

Sesión 5: Infecciones por micobacterias

066

TUBERCULOSIS E INMIGRACIÓN EN LA REGIÓN DE MURCIA: 1994-2006

M.J. Del Amor, C. Salvador, P. Paredes y M. Segovia
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia.

Introducción: El importante fenómeno de la inmigración que se está viviendo en toda España es especialmente acusado en la región de Murcia. Este hecho incide en la epidemiología de la tuberculosis de un modo todavía sin precisar en su totalidad, y que está exigiendo un gran esfuerzo de adaptación de nuestro sistema sanitario a esta nueva realidad.

Material y métodos: Se han revisado retrospectivamente las historias clínicas de los enfermos tuberculosos confirmados microbiológicamente en el período 1994-2006.

Resultados: En el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia la presencia de inmigrantes enfermos de TBC confirmada microbiológicamente fue anecdótica hasta 1998: 4 enfermos de un total de 260 (1,5%) en el período 1994-1998. En 1999 se produjo un brusco aumento del número de inmigrantes con TBC: 6 enfermos de un total de 34 (17,6%) y desde entonces esa tendencia al alza se ha mantenido, hasta llegar a más del 50% en el período 2005-2006. Las zonas geográficas de origen de estos enfermos reflejan la evolución de la inmigración en el período estudiado. Entre los años 1994 y 1998 los cuatro enfermos de origen extranjero diagnosticados procedían del Magreb. En la actualidad la procedencia es la siguiente: Magreb, 46%; Latinoamérica, 45%; Europa del Este, 5%; Asia, 3%; África Subsahariana, 1%.

Discusión: Los datos expuestos reflejan una nueva situación de la tuberculosis en nuestra región, ya que esta pobla-

ción inmigrante presenta algunas características que dificultan el control de esta enfermedad, siendo las más destacadas las siguientes: 1) Es difícil obtener información fidedigna acerca de los antecedentes personales, ya sea por desconocimiento, por ocultación voluntaria o por dificultades idiomáticas. 2) El patrón de sensibilidad a tuberculostáticos de las cepas de *M. tuberculosis* aisladas en esta población refleja en gran medida el de sus países de origen, lo que ha dado lugar a un aumento de las resistencias primarias. 3) Con mucha frecuencia estos enfermos viven en condiciones de hacinamiento, factor que facilita la transmisión. 4) La gran movilidad geográfica de muchos de estos enfermos dificulta tanto el estudio de contactos como el control del enfermo a lo largo del tratamiento y la comprobación de su curación. Ante esta situación es necesario realizar un esfuerzo coordinado que permita interrumpir la cadena epidemiológica de la TBC mediante el diagnóstico precoz de los enfermos bacilíferos y su adecuado tratamiento.

067

EMERGENCIA DE ESPECIES INUSUALES DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EN EL ÁREA DE INFLUENCIA DEL DEPARTAMENTO DE SALUD 5 DE LA COMUNIDAD VALENCIANA

R. Guna¹, M.R. Navarro², O. Fraile¹, D. Navalpotro¹, A. Garay¹, C. Mallea¹ y R. Borrás¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina y Hospital Clínico Universitario. Valencia. ²Laboratorio de Microbiología, Hospital de Orihuela. Orihuela, Alicante.

Introducción: En el seno del complejo *Mycobacterium tuberculosis* se incluyen varias especies, algunas de las cuales son poco prevalentes. Con la finalidad de conocer la frecuencia y distribución de las especies de este complejo aisladas en un Hospital Terciario, se ha realizado un estudio retrospectivo sobre su aislamiento en el período comprendido entre Enero de 2001 y Junio de 2006.

Material y métodos: Se procesaron 36.223 muestras clínicas que, previa descontaminación con N-acetil-cisteína NaOH y centrifugación, fueron inoculadas en medio de Lowenstein-Jensen con y sin piruvato, y en MGIT. Los medios de cultivo fueron incubados a 37°C en atmósfera convencional y en el Sistema BACTEC MGIT 960 durante 60 y 45 días, respectivamente. La identificación de los aislados se realizó mediante métodos convencionales y moleculares (Gen Probe, bioMérieux; Genotype MTBC, Hain Lifescience).

Resultados: Durante el período de estudio se obtuvieron 3.022 (8,2%) cultivos positivos de 1.272 pacientes, que fueron identificados como pertenecientes a 19 especies diferentes. La proporción de *M. tuberculosis* complex frente a las micobacterias no tuberculosas fue de 2,6:1. Las especies más prevalentes fueron *M. tuberculosis* complex con 922 casos (72,5%), *Mycobacterium kansasii* (84 casos, 6,6%), *Mycobacterium avium* complex (74 casos, 5,8%). En el seno del complejo *M. tuberculosis* se diferenciaron cuatro especies: *M. tuberculosis*, 905/922 (98,2%); *M. bovis*, 11/922 (1,2%); *M. africanum* tipo 1 3/922 (0,3%); *M. caprae*, 3/922 (0,3%). Los primeros aislamientos de las dos últimas especies se obtuvieron en 2005. *M. caprae* se aisló de pacientes españoles: dos residentes en Orihuela, diagnosticados de tuberculosis pulmonar; uno de Valencia, con diagnóstico de escrofuloderma. Los tres casos de tuberculosis por *M. africanum* tipo 1, dos formas pulmonares y una ganglionar, correspondían a pacientes residentes en la ciudad de Valencia: dos españoles, uno de ellos afecto de SIDA con tuberculosis pulmonar y otro con adenitis tuberculosa, y un senegalés con tuberculosis pulmonar.

Conclusiones: Los resultados obtenidos demuestran la emergencia de infecciones tuberculosas por *M. africanum* tipo 1 y *M. caprae* en el área de influencia del Departamento de Salud 5 de la Comunidad Valenciana.

068

IMPACTO DE LA INMIGRACIÓN EN LOS CASOS DECLARADOS DE TUBERCULOSIS EN UN SERVICIO DE MEDICINA INTERNA: REVISIÓN RETROSPECTIVA 1995-2006

B. Consola*, M. Ribell*, G. Planeéis**, M. Mijana*, A. Almuedo*, R. Acal*, E. Ferrer* y J. Cuquet*
 *S. Medicina Interna, **Medicina Familiar y Comunitaria.
 Hospital General de Granollers. Granollers (Barcelona).

Objetivos 1. Determinar procedencia y número de casos identificados de tuberculosis en los últimos 10 años en nuestro medio, 2. Comparar las características clínicas, epidemiológicas y evolutivas de la enfermedad entre los casos autóctonos y los casos existentes en la población inmigrada en el período 1995-2006.

Material y métodos: Estudio retrospectivo de una cohorte histórica de pacientes declarados como Tuberculosis, en un Servicio de Medicina Interna de un hospital comarcal con área geográfica fuertemente receptora de inmigración, en el período comprendido entre Enero de 1995-abril de 2006. (Comparaciones realizadas mediante el estadístico exacto de Fisher).

Resultados: Durante el período 1995-2006, 371 pacientes fueron diagnosticados de tuberculosis (24% en población procedente de África (47%), Latinoamérica, Asia y Europa Oriental) En el 6% de los casos se asociaba un factor inmunosupresor (41% HIV +); sin diferencias significativas entre población inmigrante y autóctona. Entre 1995-2001 se diagnosticaron 231 casos de TBC, el 14% en población inmigrante. Entre 2002 y 2006, el diagnóstico se realizó en 140 casos (el 41% en inmigrantes), estadísticamente significativo respecto al período anterior ($p < 0,005$). Durante el período 1999-2006 ($N = 225$), en el 25% de los casos el diagnóstico fue de TBC extrapulmonar (22 casos en el grupo autóctono y 35 en el grupo inmigrante); representando la localización extrapulmonar el 45% de TBC diagnosticadas en población inmigrante y el 15% de las diagnosticadas en población autóctona ($p < 0,005$). Realizaron un seguimiento incompleto el 16% de pacientes en el grupo autóctono y el 48% en el grupo inmigrante.

Discusión: La inmigración, desde países en vías de desarrollo es un fenómeno reciente. El 13,5% de la población actual de nuestra población es inmigrante extracomunitario siendo el área de influencia de nuestro hospital uno de los lugares con más porcentaje de población extranjera de la provincia de Barcelona, creciente desde el año 2002.

Conclusiones: 1. La tuberculosis en inmigrantes es un fenómeno de reciente aparición en nuestro medio, que ha aumentado de forma extraordinaria a partir del año 2002. 2. Los inmigrantes presentan mayor proporción de TBC extrapulmonares que la población autóctona 3. La tasa elevada de pacientes, especialmente en el grupo inmigrante, que no han completado el seguimiento o han hecho un tratamiento farmacológico irregular, nos obliga a buscar nuevas estrategias para conseguir un mejor cumplimiento terapéutico

069

TUBERCULOSIS GANGLIONAR. ESTUDIO DE UNA SERIE DE CASOS

J. Pinilla, L. Hurtado, M. Moreno, E. Millán, J. Mosquera y R. Daroca
 S. Medicina Interna. Hospital San Pedro. Logroño. La Rioja.

Introducción: La tuberculosis ganglionar (TBCG) es la forma más frecuente de afectación extrapulmonar. Su incidencia parece aumentar en España.

Objetivos: Descripción de la TBCG en nuestra comunidad en sus aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos, tratamiento y evolución.

Métodos: Revisión retrospectiva de los casos de TBCG diagnosticados en La Rioja en el período comprendido entre Ene-

ro-2000 y Julio-2006. Los casos se recogieron del registro epidemiológico. Consideramos casos de TBCG, los diagnosticados por: 1. microbiología; 2. sospecha clínica y estudio histológico compatible con TBC; 3. sospecha clínica y respuesta al tratamiento específico.

Resultados: Se diagnosticaron 35 casos de TBCG; 60% varones, mediana de edad de 29 años. El 40% eran españoles, 45,7% asiáticos y 11,4% africanos. El tiempo medio de los extranjeros en España fue de $3,5 \pm 1,9$ años. 4 pacientes estaban infectados por el VIH. El 71% no tenían factores predisponentes. Localización: cervical y supraclavicular 74,5%, axilar 8,8%, mediastínica 5,9%. 94% unilateral. Síntomas más frecuentes: tumoración palpable 91%, fiebre 39%. Mantoux+ 81% de los realizados. La punción aspiración fue diagnóstica en 11/13 casos; la biopsia en 27/28. El diagnóstico fue microbiológico en 56% e histológico en 44%. Tratamiento con 3 tuberculostáticos 34/35 pacientes. Se completó seguimiento en 24 pacientes: curación en 23 y 1 fallecimiento, no relacionado con la TBC. Duración tratamiento 6 meses 75%, superior en el resto. Crecimiento paradójico adenopático tras inicio del tratamiento 2 pacientes y supuración en 3. Ningún caso requirió resección quirúrgica. Los pacientes infectados por VIH evolucionaron favorablemente.

Conclusiones: 1) La TBCG afecta mayoritariamente a pacientes originarios de países en vías de desarrollo, con varios años de residencia en España. 2) Predomina la localización cervical unilateral. 3) Se pudo realizar diagnóstico histológico o microbiológico en el 100%. 4) El rendimiento de la punción aspiración es muy alto. 5) La evolución es favorable casi siempre. 6) A diferencia de otras series, la supuración o el crecimiento paradójico de las adenopatías es poco frecuente. 7) No se precisó resección quirúrgica en ningún caso.

070

LINFADENITIS TUBERCULOSA EN UN HOSPITAL UNIVERSITARIO. ANÁLISIS DE 2 PERÍODOS: 1990-1999 Y 2000-2006

F. Sánchez¹, J.L. López-Colomé², J.L. Gimeno-Bayón², R.C. Güerri², G. Vallecillo² y J.A. Caylà¹

¹S. Epidemiología. Agencia de Salud Pública de Barcelona. ²S. M. Interna y Enfermedades Infecciosas. Hospital del Mar. Barcelona.

Introducción y objetivo: La linfadenitis tuberculosa (LT), considerada una enfermedad infantil en la era pre-quinotérapica, muestra un pico de incidencia entre los 20 y 40 años y, en países con endemias bajas, es más frecuente en inmigrantes. En los pacientes sin infección VIH, la LT es una entidad crónica e insidiosa, habitualmente localizada en el área cervical, mientras que en los infectados por el VIH, la LT suele ser diseminada y se acompaña de fiebre y síndrome tóxico. El objetivo de este estudio es evaluar las diferencias epidemiológicas de los pacientes con LT diagnosticados antes y después de 2000 en el Hospital del Mar de Barcelona.

Métodos: Estudio comparativo de los pacientes con LT microbiológicamente documentada, diagnosticados en dos períodos consecutivos: 1990-99 y 2000-06. Se evaluó la incidencia, las características demográficas, el tratamiento y la mortalidad. El diagnóstico de certeza se estableció por aislamiento de *M. tuberculosis* en cultivo y/o por PCR en muestra de tejido obtenidos por PAAF o biopsia.

Resultados: Se diagnosticaron 122 episodios de LT entre 1990 y 1999 y 133 entre 2000 y 2006, que significan el 4% y el 20% de todas las tuberculosis declaradas en cada período, respectivamente. De los 122 casos del primer período, 105 (86%) fueron autóctonos (92% de ellos VIH+) y 17 inmigrantes (24% VIH+). De los 133 del segundo, 99 (74%) fueron inmigrantes (14% de ellos VIH+) y 34 autóctonos (85% VIH+). Al comparar ambos períodos, no se observaron diferencias en la edad, porcentaje de varones y tratamiento con 3 o 4 fármacos. La mortalidad global del primer período fue del 64% (100% VIH+). No falleció ningún paciente en el segundo período. Tras ajustar para serostatus VIH, el riesgo relativo de

LT en inmigrantes frente a autóctonos fue de 9,03 (IC 95% 5,35-15,25, $P < 0,00001$).

Conclusiones: Aunque al comparar los dos períodos de estudio, se observa una disminución en el número total de pacientes VIH+ con LT diagnosticados en el Hospital del Mar, la incidencia de esta infección oportunista sigue siendo muy elevada en nuestros pacientes VIH+ (92% y 85% antes y después de 2000, respectivamente). En los inmigrantes, sin embargo, la LT se mantiene todavía como una patología relativamente frecuente en individuos no infectados por el VIH.

071

TUBERCULOSIS ÓSEA: CRUZANDO FRONTERAS

M. Mijana¹, M. Ribell¹, B. Consola¹, A. Almuedo¹, E. Ferrer¹, R. Acal¹, J. Cuquet¹ y E. Llargués¹

¹S. Medicina Interna. Hospital General de Granollers. Granollers.

Objetivos: 1. Conocer la prevalencia de afectación ósea en los pacientes diagnosticados de tuberculosis, en un servicio de medicina interna durante el período 2002-2006. 2. Descripción clínica y epidemiológica de los casos de espondilodiscitis tuberculosa hallados durante dicho período.

Material y métodos: Se revisaron de forma retrospectiva las historias clínicas de los pacientes diagnosticados de tuberculosis durante el período comprendido entre 2002-2006 en un hospital comarcal, analizando las características clínicas, epidemiológicas, iconográficas y de tratamiento de los casos de espondilodiscitis tuberculosa.

Resultados: Durante el período del 2002-2006, se revisaron 140 historias clínicas con el diagnóstico de tuberculosis (el 41% correspondía a población inmigrante). En el 30% de las cuales se constató afectación extrapulmonar; hallándose 7 casos de tuberculosis ósea (5% de todos los casos de tuberculosis diagnosticados y 17% de los casos extrapulmonares). El 66% eran varones con una edad media de 31,6 años (29-34 años). Todos los pacientes eran de origen africano, 5 procedían de África subsahariana (Senegal y Gambia) y 2 de Marruecos. Ningún paciente presentaba antecedentes patológicos relevantes. El motivo de consulta principal fue persistencia de dolor osteoarticular mecánico, de largo tiempo de evolución, acompañado de cuadro tóxico en dos pacientes y fiebre prolongada intermitente en tres de ellos. La localización fundamental fue a nivel lumbar. En el 100% de los pacientes había infección de partes blandas (músculo psoas). En tres casos había afectación pleuropulmonar concomitante, y en un caso afectación miliar, SNC, renal y ocular. Todos los pacientes fueron tratados con cuatro fármacos durante un año con seguimiento regular en todos ellos y mala evolución clínica en un caso. Dos casos precisaron tratamiento quirúrgico coadyuvante.

Conclusiones: La espondilodiscitis tuberculosa corresponde a un 5% de todos los casos de tuberculosis revisada. La tuberculosis ósea en nuestra serie afecta a adultos jóvenes, inmigrantes africanos, sin patología previa, que consultan por dolor osteoarticular mecánico. En la mayoría de ellos, existe un diagnóstico tardío. La evolución de la enfermedad es favorable si existe adherencia al tratamiento.

072

TUBERCULOSIS OSTEO-ARTICULAR. EXPERIENCIA DE 30 AÑOS EN UN HOSPITAL TERCIARIO

J. Fortún, P. Martín-Dávila, M. Ramírez, M. Laiño, A. Vegas, J. Cobo, V. Pintado, E. Gómez-Mampaso, M. Sendito y S. Moreno

Servicios de Enfermedades Infecciosas, Microbiología, Reumatología y Traumatología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid

Introducción: La tuberculosis constituye una patología emergente en las 2 últimas décadas. Ello se ha asociado a

una mayor frecuencia de formas extrapulmonares. Entre ellas, la afectación osteoarticular merece un especial interés por su manejo clínico y las potenciales secuelas en los pacientes.

Métodos: Se revisan las tuberculosis osteoarticulares observadas en el Hospital Ramón y Cajal observadas desde 1978 a 2006. El estudio se centró en el análisis de las espondilodiscitis (ED) y las artritis periféricas (AP).

Resultados: Se observaron 79 episodios. Las características más significativas en ED y AP fueron, respectivamente: episodios: 42 y 37; varones: 62% y 65%; > 65 años: 21% y 19%; presentaron fiebre 36% y 19%; dolor en 74% y 89%; TBC pulmonar simultánea: 19% y 14%; se aislaron micobacterias en orina en 61% y 57%; recibieron cirugía: 66% y 60% y curaron sin secuelas el 66% y 77%, respectivamente. El 90% de ellos se encontraban previamente sanos. Las ED, excepto 1 cervical y 2 sacroiliacas, el 52% fueron dorsales y el 45% fueron lumbares. Las ED lumbares fueron más frecuentes en las mujeres ($p = 0,09$) y se asociaron a un mayor nº de abscesos epidurales ($p = 0,05$) que las dorsales. La gran mayoría de los pacientes intervenidos requirieron instrumentalización. Los pacientes intervenidos requirieron más tratamiento ortopédico y la evolución fue mejor. Las AP se localizaron a nivel de rodilla (30%), cadera (24%), codo (5%) y pequeñas articulaciones (40%), existiendo afectación poliarticular en 11%. La cirugía se realizó más frecuentemente en articulaciones grandes ($p0,04$) y la evolución a la curación sin secuelas fue mayor ($p = 0,08$). La afectación de articulaciones grandes presentó una tendencia a una mayor frecuencia de TBC pulmonar.

Conclusiones: La TB osteoarticular es más frecuentemente en varones, previamente sanos y en 15% de ellos en el contexto de una TB pulmonar. La ED lumbar es más frecuente en mujeres y se asocia con un mayor riesgo de absceso epidural. La AP afecta con más frecuencia a articulaciones pequeñas. Los cultivos de orina pueden contribuir significativamente al diagnóstico. Las 2/3 partes requieren cirugía y ésta se asocia con una mejor evolución.

073

EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN LATENTE TUBERCULOSA CON RIFAMPICINA MAS ISONIACIDA DURANTE 2 MESES (2RZ), NO INCREMENTA EL RIESGO DE HEPATOTOXICIDAD GRAVE EN PACIENTES INFECTADOS POR EL VIH. RESULTADO DE UN METANÁLISIS DE ENSAYOS CLÍNICOS RANDOMIZADOS

I. Perez-Camacho, M. Gallo, A. Camacho, M.J. Pérez-Sola, J.M. Kindelán, J. Torre-Cisneros y A. Rivero
UGC Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba.

Introducción: 2RZ fue considerada por los CDC como una de las dos pautas electivas de QP antituberculosa en pacientes infectados por el VIH. Sin embargo la comunicación de casos de hepatitis graves o fatales en sujetos sin infección por el VIH que recibían 2RZ ha hecho desaconsejar su uso.

Objetivo: Evaluar la incidencia de hepatitis grave con rifampicina más pirazinamida (RZ) en la prevención de la tuberculosis en pacientes infectados por el VIH.

Diseño: Meta-análisis de ensayos clínicos randomizados y controlados en los que se comparó el régimen RZ con regímenes basados en isoniacida en pacientes infectados por el VIH. Se realizó una búsqueda sistemática de la literatura desde 1986 y octubre del 2006. Se identificaron 5 ensayos clínicos randomizados y controlados realizados en España, USA, Haití y Zambia. Se comparó la incidencia de hepatotoxicidad grave durante el período de quimioprofilaxis entre RZ y el grupo control. Se definió como hepatotoxicidad grave a aquella que provocó la muerte del paciente o fue causa de retirada de la quimioprofilaxis. El análisis de los datos se realizó con el programa informático EPIDAT v.3.1®. La calidad

metodológica se evaluó mediante el método de Jada et al. El análisis de heterogeneidad entre estudios se realizó mediante la Prueba Q de Dersimonian y Laird's.

Resultados: La población final evaluada fue de 2657 pacientes incluidos en 4 ensayos clínicos randomizados. Fue excluido para el análisis 1 ensayo clínico en el que no se evaluaron datos de seguridad. De los pacientes evaluados, 1324 recibieron RZ y 1333 recibieron INH (541 durante 6 meses y 792 durante 12 meses). La prueba de Dersimonian y Laird's indica, con un nivel de confianza del 95%, que no hay evidencia estadística de heterogeneidad entre los estudios ($p = 0,2453$). Hepatotoxicidad grave: RZ: 16 pacientes que recibieron RZ y 38 que recibieron isoniazida (1,208% vs 2,851%; $p = 0,0042$) desarrollaron hepatotoxicidad grave. El riesgo de desarrollo de hepatotoxicidad grave con RZ fue inferior al de los grupos controles (IC 95%: -0,028 a -0,005).

Conclusión: El metanálisis realizado no demuestra que el uso de un régimen basado en 2RZ suponga un aumento del riesgo de hepatotoxicidad grave entre pacientes infectados por el VIH.

074

MULTIRRESISTENCIA EN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*: DETECCIÓN RÁPIDA MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL

R. Cremades¹, A. Santos¹, J.C. Rodríguez¹, E. García Pachón², M. Ruiz¹, P. López¹, E. Pastor¹, F. Loredó¹ y G. Royo^{1,3}

¹S. Microbiología ²S. Neumología. Hospital General Universitario de Elche. ³Universidad Miguel Hernández. Elche. Alicante.

Objetivo: La rapidez de la detección de cepas resistentes a isoniazida y rifampicina es un elemento clave en el control de la tuberculosis. Pretendemos estudiar la sensibilidad de *M. tuberculosis* a isoniazida (H) y rifampicina (R) utilizando un método de PCR a tiempo real.

Método: Se analizaron 7 cepas sensibles a H y R y 3 cepas resistentes a los dos fármacos. Tras siete días de incubación en 10 ml de Middlebrook 7H9 con H (concentración 0,1 ug/ml), R (1 ug/ml) y sin antibiótico, se cuantificó el número de micobacterias mediante PCR a tiempo real. La extracción de las micobacterias se realizó mediante el sistema QUI AMP DNA Mini kit previa lisis con lisozima, proteinasa K y Triton. La PCR a tiempo real se realizó amplificando un fragmento de IS6110; el sistema incorpora un control interno diseñado a partir de un fragmento genómico de *Chlamydia trachomatis*, de igual tamaño que el fragmento diana y que amplifica con los mismos cebadores que éste. Mediante este sistema, utilizando dos sondas marcadas con diferente fluorocromo se puede detectar la presencia de inhibiciones parciales o totales de la reacción. La amplificación se realizó en un ABI PRISM 7700 Sequence detector. Cada proceso se realizó por duplicado y se estableció el criterio de que los duplicados deberían tener valores muy semejantes para ser considerado el ensayo como válido (la desviación típica debe ser menor al 2% de la media de los resultados).

Resultados: Las cepas sensibles a H se detectaron 1,23 ciclos de media después que el control sin antibiótico y las cepas sensibles a R se detectaron 2,26 ciclos después del mismo control, lo que indica una inhibición del crecimiento bacteriano; la diferencia con el control fue, en todas las cepas, superior a medio ciclo. En cambio, las cepas resistentes a H y a R se detectaron en ciclos anteriores al control (0,13 y 0,36 respectivamente).

Conclusiones: La determinación del cambio poblacional de *M. tuberculosis* a los 7 días de cultivo mediante PCR a tiempo real comparando medios de cultivo con y sin antibiótico, permite detectar de forma rápida y cuantitativa el patrón de resistencia de las cepas. Además la realización de las pruebas por duplicado, la exigencia de una alta reproducibilidad de las determinaciones y la utilización del control interno para detectar posibles inhibiciones de las reacciones, aportan fiabilidad a los resultados obtenidos.

Financiado por SEPAR2004 y SVN/FNCV2006.

075

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX: FRECUENCIA DE MUTACIONES EN LOS GENES *KATG* Y *RPOB* EN AISLADOS RESISTENTES A ISONIAZIDA Y RIFAMPICINA

N. Orta, O. Fraile, D. Navalpotro, R. Guna, N. Tormo, A. Garay, C. Mallea y R. Borrás

Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina y Hospital Clínico Universitario. Valencia.

Introducción: Isoniazida y rifampicina son los dos fármacos más importantes en un tratamiento antituberculoso adecuado. La resistencia a isoniazida se asocia a mutaciones al menos en cuatro genes, de las cuáles la más común es una mutación específica en el codón 315 (S315T1, S315T2) del gen catalasa-peroxidasa (*katG*) de *Mycobacterium tuberculosis*. Mientras que la resistencia a rifampicina se asocia mayoritariamente a mutaciones en el gen *rpoB*. El objetivo de este estudio es conocer que mutaciones en los genes *katG* y *rpoB* presentan los aislados del complejo *M. tuberculosis* resistentes a isoniazida y/o rifampicina, respectivamente.

Material y métodos: Se han utilizado 53 aislados clínicos recientes, identificados mediante métodos convencionales y moleculares como *M. tuberculosis* complex (47 *M. tuberculosis*, MYCTUB; 6 *M. bovis*, MYCBOV), cuya sensibilidad a los tuberculostáticos (Isoniazida, INH; Rifampicina, RIF; Estreptomina; Etambutol; Pirazinamida) había sido determinada mediante el Sistema BACTEC MGIT960. De los 53 aislados estudiados, 14 (12 *M. tuberculosis*, 2 *M. bovis*) fueron sensibles, y los restantes presentaron resistencias a INH (14 *M. tuberculosis*), RIF (9 *M. tuberculosis*) y a INH+RIF (12 *M. tuberculosis*, 4 *M. bovis*). La detección de mutaciones en los genes *rpoB* y *katG* se realizó mediante un método de hibridación inversa (Genotype MTBDR; Hain Lifescience, Nehern, Germany), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Resultados: No se detectó mutación alguna en los aislados sensibles estudiados. La resistencia a INH se asoció en 27/30 (90%) casos a mutación en *katG* (S315T1) y la resistencia a RIF fue debida en todos casos (25/25) a mutaciones en *rpoB* (S513L, 76%; H526Y, 4%; D516V, 4%; c525-529, 16%).

Conclusiones: Los resultados obtenidos demuestran que en nuestra área, tanto en *M. tuberculosis* como en *M. bovis*: 1ª.- La resistencia a INH es debida en la mayoría de los casos a la mutación S315T1 del gen *katG*. 2ª.- Que la resistencia a RIF se asocia en todos los casos a mutaciones del gen *rpoB*, y que la más frecuente es la mutación S513L.

076

LA VACUNA TERAPÉUTICA RUTI INDUCE UN AUMENTO DE CÉLULAS T CD4+IFNG+ Y T CD8+IFNG+ ESPECÍFICAS CONTRA ANTÍGENOS MICOBACTERIANOS SECRETADOS Y ESTRUCTURALES

E. Guirado¹, O. Gil¹, N. Caceres¹, C. Vilaplana¹, I. Amat², J. Díaz¹ y P.J. Cardona¹

¹Unitat de Tuberculosi Experimental. Fundació Institut per a la Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol. Universitat Autònoma de Barcelona. Badalona. ²Archivel Farma, S.L. Mataró.

RUTI es una vacuna basada en fragmentos celulares de *M. tuberculosis* biotransformados y liposomados, capaces de generar una respuesta poliantigénica intensa, con un componente Th1/Th2/Th3 muy equilibrado.

Metodología: Se infectaron ratones hembra *spf* C57BL/6, de 6 semanas de edad, con *M. tuberculosis*, cepa H37Rv Pasteur, mediante aerosol de baja dosis (20-50 bacilos). Se realizó trata-

miento quimioterápico con isoniácida (25 mg/Kg) y rifapentina (10 mg/Kg), a partir de la semana 6 post-infección hasta la semana 14. Después, se definieron 3 grupos terapéuticos. En el grupo I se administraron 2 dosis de PBS (semanas 14 y 17). En el grupo II se administraron 2 dosis de RUTI (271 µg de FCMtb) subcutáneamente (semanas 14 y 17). En el grupo III se administró BCG (2x10⁶ UFCs) (semana 14). Se valoraron las UFCs y las poblaciones celulares T CD4+IFNγ+ y T CD8+IFNγ+ específicas tras estimulación con PPD, BCG, Ag85B, ESAT-6, CFP-10, Ag38KDa, Ag19KDa y Ag16KDa. Paralelamente, se llevó a cabo la infección del mismo modelo experimental con la misma cepa, inoculando 10⁶ UFCs i.p.. Se administraron 2 dosis de RUTI (277 µg), o de BCG (2x10⁶ UFCs), (semanas 1 y 3). Se valoró la producción de IFNγ mediante ELISA y ELISPOT, por parte de las células T CD4+ y T CD8+ específicas tras estimulación con PPD, BCG, Ag85B, ESAT-6, CFP-10, Ag38KDa, Ag19KDa, Ag16KDa, Ag40KDa, Hsp65 y MPT-64.

Resultados: Los datos muestran que en el modelo de infección por aerosol, RUTI consiguió reducir las UFCs 0,7log10 y aumentar 10 veces el número de células T CD4+IFNγ+ y T CD8+IFNγ+ PPD específicas en pulmón de ratones infectados, respecto de los ratones control que sólo recibieron quimioterapia. En los ratones tratados con BCG no se observó una reducción de las UFCs y tan sólo se pudo demostrar un leve aumento de las células T CD4+IFNγ+. En el modelo de infección i.p. puede verse un aumento en la secreción de IFNγ en el grupo tratado con RUTI, independientemente del tipo de antígeno utilizado, respecto del grupo tratado con BCG.

Conclusiones: Los mecanismos potencialmente implicados en el control del bacilo latente inducidos mediante inmunoterapia con RUTI incluyen un aumento de las células T CD4+IFNγ+ y T CD8+IFNγ+ específicas.

Agradecimientos: FIS 01/3104; SEIMC; BECA Pre-Doctoral SEIMC; SEPAR; Archivel Farma, S.L.

077

RUTI, UN NUEVO CANDIDATO DE VACUNA PROFILÁCTICA CONTRA LA INFECCIÓN POR MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

C. Vilaplana¹, E. Guirado¹, I. Amat², O. Gil¹, M. Singh³ y P.J. Cardona¹

¹Unitat de Tuberculosi Experimental. Fundació Institut per a la Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol. Universitat Autònoma de Barcelona. Badalona. ²Archivel Farma, s.l. Mataró. ³Lionex Diagnostics & Therapeutics GmbH. Braunschweig. Germany.

El objetivo de este estudio fue investigar el efecto profiláctico de RUTI, una vacuna a partir de células de *M. tuberculosis* fragmentadas, detoxificadas y liposomadas, que ha demostrado tener un efecto terapéutico después de una pauta corta de quimioterapia contra un modelo murino de infección tuberculosa latente.

Metodología: Ratones hembra *spf* C57BL/6 de 6 semanas de vida fueron inoculados con 2 dosis de RUTI (lote A05, con 277 µg/mL de FCMtb) separadas por 3 semanas; 2x10⁶ de BCG Copenhagen (SSI, Dinamarca); y PBS (grupo control). Todos los grupos fueron infectados en la semana 7 después de la primera inoculación con una cepa de *M. tuberculosis* H37Rv Pasteur a través de una baja dosis de aerosol inducida con un aparato de Middlebrook. En la semana 3 post-infección, algunos animales fueron sacrificados para determinar la concentración bacilar en los pulmones después de homogeneizarlos y cultivarlos 4 semanas en Agar Middlebrook 7H11. En la semana 7, esplenocitos de 4 animales de cada grupo experimental fueron plateados a 1x10⁵ células/pocillo y estimulados con PPD (SSI), Ag85A y Ag85B (Lionex). Las células fueron incubadas a 37°C en 5% CO₂ durante 96 horas. El IFNγ fue testado en los sobrenadantes con un ELISA doble-sandwich usando un anticuerpo específico para IFNγ murino.

Resultados: En la semana 3 post-infección en los animales vacunados con RUTI o BCG se observó una menor concentración bacilar comparados con el grupo control: 5,72 ± 0,3; 5,71 ± 0,58; y 6,42 ± 0,24 Log10 respectivamente. Se observó producción de IFNγ por los esplenocitos de los ratones vacunados con RUTI o BCG, cuando se estimularon con PPD: 2,57 ± 0,19 y 2,01 ± 0,13 log10 pg/mL respectivamente. Sólo en los animales vacunados con RUTI se observó producción de IFNγ cuando los esplenocitos fueron estimulados con Ag85A y Ag85B (produciendo 2,53 ± 0,49 y 2,69 ± 0,31 log10 pg/mL respectivamente).

Conclusión: La vacunación con RUTI tiene un efecto profiláctico contra la infección por *M. tuberculosis* relacionada al parecer, con la inducción de inmunidad específica frente a Ag85A y B. Este efecto es interesante ya que el tratamiento de la infección tuberculosa latente con una pauta corta de quimioterapia más RUTI podría también prevenir el riesgo de reinfección relacionado con el tratamiento prolongado actual con quimioterapia (9 meses con isoniácida).

Agradecimientos: FIS 01/3104; SEPAR; SEIMC; Archivel Farma, s.l.

078

ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LAS NUEVAS FLUOROQUINOLONAS FRENTE A MYCOBACTERIUM FORTUITUM

A. Santos, R. Cremades, J.C. Rodríguez, E. García-Pachón, M. Ruiz, P. López, E. Pastor, L. Soler y G. Royo

S. Microbiología. Hospital General Universitario de Elche. Universidad Miguel Hernández. Elche. Alicante.

Objetivo: En los últimos años se ha descrito un incremento en el número de infecciones por *Mycobacterium fortuitum*, asociadas principalmente a cirugía plástica y oftalmológica. Pretendemos conocer la actividad bactericida de las nuevas fluoroquinolonas sobre este microorganismo.

Material y métodos: *Cepas:* 20 aislados clínicos identificados mediante métodos bioquímicos y moleculares. Su identificación se confirmó en el Instituto Carlos III. *Antibióticos ensayados:* Ciprofloxacino (C), levofloxacino (L), gatifloxacino (G), moxifloxacino (M), linezolid (LZ), claritromicina (CL), azitromicina (A), rifampicina (RP), rifabutina (RB), amikacina (A), gentamicina (GT), tobramicina (T), doxiciclina (D), imipenem (I) y ertapenem (E). Todos los antibióticos se ensayaron a 4 µg/mL. *Combinaciones ensayadas:* Se ensayaron 51 combinaciones de dos antibióticos y 47 de tres, pertenecientes a diferente familia. *Actividad bactericida:* Se determinó en caldo MH con incubación a 37°C durante 4 días. Mediante subcultivos en agar MH se determinó si se producía un descenso del 99,9% del inóculo inicial. Como control se utilizó un tubo sin antibiótico.

Resultados: *Actividad de los fármacos de forma individual:* Moxifloxacino y gatifloxacino son los fármacos más bactericidas (15 de 20 cepas) seguidos de amikacina (14 de 20), ciprofloxacino (13 de 20), levofloxacino (12 de 20) y claritromicina (7 de 20). *Actividad bactericida de la combinación de dos fármacos:* Las combinaciones de G+RP, G+RB, M+RP, M+AK y C+AK son las más bactericidas (18 de 20 cepas), seguidas de M+GT, M+I, C+I, C+T, M+E, C+E, G+CL, M+RB, M+T, M+D (17 de 20). *Actividad bactericida de la combinación de tres fármacos:* En general, la adición de un tercer fármaco no incrementa de forma significativa la actividad bactericida.

Conclusiones: Clásicamente, se recomienda que las infecciones por este microorganismo se traten con la combinación de dos de los siguientes fármacos: fluoroquinolonas, macrólidos, sulfonamidas, doxiciclina, minociclina. Nuestro trabajo confirma que las fluoroquinolonas son los antibióticos más activos, especialmente moxifloxacino y gatifloxacino. Respecto al resto de los fármacos ensayados, destaca la buena actividad de las combinaciones de estas nuevas fluoroquinolonas con rifamicinas y amikacina. La utilidad clínica de estos datos debe confirmarse en modelos animales o ensayos clínicos.

079

CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS “NO RESPONDEDORAS” EN LAS LESIONES PULMONARES EN FASE CRÓNICA DE LA INFECCIÓN TUBERCULOSA LATENTE EN EL MODELO MURINOO. Gil¹, J. Carrillo², J. Díaz¹, J. Verdaguer² y P.J. Cardona¹¹Unitat de Tuberculosi Experimental. ²Universitat de Lleida.

Fundació Institut per a la Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol. U. A.B. Badalona.

La infección tuberculosa crónica en ratones está caracterizada por un flujo constante de macrófagos espumosos hacia los espacios alveolares que rodean a los granulomas pulmonares (GP). Sorprendentemente, estas células se encuentran rodeadas por linfocitos T, pero éstos no son capaces de controlar la reactivación bacilar. En este estudio se caracterizó el fenotipo local de las células T en GP de ratones en fase crónica para entender la falta de eficiencia de la inmunidad.

Metodología: Se infectaron ratones hembra C57BL/6 *spf* de 6 semanas de edad con la cepa H37Rv Pasteur de *M. tuberculosis*. La infección por aerosol aseguraba un inóculo bajo (20-50 bacilos) en los pulmones. Las muestras objetivo de nuestro estudio fueron el bazo, adenopatías hiliares, todo el pulmón y los GPs que se recogieron en las semanas 6, 9, 14 y 17 para estudiar la expresión de algunos marcadores inmunológicos (CD3, CD5, CD25, CD44 y TCR) y porcentajes de células apoptóticas por citometría de flujo.

Resultados: Los resultados muestran el fenotipo siguiente: CD3 low, CD5 high, TCR low y CD44 high. Este fenotipo nos hace pensar en una población de células T anérgicas en los GPs de los ratones en fase crónica de la infección (s6, s9, s14 y s17), comparado con los datos obtenidos en bazo y adenopatía hilar. El estado de anergia en esta población se mantuvo durante las 4 semanas de estudio, en los GPs. Por otro lado, en los pulmones también observamos un fenotipo que podría corresponder al de células T anérgicas, pero apareció más tarde (s14 y s17), seguramente debido al progresivo aumento de la área pulmonar afectada (GPs). El porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+ apoptóticos fue muy elevado en todos los tejidos estudiado (del 13% al 57%) siendo mayor en el pulmón total y los GPs donde se observó un aumento de CD8+ apoptóticos, comparado con el resto de las muestras analizadas.

Conclusión: Este trabajo evidencia la aparición de una población de células T que presenta un fenotipo que hace pensar en un estado de anergia y la aparición de porcentajes muy altos de linfocitos CD4+ y CD8+ apoptóticos en los GPs de estos animales que se encontraban en fase crónica de la infección. Este hecho podría explicar por qué el sistema inmune es incapaz de eliminar el bacilo tuberculoso. En la actualidad se están llevando a cabo nuevos estudios funcionales para confirmar el fenotipo observado, valorar si realmente corresponde a una población anérgica y, por tanto, aclarar quién falla en la comunicación macrófago espumoso - Linfocito T.

Agradecimientos: FIS 01/3104; FIS 03/0757; SEIMC; SEPAR.

080

EL TEST CUTÁNEO DE LA TUBERCULINA (TST) AUMENTA LOS VALORES DE LOS ENSAYOS DE LIBERACIÓN DE INTERFERÓN-GAMMA (IGRA)C. Vilaplana¹, J. Ruiz-Manzano², O. Gil¹, F. Cuchillo¹, E. Muntané³, M. Singh⁴, R. Spallek⁴, V. Ausina¹ y P.J. Cardona¹¹Unitat de Tuberculosi Experimental. Fundació Institut per a la Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol.²Universitat Autònoma de Barcelona. Badalona. ³Servicio de Neumología y ⁴Servicio de Farmacología. Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona. ⁴Lionex Diagnostics & Therapeutics GmbH. Braunschweig. Alemania.

Objetivos: La validación del proceso para monitorizar la inmunogenidad de la administración de RUTI en ensayos clí-

nicos, generó la duda acerca introducir el TST en el screening de voluntarios para el diagnóstico de infección tuberculosa latente (ITL). RUTI es una vacuna terapéutica hecha a partir de células de *Mycobacterium tuberculosis* fragmentadas, detoxificadas y liposomadas. Diseñada para reducir el tratamiento quimioterápico de la ITL de 9 a 1 mes.

Metodología: Los voluntarios reclutados fueron Grupo I: ITL +, TST + (n = 2). Grupo II: ITL +, TST- (post-quimioprofilaxis) (n = 3). Grupo III: ITL -, TST- (n = 4). Inmediatamente antes de la inoculación de 5 U.I. de PPD RT-23 (SSI), se extrajeron un tubo CPT (BD Vacutainer CPT) para obtener células monocíticas de sangre total periférica (PBMCs) y dos tubos de heparina sódica (BD Vacutainer). Concretamente, 1, 2 y 4 semanas después de la inoculación. Los ensayos del T-SPOT (Oxford Immunotech) y el Quantiferon CMI (Cellestis) se realizaron según las recomendaciones del fabricante. Las muestras (250.000 cells en el T-SPOT y 1mL de sangre total en el QTF CMI) fueron estimuladas con antígenos proporcionados por Lionex (ESAT-6, CFP-10, 16kDa, 19kDa, 38kDa, MPT-64, Ag85B y hsp65) y PPD RT-50 (SSI), a una concentración de 10⁶ µg/mL.

Resultados: La inoculación intradérmica de 5 U.I. of PPD RT-23 (TST) indujo el aumento de los valores basales de los IGRA 1 semana después del TST, tanto en los voluntarios TST- como en los TST+. Usando ESAT-6, p.e., el aumento fue de 4 a 10 veces en el TSPOT y de 6 a 200 veces en el Quantiferon CMI. Usando el mismo antígeno, el aumento en los voluntarios previamente TST+ fue más discreto en el Quantiferon CMI (hasta 3 veces). En general, los valores se normalizaron 4 semanas después del TST.

Conclusión: El aumento de los valores de los IGRA después del TST en personas previamente TST negativas genera la duda acerca de cual es el linaje celular responsable de la producción de IFN-gamma, así como preguntas sobre algunas ITL guidelines que recomiendan el uso de IGRA después del TST para confirmar la positividad de éste. Cabe tener en cuenta esta información en ensayos clínicos futuros sobre vacunación terapéutica que requieran el screening de ITL para incluir voluntarios. Hay que diseñar cuidadosamente el diagnóstico de ITL para LTBI para evitar cualquiera interferencia del TST. Los IGRA se tendrían que realizar como mínimo 4 semanas después del TST.

Agradecimientos: FIS 01/3104; SEPAR; SEIMC; Archivel Farma, s.l.

081

ESTUDIO SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LOS MACRÓFAGOS ESPUMOSOS EN LA ESTRUCTURA DEL GRANULOMA PULMONAR EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE TUBERCULOSIS EN EL RATÓNN. Cáceres¹, G. Tapia², I. Ojanguren², A. Ariza², V. Ausina¹ y P.J. Cardona¹¹Unitat de Tuberculosi Experimental. ²Departamento de Patología. Fundació Institut per a la Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol. Universitat Autònoma de Barcelona. Badalona.

El objetivo de este estudio es describir la evolución de los macrófagos espumosos, que son los responsables de la fuga de *M. tuberculosis* al exterior del granuloma, utilizando técnicas histológicas.

Metodología: Se infectaron ratones *spf* DBA/2 y C57BL/6 con la cepa H37Rv Pasteur de *M. tuberculosis*, mediante aerosol de baja dosis. Desde la semana 6 hasta la 14 post-infección se realizó tratamiento antibiótico (25 mg/kg de isoniazida y rifapentina 10 mg/kg vía oral) en un grupo de ratones C57BL/6. Los pulmones extraídos de los ratones de las distintas cepas y en distintos tiempos se fijaron en formol, se incluyeron en parafina y se obtuvieron secciones de 5 µm que fueron teñidas con Hematoxilina-Eosina para ser analizadas mediante microscopía óptica. Granulomas aislados de los mismos pulmones se fijaron en Karnovsky para obtener cor-

tes semi-finos y finos. Los cortes semi-finos se tiñeron con azul de toluidina para posterior observación con microscopía óptica y los cortes finos se fijaron posteriormente con tetraóxido de osmio, se deshidrataron, se incluyeron en resina epóxica y se tiñeron con acetato de uranil y citrato para analizarlo mediante microscopía electrónica de transmisión.

Resultados: La evolución del granuloma pone de manifiesto el papel ya descrito de los macrófagos espumosos, que es el de transportar el bacilo en fase estacionaria hasta los espacios alveolares que rodean al granuloma, dónde posteriormente se reactivarán. Las secciones semi-finas teñidas con azul de toluidina muestran, por una parte, el origen de los macrófagos espumosos en el centro del granuloma, dónde contienen vacuolas de color oscuro. Por otra parte muestran su transformación en macrófagos de mayor tamaño que contienen vacuolas lipídicas y que se acumulan en la zona periférica del granuloma. Estos macrófagos de tamaño mayor aparecen después de la inducción de la respuesta inmune específica. El tratamiento antibiótico produce una disminución en la cantidad de estas células.

Conclusión: Los macrófagos espumosos son los principales responsables de la cronicidad de la infección murina producida por *M. tuberculosis* debido a que se relacionan con la fuga del bacilo del granuloma y con la inmunosupresión local, mediante producción de NO, que inhibe las células T efectoras. El tratamiento quimioterápico es un buen recurso para evitar esta inmunodepresión y es primordial tenerlo en cuenta en la aplicación de vacunas terapéuticas contra la infección tuberculosa.

Agradecimientos: FIS 01/3104; SEPAR; SEIMC; Grand Challenge #12