

MESA II: TESIS DOCTORALES

Moderadores: **Josep Maria Miró.** Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Clínic Barcelona-IDIBAPS. Universitat de Barcelona. RAMC Barcelona. CIBERINFEC, Madrid.
Fernando Alcaide. Servei de Microbiologia. Hospital de Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat.

Estudio de marcadores pulmonares y sistémicos para la caracterización de la respuesta inmune frente a *Mycobacterium tuberculosis* en ratones y humanos

Sergio Díaz

Instituto de Investigación Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona.

Correspondencia:

Sergio Díaz

E-mail: sdfp96@gmail.com

La tuberculosis (TB) es una de las principales causas de muerte mundial provocadas por un patógeno infeccioso. Es necesario tener mayor conocimiento sobre la respuesta inmune contra el agente etiológico de la enfermedad, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), para mejorar el diagnóstico y la terapia. Esta tesis explora la presencia de biomarcadores de protección y enfermedad en muestras de sangre periférica y pulmón, investigando cambios en la expresión de biomarcadores celulares o en la presencia de poblaciones celulares tras la con Mtb.

Este trabajo combina proyectos que analizan datos de muestras humanas y de ratón. Las muestras de sangre humana, provenientes de individuos con infección latente o enfermedad tuberculosa al inicio y al final del tratamiento, permitieron estudiar mediante citometría de flujo convencional la expresión de biomarcadores de maduración y activación celular en linfocitos tras su re-exposición a antígenos micobacterianos. Los resultados demuestran que los niveles de expresión de estos biomarcadores son capaces de caracterizar la infección latente por tuberculosis y la enfermedad tuberculosa, y se correlacionan con el éxito del tratamiento, confirmando su gran potencial como biomarcador de la TB.

Las muestras de ratón consistieron en sangre y tejido pulmonar de un modelo de infección tuberculosa por exposición inhalatoria en ratones C57BL/6J. Mediante citometría espectral, estudiamos de forma exhaustiva la respuesta inmune local

y sistémica. Nuestros datos muestran una acumulación en el parénquima pulmonar de un subconjunto protector de células linfocitos T de memoria residentes tras la infección. Este tejido también está vinculado a un menor estado inflamatorio, revelado por el perfil de citoquinas de los linfocitos CD4 y la presencia de otros grupos celulares. Adicionalmente, los análisis multiparamétricos no supervisados destacan la alta compartimentalización de la respuesta inmune después de la vacunación con BCG, desencadenando actividad proinflamatoria de células Th17 en sangre y un aumento de células B activadas, en el pulmón. Este estudio también revela que la exposición de BCG al líquido alveolar humano previa a la vacunación potenció aún más algunos de los mecanismos inmunitarios ya inducidos por la vacunación convencional.

Esta tesis incluye además un capítulo dedicado a la caracterización del sistema inmunológico en condiciones fisiológicas de un nuevo modelo murino, el *Collaborative Cross* (CC), que permite estudiar las contribuciones genéticas a la susceptibilidad a Mtb y los mecanismos de protección de la vacuna BCG, revelando su alta heterogeneidad y una presencia generalmente menor de poblaciones de células inmunes maduras y activas en comparación con los ratones C57BL/6J. Estos hallazgos subrayan el potencial de los ratones CC para abordar la resistencia a enfermedades y la eficacia de las vacunas en estudios futuros de TB, explorando una selección de cepas CC de interés. Los estudios descritos en esta

tesis contribuyen al conocimiento en el campo del diagnóstico y la inmunología de la TB.

Bibliografía recomendada

1. Díaz-Fernández S, Villar-Hernández R, Stojanovic Z, Fernández M, Galvão MLS, Tolosa G, *et al.* Study of CD27, CD38, HLA-DR and Ki-67 immune profiles for the characterization of active tuberculosis, latent infection and end of treatment. *Front Microbiol.* 2022;13:885312. doi: 10.3389/fmicb.2022.885312.
2. Díaz-Fernández S, Aleluia M, Saraiva M, Soldevilla P, Torrelles J, Sharan R, *et al.* The study of immunological markers in tuberculosis across animal models and its translation to human research. *LabAnimal*, 2025. Ahead of Print.

Dinámica epidemiológica de la tuberculosis entre las prisiones y la comunidad

Guillermo Sequera

Cátedra de Salud Pública. Universidad Nacional de Asunción. Paraguay. Unidad de Investigación en Tuberculosis de ISGlobal. Barcelona.

Correspondencia:

Guillermo Sequera

E-mail: guillesequera@gmail.com

Introducción

La creciente concentración del problema de la tuberculosis (TB) dentro de las cárceles de Paraguay resalta la urgencia de focalizar estrategias para interrumpir la transmisión y prevenir nuevas infecciones dentro y fuera de los centros penitenciarios. Sin embargo, se conoce poco sobre la envergadura que juega esta concentración de TB en instituciones penitenciarias y su "derrame" al resto de la población fuera de las prisiones. En tal sentido, este trabajo cuantifica y describe las dinámicas del riesgo para desarrollar TB en prisión según diversos determinantes individuales y estructurales de los centros penitenciarios y cómo este riesgo persiste una vez que se sale de prisión, además de detallar filogenéticamente cómo se generan clústeres comunes entre la prisión y la comunidad.

Método y resultados

Primero se analizó una cohorte retrospectiva del Censo Nacional de Prisiones del año 2013, vinculándolo con registros de TB del Programa Nacional de TB (PNTB) del 2010 al 2021. Se utilizaron modelos de riesgos proporcionales de Cox para cuantificar el riesgo de TB durante y después del encarcelamiento e identificar

factores de riesgo intrínsecos de la prisión y del individuo. El 16,0 % (451/2.810) personas desarrollaron TB. El 9,3% (262/2.810) de los casos de TB ocurrieron durante el encarcelamiento. El 6,7% (189/2.810) de los casos de TB ocurrieron fuera del centro penitenciario. El Hazard Ratio (HR) de desarrollar TB fue de 1,97 (95% IC 1,26-3,08) a los seis meses de ingreso a prisión y aumentó a 2,78 (95% IC 1,82-4,24) a los 36 meses o más. El HR de desarrollar TB aumentó con cada reingreso de 1,99 (IC 95 % 1,52-2,61) en el primer reingreso a 3,36 (IC 95 % 2,50-4,50) en el cuarto reingreso. El hacinamiento en los pabellones y celdas de la prisión se asoció con un mayor riesgo de TB. Después de la liberación, el riesgo de TB disminuyó considerablemente, pero se mantuvo 10 veces más alto que la tasa de incidencia en la población general hasta luego de 8 años de seguimiento posterior a la liberación^{1,2}.

Posteriormente se realizó una vigilancia genómica prospectiva, donde se secuenció el genoma completo de 471 muestras de *M. tuberculosis*, que correspondían a casos de TB dentro y fuera de prisiones de dos áreas urbanas de Paraguay: Asunción y Ciudad del Este, desde el 2016 al 2021. Se encontró evidencia genómica de transmisión reciente frecuente dentro de las prisiones y vínculos de transmisión que abarcan cárceles y poblaciones aledañas. Se identificó cómo los clústeres incluyen casos de TB de personas

que están en prisión, con otras fuera de prisión, ya sean estos ex privados de libertad o personas que nunca estuvieron en prisión³.

Conclusión

Los hallazgos resaltan la urgencia de fortalecer las estrategias de los programas de control de la TB que apunten a las prisiones, ya que en el Paraguay las prisiones son el motor de la epidemia, derramando su concentración de riesgo al resto de la comunidad⁴.

Bibliografía

1. Sequera G, Aguirre S, Estigarribia G, Cellamare M, Croda J, Andrews JR, et al. Increased incarceration rates drive growing tuberculosis

burden in prisons and jeopardize overall tuberculosis control in Paraguay. *Sci Rep.* 2020;10(1):21247. doi: 10.1038/s41598-020-77504-1.

2. Sequera G, Estigarribia-Sanabria G, Aguirre S, Piñanez C, Martínez L, López-Olarte R, et al. Excess tuberculosis risk during and following incarceration in Paraguay: a retrospective cohort study. *Lancet Reg Health Am.* 2024;31:100668. doi: 10.1016/j.lana.2023.100668

3. Sanabria GE, Sequera G, Aguirre S, Méndez J, Pereira dos Santos PC, Weiler Gustafson N, et al. Phylogeography and transmission of *Mycobacterium tuberculosis* spanning prisons and surrounding communities in Paraguay. *Nat Commun.* 2023;14:303. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-35813-9>

4. Sequera G, Aguirre S, Estigarribia G, Walter K, Horna-Campos O, Liu Y, et al. Incarceration and TB: the epidemic beyond prison walls. *BMJ Global Health.* 2024;9:e014722.

Análisis molecular y genómico de *Mycobacterium tuberculosis* y SARS-CoV-2 para caracterizar la diversidad intrapaciente y optimizar la vigilancia de la transmisión

Cristina Rodríguez

Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón. Madrid.

Correspondencia:

Cristina Rodríguez

E-mail: crisrg93@hotmail.com

El análisis molecular y genómico en microbiología nos ha permitido mejorar nuestro conocimiento de las infecciones y de su epidemiología. Este trabajo es el resultado de aplicar estas metodologías para dar respuesta a problemáticas surgidas del estudio de dos patógenos de alta relevancia, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y SARS-CoV-2.

En un primer bloque, abordamos la optimización de la epidemiología genómica en tuberculosis (TB) para una mejor comprensión de las dinámicas de transmisión. Nuestro enfoque de vigilancia en Almería, apoyado en la integración del análisis genómico evolutivo, y su discusión en un equipo de trabajo multidisciplinar, nos permitió proponer las causas más probables de crecimiento de determinadas cadenas de transmisión.

Así identificamos con mayor precisión los clústeres resultado de transmisión activa, recomendando priorizar su vigilancia. En la expansión de determinados clústeres, se identificaron reactivaciones tras exposiciones en el pasado y demoras diagnósticas, lo que condujo a recomendar diferentes intervenciones, adecuadas a estos hallazgos.

La utilidad de este enfoque nos exigía disponer precozmente del análisis genómico para orientar la investigación epidemiológica e intervenir de forma rápida. Con ese fin, se evaluó una nueva estrategia, apoyada en la secuenciación inmediata de cada nuevo caso de TB desde cultivos primarios, en plataforma de nanoporos.

Además, se diseñaron nuevas estrategias para la identificación de clústeres en entornos sin datos moleculares/genómicos

previos, de carácter poblacional. Esta aproximación descansaba en un cribado secuencial de tres etapas con poder discriminativo creciente, incluyendo métodos moleculares y genómicos mediante un uso racionalizado de los mismos. Esta estrategia permitió identificar de forma simplificada cadenas de transmisión en Madrid. A su vez, los datos genómicos obtenidos, permitieron identificar los SNPs marcadores de las cepas, para diseñar un sistema de vigilancia basado en secuenciación rápida de amplicones en plataforma de nanoporos. Su aplicación prospectiva y retrospectiva condujo a la identificación de candidatos a pertenecer a dos de esos clústeres.

En un segundo bloque, se analizó la diversidad de las poblaciones microbianas de determinados pacientes a lo largo de la infección. Primero, el análisis MIRU-VNTR de necropsias, procedentes de diferentes localizaciones anatómicas de casos de TB en Mozambique, permitió identificar diversidad clonal intrapaciente en un tercio de los mismos, identificando en proporciones similares infecciones mixtas y coexistencias de variantes clonales, derivadas de una cepa parental por fenómenos de microevolución. La mayoría de los casos con diversidad hubieran pasado desapercibidos si el análisis se hubiera restringido a la muestra respiratoria. Segundo, realizamos dos estudios poblacionales de reinfecciones por SARS-CoV-2 en Madrid, basados en datos

genómicos, lo que nos permitió asignar de manera precisa la carga que las reinfecciones tenían en nuestra población tanto en las primeras etapas de la pandemia como en la era Ómicron. La integración del contexto epidemiológico de las variantes circulantes en cada momento nos permitió asignar reinfecciones incluso en ausencia de la secuencia del primer episodio.

Bibliografía recomendada

1. Rodríguez-Grande C, Estévez A, Palomino-Cabrera R, Molero-Salinas A, Peñas-Utrilla D, Herranz M, *et al.* Gregorio Marañón Microbiology-ID COVID 19 Study Group. Early SARS-CoV-2 Reinfections Involving the Same or Different Genomic Lineages, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2023;29(6):1154-1161. doi: 10.3201/eid2906.221696. Epub 2023 May 2. PMID: 37130503; PMCID: PMC10202887.
2. Rodríguez-Grande C, Alcalá L, Estévez A, Sola-Campoy PJ, Buenestado-Serrano S, Martínez-Laperche C, *et al.* Gregorio Marañón Microbiology-ID COVID 19 Study Group. Systematic Genomic and Clinical Analysis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Reinfections and Recurrences Involving the Same Strain. *Emerg Infect Dis.* 2022;28(1):85-94. doi: 10.3201/eid2801.211952. Epub 2021 Nov 29. PMID: 34843661; PMCID: PMC8714233.
3. Rodríguez-Grande C, Hurtado JC, Rodríguez-Maus S, Casas I, Castillo P, Navarro M, *et al.* High within-host diversity found from direct genotyping on post-mortem tuberculosis specimens in a high-burden setting. *Clin Microbiol Infect.* 2021;27(10):1518.e5-1518.e9. doi: 10.1016/j.cmi.2021.05.038. Epub 2021 Jun 11. PMID: 34119641.

Nuevas estrategias de tratamiento para las infecciones respiratorias crónicas causadas por micobacterias no tuberculosas y otras bacterias prevalentes

Lara Muñoz Muñoz

Departamento de Microbiología, Pediatría, Radiología y Salud Pública, Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza.

Correspondencia:

Lara Muñoz Muñoz

E-mail: laramm@unizar.es

La incidencia de infecciones respiratorias crónicas causadas por micobacterias no tuberculosas está aumentando a nivel mundial y representa una importante carga sanitaria. Las micobacterias no tuberculosas, en particular *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, y *Mycobacterium kansasii* se encuentran entre los patógenos más prevalentes y que causan mayor preocupación.

El tratamiento de estas infecciones pulmonares supone un verdadero desafío debido a la gran resistencia intrínseca de las micobacterias ocasionada principalmente por su gruesa pared celular, así como por su capacidad para formar biopelículas. Estas características limitan gravemente las opciones terapéuticas, lo que hace urgente el desarrollo de nuevos compuestos antimico-

bacterianos y regímenes de tratamiento más efectivos dirigidos tanto a bacterias planctónicas como a biopelículas.

Existen dos estrategias principales para desarrollar nuevos agentes antimicobacterianos. El reposicionamiento de fármacos, que implica identificar nuevos usos para fármacos existentes ya validados para otras aplicaciones médicas, esta estrategia permite reducir costes y plazos de desarrollo del fármaco. La segunda estrategia consiste en el desarrollo de fármacos de novo, que consiste en descubrir nuevas entidades químicas, este proceso es más largo y costoso.

Ambas estrategias han sido utilizadas en esta Tesis Doctoral. Tras un exhaustivo cribado de compuestos β -lactámicos, amoxicilina-clavulánico y cefadroxil, mostraron la mayor actividad in vitro frente a aislados clínicos de *M. kansasii*. Para un estudio más traslacional y con mayor aplicación clínica amoxicilina-clavulánico y cefadroxil se evaluaron en combinación con el tratamiento habitualmente empleado en infecciones por *M. kansasii* (rifampicina, etambutol y claritromicina). Ambos compuestos mostraron interacciones favorables con los actuales fármacos del tratamiento y mejoraron el tratamiento al incluirse como cuarto fármaco¹.

Las lactonas macrocíclicas, ampliamente utilizadas como antiparasitarias, demostraron actividad in vitro frente a *M. abscessus* y otras micobacterias no tuberculosas. Siendo milbemicina oxima y selamectina los compuestos más prometedores. Dado el papel crucial de las biopelículas en las infecciones respiratorias crónicas, la actividad antibiopelícula de estos compuestos fue testada, mostrando buena actividad tanto en condiciones planctónicas como en biopelícula. La combinación de milbemicina oxima con los fármacos habitualmente empleados en los tratamientos frente a *M. abscessus* (claritromicina y amikacina) resultó esterilizante².

Gracias a una colaboración internacional, en esta Tesis se ha contribuido a la identificación de una molécula de novo síntesis llamada VOMG, con actividad bactericida y antibiopelícula frente a *M. abscessus* y otras micobacterias no tuberculosas. Esta nueva molécula ha sido patentada (Patente:P2458IT) y su novedoso mecanismo de acción, basado en la inhibición de la división celular bacteriana, ha sido elucidado durante el desarrollo de esta tesis³. Actualmente se está analizando el papel de VOMG en las combinaciones terapéuticas.

En resumen, esta Tesis Doctoral aporta enfoques innovadores para el desarrollo de nuevas terapias frente a micobacterias no tuberculosas con un alto potencial de aplicación en la práctica clínica. Dado que la terapia combinada, generalmente basada en tres fármacos, es la piedra angular del tratamiento actual de micobacterias es fundamental evaluar no sólo los compuestos individualmente sino también las combinaciones. Esta Tesis contribuye a la optimización de modelos in vitro de biopelículas, que aún carecen de protocolos estandarizados.

Bibliografía

1. Muñoz-Muñoz L, Ainsa JA, Ramón-García S. Repurposing β -Lactams for the Treatment of *Mycobacterium kansasii* Infections: An In Vitro Study. *Antibiotics* (Basel). 2023;12(2):335. doi: 10.3390/antibiotics12020335. PMID: 36830246; PMCID: PMC9952313.
2. Muñoz-Muñoz L, Shoen C, Sweet G, Vitoria A, Bull TJ, Cynamon M, et al. Repurposing Avermectins and Milbemycins against *Mycobacteroides abscessus* and Other Nontuberculous Mycobacteria. *Antibiotics* (Basel). 2021;10(4):381. doi: 10.3390/antibiotics10040381. PMID: 33916775; PMCID: PMC8066277.
3. Degiacomi G, Chiarelli LR, Riabova O, Loré NI, Muñoz-Muñoz L, Recchia D, et al. The novel drug candidate VOMG kills *Mycobacterium abscessus* and other pathogens by inhibiting cell division. *Int J Antimicrob Agents*. 2024;64(4):107278. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2024.107278. Epub 2024 Jul 26. PMID: 39069229.