aportan mejoras inmediatas a la gestión clínica, mientras que los datos sobre tuberculosis multiresistente han contribuido al desarrollo de sistemas de salud más resilientes en Sudáfrica y Georgia. Los impactos socioeconómicos incluyen un aumento del empleo y una mejor comprensión del estado socioeconómico de los pacientes con tuberculosis. En el ámbito tecnológico, se ha reforzado el liderazgo europeo en ensayos clínicos multicéntricos. Además, se han identificado marcadores para estudios futuros y se ha fortalecido la colaboración dentro y fuera de Europa, lo que posiciona al consorcio para nuevas solicitudes de subvención y la explotación de los resultados obtenidos. En conjunto, el proyecto presenta un balance altamente positivo, destacando por su impacto científico, social y tecnológico, con perspectivas prometedoras a futuro.

Bibliografía

1. Vilaplana C, Martinson N, Vashakidze S. Adjunctive Acetylsalicylic Acid and Ibuprofen for Tuberculosis (SMA-TB). <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04575519> (2020).
2. Arias L, Otwombe K, Waja Z, Tukvadze N, Korinteli T, Moloantsoa T, *et al*. SMA-TB: study protocol for the phase 2b randomized double-blind, placebo-controlled trial to estimate the potential efficacy and safety of two repurposed drugs, acetylsalicylic acid and ibuprofen, for use as adjunct therapy added to, and compared with, the standard WHO recommended TB regimen. *Trials*. 2023 Jun 28;24(1):435. doi: 10.1186/s13063-023-07448-0.
3. CORDIS European Commission. SMA-TB project CORDIS webpage. <https://cordis.europa.eu/project/id/847762> (2020).
4. SMA-TB H2020-funded project repository. Available at: <https://zenodo.org/communities/sma-tb>