



XVI REUNION DEL GRUPO ESPAÑOL DE MICOBACTERIOLOGIA

GEM 2012

CORDOBA 22 – 24 DE MARZO DE 2012



Organiza
Centro de Referencia de Micobacterias.
Hospital Universitario Reina Sofia, Cordoba, España.

LIBRO DE
RESÚMENES



**XVI REUNION DEL GRUPO ESPAÑOL DE
MICOBACTERIOLOGIA**

GEM 2012

CORDOBA 22 – 24 DE MARZO DE 2012

Centro de Referencia de Micobacterías.

Hospital Universitario Reina Sofia . Cordoba.

España.

LIBRO DE RESUMENES



LISTADO DE PONENCIAS

La Seguridad Biológica en el trabajo con Microorganismos Patógenos.

Autor/es: Roser Dalmau Esclusa

Institución: TELSTAR TECHNOLOGIES S.L. Barcelona

GeneXpert Mtb/Rif is Changing the Future of Tuberculosis.

Autor/es: Ellen Jo Baron, Ph.D., D

Institución: Stanford University .USA

Desarrollo clínico de la estrategia RUTI para la inmunoterapia de la infección latente tuberculosa.

Autor/es: Cardona P(Badalona)

Secuenciación masiva en el diagnóstico de la infección por MTB.

Autor/es: Mingorance J . (Madrid)

Métodos moleculares de detección e identificación directa en diferentes muestras clínicas y ambientales.

Autor/es: Javier Aznar y María José Torres

Institución: H.U. Virgen del Rocío. Departamento de Microbiología. Universidad de Sevilla

Infecciones por Micobacterias de Crecimiento rápido: Un problema emergente que puede determinar una revisión taxonómica en el género.

Autor/es: Sylvia Cardoso Leao(1) y María Jesús García García(2)

Institución: (1) Universidade de Sao Paulo (Brasil), (2) Universidad Autonoma de Madrid (España)

Identificación de aislados mediante métodos moleculares SPEED-OLIGO MYCOBACTERIA.

Autor/es: Pablo Mendoza López

Institución: VIRCELL. Granada

Desarrollo y evaluación de la plataforma molecular X-RIOT para la detección de tuberculosis multi-resistente a drogas.

Autor/es: Iván Hernández-Neuta, Andrés Varela, Anandi Martín, Juan Carlos Palomino y Patricia Del Portillo Obando

Institución: Corporación CorpoGen, Carrera 5 # 66ª-34, Bogotá, Colombia

Identificación y estudio de resistencia a fármacos por tecnología de MICROARRAY en la plataforma Infinity.

Autor/es: Goosen López López

Institución: Hospital Universitario La Paz – Madrid

Utilidad de la pirosecuenciación en la detección de resistencia de Mycobacterium tuberculosis a fármacos de primera y segunda línea.

Autor/es: José Domínguez.

Institución: Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona

Identificación de antígenos oligoespecíficos de Mycobacterium leprae.

Autor/es: Iris Estrada García, Jeanet Serafín-López, Moisés Talavera-Paulín, Sergio Estrada-Parra

Institución: Depto. de Inmunología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N. Prol. De Carpio y Plan de Ayala s/n. México, D.F., 11330. México

Biopelículas y Micobacterias: Importancia en la patogenia y el tratamiento de las infecciones causadas por estos organismos.

Autor/es: Jaime Esteban

Institución: Departamento de Microbiología Clínica. IIS-Fundación Jiménez Díaz. Madrid

El sistema DIVERSILAB en la tipificación de M. tuberculosis.

Autor/es: Pere Coll

Institución: Servicio de Microbiología. Hospital de Sant Pau. Barcelona

Test de susceptibilidad cuantitativo de 1ª y 2ª línea para Mycobacterium tuberculosis usando lo BACTEC MGIT 960 con software TB eXiST : un protocolo en desarrollo en Europa.

Autor/es: Miguel Viveiros, Emmanuelle Cambau y Erik Boettger en nombre del Grupo Europeo de Estudio “Quantitative Drug Susceptibility Test with TB eXiST software”

Institución: Grupo de Micobacterias da Unidade de Microbiologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, Rua da Junqueira, 100,1349-008 Lisboa, Portugal

Vigilancia molecular de la tuberculosis multi-resistente en Europa.

Autor/es: Sofia Samper, Maria Soledad Jiménez, María José Iglesias y el Grupo de Trabajo de Tuberculosis Multirresistente

Institución: Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Instituto de Salud Carlos III

GenoType MTBDRplus Version 2.0 and FluoroType MTB - new developments for high sensitive TB-diagnostic.

Autor/es: Michael Weizenegger

Institución: Laboratory Group Limbach, Heidelberg, Germany Department of Microbiology and Molecular Genetic

Desarrollo de nuevos antituberculosos.

Autor/es: Alfonso Mendoza

DDW GlaxoSmithKline.Madrid

Investigación y Desarrollo de MTBVAC como nueva vacuna contra la Tuberculosis.

Autor/es: Ainhoa Arbues, Jesús Gonzalo, Ignacio Aguiló, Dessi Marinova y Carlos Martín

CIBERES, Departamento de Microbiología. Hospital Miguel Servet. Universidad de Zaragoza

PONENCIAS

LA SEGURIDAD BIOLÓGICA EN EL TRABAJO CON MICROORGANISMOS PATÓGENOS.

Autor/es: Sra., Roser Dalmau Esclusa.

Institución: TELSTAR TECHNOLOGIES S.L.

El Flujo Laminar y cabinas de seguridad biológica: Presentación de los principios físicos que rigen el flujo laminar y su aplicación a las Cabinas de seguridad biológica.

Clasificación de las cabinas de seguridad biológica, aplicaciones y uso.

Principales normativas sobre cabinas de bioseguridad en Europa.

Diferentes tipos de test y Certificaciones.

Recomendaciones de instalación para cabinas de seguridad biológica.

Mantenimiento y validación de Cabinas de Seguridad Biológica.

Aproximación a instalaciones de Bioseguridad relacionadas con el trabajo con Microorganismos patógenos.

Palabras clave: Cabinas, Seguridad, Biológica.

GENEXPERT MTB/RIF IS CHANGING THE FUTURE OF TUBERCULOSIS

Autor/es: Ellen Jo Baron, Ph.D., D(ABMM).

Institución: Stanford University and Cepheid.

Introduction/Objectives:

More than 9 million people per year acquire tuberculosis (TB) and 4700 people die from TB every day. Although World Health Organization guidelines for directly observed therapy and enormous support from donors have helped to establish diagnosis and treatment centers in high burden countries (Africa, Asia), overall numbers of new cases are decreasing only slowly and multi-drug resistant TB (MDR-TB) cases are actually increasing. Studies have shown that patients receiving inadequate therapy are the major sources of new infections. Yet <5% of newly diagnosed patients currently have drug susceptibility tests performed. This presentation will describe the principle of the GeneXpert Mtb/Rif assay and discuss some of the newest findings associated with its use, primarily in high burden countries.

Materials and Methods:

A number of studies carried out by Fund for Innovative New Diagnostics (FIND) compared the GeneXpert Mtb/Rif results to those of excellent laboratories using conventional and molecular methods. Other aspects of implementation of the GeneXpert have included cost-effectiveness studies, studies related to patient impact due to time to results and initiation of treatment, and many studies evaluating the GeneXpert assay for extra-pulmonary sample types. Innovative approaches to improving patient access to testing include placing the GeneXpert on a mobile van and bringing it directly to the patients.

Results and Conclusions:

Studies on sputum samples have shown the sensitivity of the Xpert assay to be >99% in smear-positive patients and >75% in smear-negative, culture-positive patients from only one sample; >90% with three samples. The specificity has been >98%. Sensitivity for detection of rifampin resistance, usually a predictor of MDR-TB, has been >95%. Even more impressive, when laboratories without previous training in TB microbiology implement the GeneXpert technology, their performance is as good as those with years of experience, and much better than their ability to perform smear microscopy. A key factor has been the rapid delivery of results, which results in fewer patients lost to followup and more rapid initiation of appropriate therapy. Extra-pulmonary sample types have variable success with GeneXpert; CSF seems to perform well if sufficient volume is used, but pleural fluids have low sensitivity. Lymph nodes, bone, and joint fluids seem to perform very well, as do gastric aspirates. Stool is inhibitory but preliminary processing may improve results for this type of sample. Additional sample types, including whole blood, are showing promise in preliminary trials. A potential use of GeneXpert Mtb/Rif in lower burden countries will be to determine whether suspected TB patients require isolation; demonstration studies are in process. Another potential use of this technology is to monitor patients on therapy, since numbers of mycobacteria in the sample correlate to the cycle threshold of the products of the PCR reaction. Preliminary publications have shown some potential for this purpose and other clinical trials are in progress.

Palabras clave: Tuberculosis, GeneXpert, molecular

SECUENCIACIÓN MASIVA EN EL DIAGNOSTICO DE LA INFECCIÓN POR MTB

Autor/es: Jesús Mingorance Cruz.

Institución: Hospital Universitario La Paz.

La secuenciación masiva surgió originalmente como una extensión de la tecnología de pirosecuenciación que permitía realizar cientos de miles de reacciones de secuenciación en una sola carrera, revolucionando la secuenciación de genomas completos. Durante la última década el método original ha evolucionado llegando a superar al método de Sanger en longitud de secuencias. Además, han surgido nuevos métodos no basados en pirosecuenciación que en algunos casos compiten con el método original, pero en otros lo complementan. La complejidad de estas tecnologías, tanto para la preparación de las muestras como para el análisis posterior de los datos, restringió inicialmente su uso a grandes centros de referencia y a grandes proyectos con financiación específica. Actualmente, sin embargo, los costes de la secuenciación han caído de manera espectacular, y se está desarrollando una nueva generación de equipos de secuenciación de escala intermedia diseñados específicamente para laboratorios de tipo medio. De manera paralela se están desarrollando multitud de aplicaciones y las principales limitaciones parecen estar en este momento más en la falta de herramientas informáticas específicas para las diversas aplicaciones.

En el ámbito de la microbiología la secuenciación masiva nos aporta la capacidad de secuenciar genomas completos de forma rápida y barata, pero además es una herramienta con una resolución sin precedentes para estudiar la diversidad genómica de los microorganismos.

En pocos años se habrán secuenciado centenares de genomas de MTB que nos darán una visión nueva de la especie, y facilitarán la selección de marcadores específicos para diversas aplicaciones. Además, el análisis de la diversidad permitirá:

- a nivel global estudiar la evolución y distribución geográfica de la micobacteria
- a nivel local trazar cadenas de transmisión monoclonales
- a nivel individual estudiar la evolución de las cepas en pacientes individuales

La incorporación de ésta tecnología a la rutina clínica no va a ser fácil, sin embargo probablemente en pocos años se considere imprescindible. Nuestro reto ahora es seleccionar la información útil para cada nivel y participar en el desarrollo de las herramientas informáticas pertinentes.

Palabras clave: secuenciación masiva, genoma, polimorfismos

MÉTODOS MOLECULARES DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DIRECTA EN DIFERENTES MUESTRAS CLÍNICAS Y AMBIENTALES.

Autor/es: Javier Aznar (1,2) y María José Torres (2).

Institución: H.U. Virgen del Rocío. Departamento de Microbiología. Universidad de Sevilla.

A pesar de los avances producidos en la última década en los métodos diagnósticos, para cumplir un doble objetivo: a) diagnosticar el mayor número de casos en el menor tiempo posible y b) detectar precozmente las resistencias especialmente, la tuberculosis continúa siendo uno de los principales problemas de salud de la humanidad especialmente en los países subdesarrollados. La lentitud y complejidad de los métodos diagnósticos, especialmente para la detección de cepas multirresistentes MDR-TB y XDR-TB (500.000 pacientes), y en los pacientes coinfectados por el VIH (1,37 millones) donde la enfermedad tuberculosa es baciloscopia negativa en una alta proporción de los casos, unidas a la falta de accesibilidad a los mismos en los países subdesarrollados son las principales causas del fracaso en el control global de la misma.

En este contexto la OMS ha implementado un plan de detección rápida de despistaje de pacientes con riesgo de multirresistencia donde se incluyen las técnicas moleculares como INNO-LiPA® Rif.TB, GeneXpert MTB/RIF® y GenoType® MTBDR. Las dos primeras pueden identificar a *Mycobacterium tuberculosis* y mutaciones en el gen *rpoB* con una sensibilidad \square 95% y casi 100% de especificidad en cultivos, pero el INNO-LiPA es menos eficaz cuando se aplica a muestras clínicas. Boehme et al., ha evaluado la eficacia del sistema GeneXpert MTB/RIF en 1730 pacientes en 5 centros diferentes de cuatro países con una alta prevalencia de tuberculosis y con tasas de resistencia elevadas. Este sistema identificó a más del 97% de los pacientes con tuberculosis con cultivo positivo, incluyendo al 90% de los pacientes con baciloscopia negativa. Así mismo identificó correctamente al 97,6% de los pacientes con cepas resistentes a rifampicina y al 98,1% de los pacientes con cepas sensibles. La sensibilidad en muestras respiratorias baciloscopia positiva fue del 100% y en baciloscopia negativa 68,6%, con una sensibilidad más baja (47.7%) en las muestras extrapulmonares baciloscopia negativa. Otros estudios encuentran sensibilidad del 25% en pacientes con tuberculosis pleural y del 96,7% en la linfadenitis tuberculosa, aunque el número de pacientes es bajo y deben confirmarse estos resultados.

Los sistemas Genotype MTDR y 2ª línea, permiten la identificación de *M.tuberculosis* y detectan las mutaciones en los genes que codifican la resistencia a rifampicina, isoniacida, etambutol, quinolonas, amikacina, kanamicina y capreomicina. En un meta-análisis de la primera versión de este sistema se estima una sensibilidad del 98% y especificidad del 98,7% para la detección de resistencia a rifampicina en cualquier subgrupo de pacientes y tipos de muestra, aunque la sensibilidad (84,3%) es más baja en el caso de la isoniacida pero su especificidad y consistencia es mayor (99,5%). Varios trabajos han evaluado, la versión Genotype MTDR plus, que incluye más sondas para el tipo salvaje del gen *rpoB* y para la detección de mutantes en la región promotora del gen *inhA*, tanto en muestras pulmonares baciloscopia positiva y negativa con un concordancia con los métodos convencionales para la rifampicina del 98% y del 96,2% para la isoniacida. Crudu et al., han evaluado la versión 2.0 del Genotype MTDR plus, que incluye cinco controles y 22 sondas específicas, en muestras respiratorias tanto baciloscopia positiva como negativa, encontrando una sensibilidad y especificidad para la rifampicina del 94,3% y 96% y para isoniacida del 95,5% y 88,9%. No existiendo diferencias significativas entre las muestras baciloscopia positiva y negativa.

Recientemente se ha evaluado la versión Genotype MTDRsl para la detección de resistencias a fluorquinolonas, etambutol y fármacos de segunda línea, tanto en cepas aisladas como en muestras clínicas con resultados variables dependiendo del fármaco.

Otra mejora que se ha incorporado, al diagnóstico de la tuberculosis multirresistente es la disponibilidad de sistemas de extracción, amplificación e hibridación automatizados como son GenoXtract, GXT DNA/RNA extraction kit y la tecnología GenoQuick.

Se han desarrollado dos nuevos sistemas de detección rápida del Complejo *M.tuberculosis* en muestras pulmonares y extrapulmonares, FluoroType® y la versión Beta del GenoQuickMTB, en las evaluaciones preliminares muestran

valores muy aceptables de sensibilidad y especificidad, pero que habrán de confirmarse en posteriores estudios. Nuestra limitada experiencia en muestras ambientales de esta última tecnología, nos permitió detectar la presencia de ADN del Complejo *M.tuberculosis*, en cinco (10,9%) muestras de agua de las 46 estudiadas de distintos bebederos en el Parque Nacional de Doñana en un estudio de tuberculosis animal.

El conocimiento de los genes implicados en la resistencia a los antituberculosos como: *rpoB* para rifampicina, *katG*, *inhA*, *ahpC* y *kasA* para isoniacida, *rpsL* para estreptomycin, *pncA* para pirazinamida y en el *gyrA* para quinolonas y de las mutaciones que codifican resistencia ha permitido desarrollar métodos moleculares aplicables para la detección de los mismos en cepas aisladas y más recientemente directamente en muestras clínicas, de forma que el diagnóstico y algunos datos de sensibilidad se pueden obtener en un período de 2-4 horas.

El sistema GeneXpert MTB/RIF® presenta las siguientes ventajas su sencillez, rapidez (2 h) y seguridad. Su coste elevado, la no detección de resistencias a isoniacida y la baja tasa de resistencia a rifampicina limitan su aplicación en nuestro medio. La versión 2.0 del Genotype MTDR plus tiene una eficacia elevada tanto en muestras respiratorias como extrapulmonares, tanto baciloscopia positiva como negativa, detecta la resistencia a isoniacida y proporciona información adicional sobre las mutaciones detectadas que puede ser útil en el estudio epidemiológico.

Independientemente del sistema utilizado todos los autores recomiendan la confirmación de los resultados por los métodos convencionales de determinación de la sensibilidad.

Finalmente, podemos concluir en primer lugar que estos sistemas están diseñados y han demostrado su eficacia en países con altas tasas de cepas MDR y XDR aunque su papel en países con bajas tasas de resistencia está por establecer. Sin embargo, en los primeros han demostrado que el grupo que potencialmente más se beneficiaría serían los pacientes baciloscopia negativos. En segundo lugar, la sensibilidad de los mismos, especialmente, para la detección de la resistencia a isoniacida dependerá de las variaciones geográficas y genéticas de las cepas resistentes. Por último carecemos de datos sobre si estos sistemas tienen impacto en el manejo clínico de los pacientes y en su evolución final, así como cual es su valor adicional sobre los métodos convencionales. Estos ensayos han demostrado sin ninguna duda su gran utilidad en cepas aisladas así como en muestras de esputos baciloscopia positivos, pero no se recomienda su uso en sustitución de los métodos convencionales.

INFECCIONES POR MICOBACTERIAS DE CRECIMIENTO RÁPIDO: UN PROBLEMA EMERGENTE QUE PUEDE DETERMINAR UNA REVISIÓN TAXONÓMICA EN EL GÉNERO.

Autor/es: Sylvia Cardoso Leao (1) y María Jesús García García (2).

Institución: (1) Universidade de Sao Paulo (Brasil), (2) Universidad Autonoma de Madrid (España).

El número de nuevas especies descritas en el género *Mycobacterium* ha sufrido un incremento muy importante desde los años 90, debido a la aplicación de la comparación de secuencias de genes conservados en la identificación de los aislados. Una gran mayoría de especies nuevas descritas recientemente, en base al análisis mencionado, pertenecen al grupo de micobacterias de crecimiento rápido (MCR).

Las MCR se han descrito asociadas a diferentes procesos en patología infecciosa humana, en algunos casos causando brotes o pseudobrotes epidémicos importantes secundarios a procedimientos quirúrgicos no bien controlados.

Recientemente se describieron en diferentes ciudades de Brasil más de 2000 casos de patología infecciosa asociada a cirugía plástica, identificándose los aislados en los primeros años como pertenecientes al grupo *M. chelonae-M. abscessus*, en particular como *M. abscessus* PRA-tipo2. Estos últimos aislados, se vio que presentaban características similares a dos nuevas especies: *M. massiliense* y *M. bolletii*. Con el fin de determinar a cual de dichas especies pertenecían, se realizó un estudio comparativo de algunos aislados con las cepas-tipo del complejo *M. chelonae-M. abscessus*. La aplicación de la hibridación DNA-DNA a las cepas, evidenció que las dos nuevas especies constituían, en realidad, una subespecie de *M. abscessus*, por tanto no debían considerarse como especies diferenciadas (1,2).

La hibridación DNA-DNA es un procedimiento clásico que aún no ha sido reemplazado por ningún otro método como procedimiento para delimitar especies bacterianas.

La aplicación de métodos de comparación de genomas bacterianos completos, utilizando el algoritmo de orden de genes (MAUVE), demostró que la reorganización de genes en el genoma es un factor importante que participa en la especiación bacteriana, en particular en bacterias pertenecientes al orden Actinomycetales. Este hecho permite explicar porque la hibridación DNA-DNA sigue aún siendo el estándar de oro en la descripción de especies bacterianas.

Referencias:

- 1.- S.C. Leao et al. *J Clin Microbiol.* 47 (9):2691-2698. 2009.
- 2.- S.C. Leao et al. *IJSEM.* 61: 2311-2313. 2011.
- 3.- J.C. Garcia-Betancur et al. *Inf Gen Evol.* doi:10.1016/j.meegid.2011.09.024. 2011.

Palabras clave: *M. abscessus*, Genomas completos, Clasificación.

IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS MEDIANTE MÉTODOS MOLECULARES SPEED-OLIGO MYCOBACTERIA

Autor/es: Pablo Mendoza López.

Institución: VIRCELL.

La identificación de la especie de micobacteria responsable de la infección y la diferenciación entre especies ambientales o patógenas es importante desde el punto de vista diagnóstico, epidemiológico, clínico y terapéutico. Las medidas de control, el manejo clínico y el tratamiento antibiótico difieren radicalmente entre infecciones producidas por *Mycobacterium tuberculosis* (TB) o por otras especies (MOTT), por lo que una identificación rápida y correcta es fundamental. Adicionalmente, la identificación rápida de las especies MOTT más frecuentemente aisladas ayuda al clínico a valorar el resultado de laboratorio.

Speed-Oligo MYCOBACTERIA es un test molecular basado en hibridación de un producto de PCR con sondas específicas sobre una membrana de nitrocelulosa (DNA line probe assay) para la diferenciación de *Mycobacterium* spp. a partir de cultivos. Comparado con otros line-probe assays identifica un número de especies más limitado, pero es significativamente más simple y rápido.

El método se divide en ; 1) Extracción de ADN desde el aislado 2) Amplificación por PCR utilizando un PCR master mix liofilizado de las genes diana y el control de amplificación interno 3) Hibridación del producto de PCR a sondas específicas mediante un procedimiento en “dip-stick” 4) Lectura e interpretación automática del resultado tras 5 min.

La diana utilizada por el método para la diferenciación de especies es la región ITS16S–23S rRNA, adicionalmente un fragmento conservado del 16S rRNA es utilizado para la identificación genérica de *Mycobacterium* spp. El test detecta hasta 12 especies diferentes mediante el uso de seis sondas específicas en una tira; la mayor ventaja es la detección muy simple tras aplicar directamente el producto de PCR desnaturalizado sobre la tira reactiva, reduciendo considerablemente el tiempo de ejecución y el riesgo de contaminación. Los resultados se obtienen en un tiempo de 2 h con un “hands-on time” de 25 min.

Una de las mayores limitaciones de Speed-Oligo MYCOBACTERIA es que diferencia un reducido grupo de especies del espectro *Mycobacterium* comparado con otros line-probe assays, y que la diferenciación de algunas especies es sólo hasta el nivel de complejos o grupos. Estas limitaciones son resueltas en la nueva versión del test donde aumenta el número de especies y se identifica hasta el nivel de especie todos los complejos.

Palabras clave: Identificación molecular, Speed-Oligo, Line Probe Assay

DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE LA PLATAFORMA MOLECULAR X-RIOT PARA LA DETECCIÓN DE TUBERCULOSIS MULTI-RESISTENTE A DROGAS

Autor/es: Iván Hernández-Neuta, Andrés Varela, Anandi Martin, Juan Carlos Palomino and Patricia Del Portillo Obando.

Institución: Corporación CorpoGen, Carrera 5 # 66^a-34, Bogotá, Colombia.

De acuerdo al último reporte del Control Global de la Tuberculosis, la resistencia adquirida a drogas en *Mycobacterium tuberculosis* continúa siendo uno de los mayores retos para el control de la enfermedad. Los avances recientes en la detección de resistencia a drogas se han enfocado en reducir el tiempo total del diagnóstico, aumentar los niveles de sensibilidad e identificar nuevas mutaciones asociadas a los genes blanco de los antibióticos. Algunas de las pruebas moleculares desarrolladas han sido aceptadas por la Organización Mundial de la Salud. Sin embargo, su implementación en países en vías de desarrollo es difícil debido a sus altos costos y requerimientos técnicos.

Este trabajo presenta la estandarización de una metodología basada en hibridación reversa en línea que permite identificar mutaciones asociadas a resistencia a drogas de primera y segunda línea en *M. tuberculosis*. El ensayo incluye 17 sondas de oligonucleótidos covalentemente ligadas a una membrana de nylon Biodyne C las cuales identifican las mutaciones más relevantes presentes en los genes *rpoB*, *katG*, *inhA*, *gyrA*, *gyrB* y *rrs*. Los fragmentos génicos fueron amplificados usando dos reacciones de PCR múltiplex por muestra y el ensayo fue estandarizado usando 19 muestras de ADN extraídas de aislados clínicos en los cuales las mutaciones habían sido caracterizadas por secuencia de nucleótidos. Además se adaptó un método para cuantificar las señales obtenidas usando el software AGscan, haciendo posible determinar los puntos de corte para todas las sondas y con la ayuda de un script diseñado fue posible obtener los resultados finales en términos de sensible/resistente o silvestre/mutante para cada muestra.

Al comparar los resultados de la prueba con los datos de susceptibilidad a drogas, se obtuvieron los siguientes valores de sensibilidad/especificidad: 100/100% para rifampicina, 100/94% para isoniazida, 70/100% para ofloxacina, y 100/92% para kanamicina y capreomicina. Comparando los resultados con los datos de secuenciación se obtuvo un 100% de concordancia. Estos valores son comparables con los métodos disponibles comercialmente mostrando el potencial que tiene este método.

Las ventajas principales del método propuesto son: capacidad de correr 41 muestras simultáneamente, una réplica técnica en el mismo ensayo y el uso de un procedimiento ampliamente conocido en laboratorios de referencia de Tuberculosis.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*; Tuberculosis; Resistencia a drogas

IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE RESISTENCIA A FÁRMACOS POR TECNOLOGÍA DE MICROARRAY EN LA PLATAFORMA INFINITY

Autor/es: Goosen López López.

Institución: Hospital Universitario La Paz – Madrid.

Introducción:

La detección rápida de resistencias a fármacos en *M. tuberculosis complex*, favorece a una actuación rápida tanto a nivel epidemiológico como terapéutico, lo cual favorece el mejor control de la enfermedad, o la adecuación del tratamiento.

Las técnicas convencionales tienen el inconveniente del tiempo de respuesta, debido al lento crecimiento del bacilo, tanto para la identificación como para la realización de los test de sensibilidad *in vitro*.

La implementación de técnicas comerciales podría ser una alternativa en estos casos y podría emplearse en muestra directa, aportando información adicional que en algunos casos puede ser de gran utilidad.

Material y métodos:

Explicación técnica, características y tiempos de respuesta. Está basada principalmente en los pósters científicos presentados en bibliografía.

Todos los ensayos realizados partían de cepa congelada, con distintos tipos de sensibilidad, (en total se hicieron 3 estudios de n=97, 103 y 357 en distintos ámbitos geográficos), haciendo alicuotas, hervidas y centrifugadas, a partir del sobrenadante, se hizo amplificación con primers específicos para detección competitiva de regiones wildtype y mutantes para los siguientes genes: *rpoB* (5 genotipos), *katG* (codón 315-S), *inhA* (gen *inhA1-5*) y gen *pncA* (2 genotipos). Workhands: 1h23 de PCR.

Una vez hecha la PCR, se transfirieron 9 μ L del amplificado al BioFilmChip para su lectura en el equipo (plataforma) según especificaciones. Resultado en \approx 1h30.

Se comprobaron los genes de resistencia por secuenciación.

Resultados:

En el primer estudio (n=97), con 25 cepas pansensibles, detectó el 88,9% de las resistencias a RFP, no detectó 7 cepas con resistencias de baja frecuencia.

En el segundo estudio (n=103), con 41 cepas pansensibles, se mejoró la sensibilidad del test y detectó el 100% de las resistencias a RFP, además del 80% de resistentes a INH (32/40) y diferenció adecuadamente *M. bovis* de MTBc (7/7)

El tercer estudio (n=357), con 316 cepas pansensibles, realizado en 2009; detectó 99,2% de cepas resistentes a INH (34/35), el 100% de cepas resistentes a RFP (21/21). Detectando 18/19 cepas MDR.

Conclusiones:

- Detección de alelos de *katG315* y wildtype de *mabA* e *inhA*
- Sensibilidad global INH+RFP: 91,1%; Especificidad global: 99,7%; VPP: 96,2% y VPN: 99,2%
- Identificación de la especie *M. bovis* perteneciente al complejo gracias al gen *pncA*
- Posibilidad de realizar en muestra directa con baciloscopia positiva (aún es estudio)

Palabras clave: microarray, tuberculosis multirresistente, micobacterias no tuberculosas (NTM)

Bibliografía:

1. American Society for Microbiology Annual Meeting, Atlanta, GA (May 2005). An automated microarray platform for detection of mycobacterium tuberculosis and *rpoB* gene mutation for drug resistance. Peter et al. San Diego County Public Health Laboratory, San Diego, CA.
2. ICAAC/IDSA Washington, DC (Oct 2008). Evaluation of the AutoGenomics INFINITI™ Platform and MTBDR Test Kit for the Rapid Detection of Mutations Related to Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. Huard et al. Clinical Microbiology Service, Department of Pathology, NewYork- Presbyterian Hospital, Columbia University Medical Center, New York, NY.
3. IDSA Philadelphia, PA (Oct 2009). Rapid Molecular Detection of Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis Strains from Rio de Janeiro, Brazil, Using the AutoGenomics Infiniti™ Platform and MDRTB Test Kit. Lazzarini et al. Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

UTILIDAD DE LA PIROSECUENCIACIÓN EN LA DETECCIÓN DE RESISTENCIA DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS A FÁRMACOS DE PRIMERA Y SEGUNDA LÍNEA

Autor/es: José Domínguez.

Institución: Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona.

Uno de los factores para el control de la expansión de la tuberculosis (TB) radica en un diagnóstico precoz junto a una rápida detección de las resistencias, para poder así tratar adecuadamente a los pacientes, romper la cadena de transmisión, y evitar la aparición y expansión de las cepas resistentes. El lento crecimiento de *M. tuberculosis* provoca que se retrase varias semanas el resultado del estudio de susceptibilidad a los antimicobacterianos. De forma que si un paciente está enfermo con una cepa multiresistente o extremadamente resistente, el riesgo que la transmita y la contagie a otros pacientes antes de que detectemos esta situación es elevado, teniendo en cuenta además que en muchos casos corresponde a población inmigrante que vive en condiciones de hacinamiento. Las cepas de *M. tuberculosis* multiresistente (MDR), resistentes al menos a isoniacida y rifampicina, que son dos de los principales fármacos de primera línea han aparecido en todo el mundo y representan un problema para los programas de prevención y control de la TB.

Actualmente existen diferentes métodos para el estudio de sensibilidad a los fármacos antituberculosos. En la actualidad el método de las proporciones y los sistemas automatizados en medio líquido son los de mayor difusión y aceptación. Estos sistemas permiten disponer de los resultados en 15-20 días desde el aislamiento de la cepa de *M. tuberculosis*. Al considerar los fármacos de segunda línea, los métodos actuales para detectar perfiles de resistencia no están suficientemente estandarizados de manera que la comparación entre tasas de incidencia entre las diferentes áreas geográficas es difícil.

Diversos estudios genéticos han demostrado que las resistencias a los fármacos antituberculosos se deben a mutaciones cromosómicas en los genes que codifican la diana del fármaco, o bien a enzimas implicadas en los mecanismos de activación del mismo. Se han descrito mutaciones puntuales, deleciones e inserciones, y la acumulación secuencial de estas alteraciones explicaría el fenómeno de multiresistencia. El conocimiento de estos mecanismos moleculares de resistencia es imprescindible para poder desarrollar técnicas moleculares que permitan su detección precoz. De hecho, en los últimos años se ha producido un avance importante en lo referente a los métodos de detección molecular y algunos de estos ensayos se encuentran en fase de comercialización, mientras que otros son técnicas in house. En general, los resultados obtenidos por las técnicas genotípicas no pueden sustituir los métodos fenotípicos, ya que no todos los mecanismos de acción son conocidos, y por tanto tampoco son conocidas todas las mutaciones específicas implicadas. Sin embargo, en la situación actual, una técnica molecular capaz de detectar en muestra clínica directa las mutaciones más comunes asociadas a resistencia sería de un valor incalculable.

En este sentido, la pirosecuenciación se ha mostrado en los últimos años como una tecnología útil en la detección de mutaciones puntuales en el genoma micobacteriano permitiendo identificar a nivel de especie y determinar la presencia de las mutaciones más frecuentemente asociadas. Existen algunos estudios que demuestran la utilidad de esta tecnología para la detección de resistencias a diversos fármacos a partir de aislados clínicos de *M. tuberculosis*. Por lo tanto, la pirosecuenciación puede ser una alternativa real a las técnicas actuales, que nos permita detectar en *M. tuberculosis* las mutaciones más frecuentemente asociadas a resistencia a los fármacos antituberculosos a partir de muestra directa y aislado clínico.

IDENTIFICACION DE ANTÍGENOS OLIGOESPECIFICOS DE MYCOBACTERIUM LEPRAE

Autor/es: Iris Estrada García, Jeanet Serafin-López, Moisés Talavera-Paulín, Sergio Estrada-Parra

Institución: Depto. de Inmunología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N. Prol. De Carpio y Plan de Ayala s/n. México, D.F., 11330. México.

La lepra es una enfermedad infecciosa que afecta a la piel y a los nervios periféricos causando diferentes niveles de invalidez. Es curable con poliquimioterapia (dapsona, clofazimina y rifampicina). Desde la introducción del tratamiento por la OMS la prevalencia de la enfermedad ha disminuido, pero su incidencia se ha mantenido, reportándose 228, 000 casos nuevos en el 2010.

El agente causal de la lepra es el *Mycobacterium leprae*, descrito en 1873 por A. Hansen, aún no se ha logrado cultivar *in vitro*. Al no existir una prueba de diagnóstico rápida los casos activos se diagnostican tardíamente, perpetuando la transmisión de la enfermedad. *M. habana* es una micobacteria cultivable no patógena que comparte antígenos (Ags) con *M. leprae*, y que se ha usado como vacuna contra la lepra en el modelo murino de lepra. Con la intención de identificar antígenos de reacción cruzada entre *M. habana* y *M. leprae* útiles para desarrollar una prueba para diagnóstico serológico, se usaron sueros de pacientes con lepra lepromatosa (LL) y extractos antigénicos de *M. habana*.

Usando la técnica de Western Blot (WB) y extractos separados en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en una dimensión, se identificó una banda de 28 KDa que reaccionó con el suero de pacientes LL con un 100 % de especificidad y un 83 % de sensibilidad. Sólo un 3% de los sueros de convivientes intra-domiciliarios sanos de pacientes con lepra dieron una reacción positiva con el Ag de 28 KDa. Empleando WB y geles SDS-PAGE en dos dimensiones (2D), así como espectrometría de masas (MS), la banda de 28 KDa resultó estar constituida por dos proteínas: 1) la enoil-CoA hidratasa (ML2498) y 2) el Ag 85B (micoiltransferasa; ML2028).

Consideramos que estas proteínas son candidatos atractivos para desarrollar pruebas serológicas para la lepra.

Palabras clave: lepra antígenos serología

BIOPELÍCULAS Y MICOBACTERIAS: IMPORTANCIA EN LA PATOGENIA Y EL TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR ESTOS ORGANISMOS.

Autor/es: Jaime Esteban.

Institución: Departamento de Microbiología Clínica. IIS-Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

El género *Mycobacterium* incluye en la actualidad aproximadamente 150 especies de las cuales la gran mayoría son bacterias cuyo hábitat natural es ambiental que sólo ocasionalmente causan enfermedad en humanos. La excepción a esta característica la constituye la especie tipo del género –*Mycobacterium tuberculosis*– y los miembros de su complejo, junto con alguna otra especie como *M. leprae*. En su entorno natural, las micobacterias denominadas “atípicas” (MA) se encuentran habitualmente formando parte de biopelículas polimicrobianas, donde establecen relaciones simbióticas aun no bien conocidas con otros organismos que facilitan la supervivencia de estos organismos en entornos que pueden resultar hostiles como consecuencia de la presencia de sustancias desinfectantes tales como el cloro en los sistemas de distribución de aguas.

Cuando las MA causan infecciones en humanos se comportan como patógenos oportunistas, requiriendo para causar enfermedad la existencia de factores de riesgo en el huésped, tales como inmunosupresión, alteraciones anatómicas, enfermedades subyacentes o presencia de biomateriales. En alguna de estas circunstancias se sabe que, en otros casos, la capacidad de formar biopelículas resulta un factor patogénico fundamental para el desarrollo de la infección. Recientemente se ha demostrado que dicha capacidad tiene también una importancia fundamental en algunas de las infecciones causadas por MA, tales como la infección pulmonar en pacientes con patologías subyacentes (especialmente fibrosis quística) o en infecciones relacionadas con diversos tipos de implantes, incluyendo desde catéteres intravasculares a prótesis osteoarticulares.

Existen diversos estudios que han profundizado en los mecanismos moleculares de formación de biopelículas por parte de estos organismos (especialmente en *M. smegmatis*), habiendo demostrado dichos trabajos la importancia del metabolismo lipídico en la formación de la biopelícula. En particular se ha determinado la importancia crucial de los glicopeptidolípidos de la pared bacteriana. También se conoce el hecho de que los ácidos micólicos forman parte esencial de la matriz extracelular de dicha estructura. Más recientemente se ha demostrado incluso la capacidad de *M. tuberculosis* de formar biopelículas. El papel de esta capacidad en el desarrollo de la enfermedad humana se encuentra todavía pendiente de establecer.

La importancia clínica de las biopelículas de micobacterias se extiende a otros aspectos, tales como el diagnóstico (es esencial el procesamiento de los implantes para determinar la presencia de la micobacteria, que puede no detectarse en los tejidos) y, especialmente, en el tratamiento. Las micobacterias en estado sésil son mucho más resistentes a antibióticos que en estado planctónico, debiéndose dicha resistencia a la combinación de diversos mecanismos. Es especialmente importante la existencia de estados metabólicos diferenciados, y aparentemente es poco importante la impermeabilidad de la biopelícula a los antimicrobianos.

El conocimiento de las biopelículas formadas por micobacterias se encuentra todavía en una fase inicial, quedando abiertas múltiples interrogantes. Su estudio permitirá en el futuro un mejor manejo de los pacientes con infecciones causadas por estos organismos, que podría incluso extenderse a la propia enfermedad tuberculosa.

Palabras clave: Micobacterias, biopelículas, patogenia, resistencia

EL SISTEMA DIVERSILAB EN LA TIPIFICACIÓN DE M. TUBERCULOSIS.

Autor/es: Pere Coll.

Institución: Servicio de Microbiología. Hospital de Sant Pau. Barcelona.

La genotipificación de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* se basa en el estudio de secuencias repetidas a intervalos (Interspersed repeats), de forma directa (spoligotyping) o parecida a las secuencias de inserción (IS6110-RFLP), o bien en tandem (MIRU-VNTR). A pesar de que el genoma de los miembros del complejo tuberculosis está muy conservado, se han detectado polimorfismos de un único nucleótido (SNP) o de secuencias amplias (LSP: análisis de deleciones) que también se utilizan para la tipificación.

El reloj biológico de un marcador tiene que ser adecuado para clasificar a las cepas no relacionadas como distintas y lo suficientemente lento para clasificar a las cepas relacionadas como agrupadas y esta adecuación será diferente según se trate de estudios a muy corto plazo (estudio de brotes o de contaminación cruzada en el laboratorio) o estudios a medio o largo plazo (dinámica de transmisión en una población, estudios filogenéticos). El objetivo de este estudio es la evaluación de un sistema de rep-PCR comercializado (DiversiLab. BioMerieux).

Material y Métodos:

Se han estudiado 76 cepas previamente caracterizadas por IS6110-RFLP de las cuales 41 tenían un patrón huérfano y 35 estaban agrupadas en 15 clusters. En 9 de las 15 agrupaciones (22 cepas) se encontró relación epidemiológica mediante el ECC, mientras que no fue así en las 6 agrupaciones restantes (13 cepas).

El sistema DiversiLab utiliza un iniciador complementario de una secuencia repetida que hibrida en múltiples lugares del DNA cromosómico y da lugar, por PCR, a amplificadores de distintos tamaños. Los amplificadores son separados mediante electroforesis y detectados en un chip con tecnología de micro fluidos (Agilent 2100 Bioanalyzer). El análisis de los patrones obtenidos se realiza mediante el programa Web-based DiversiLab que utiliza el coeficiente de correlación de Pearson y el algoritmo UPGMA. Los resultados se expresan como electroferogramas, imágenes de geles virtuales o dendrogramas.

Resultados:

De las 41 cepas con patrón huérfano por IS6110-RFLP, se obtuvieron 29 patrones por DiversiLab. Ventiseis eran patrones únicos mientras que 3 patrones incluían agrupaciones (dos de 4 cepas y una de 7). En 11 cepas el patrón era idéntico al de la agrupación y en 4 presentaba una diferencia de 1 banda. El índice de diversidad de Simpson fue del 0.95. Los nueve clusters confirmados por ECC se mantuvieron agrupados por DiversiLab, mientras que 2 de los 6 clusters sin relación epidemiológica por ECC fueron divididos.

Discusión:

DiversiLab es una técnica que tiene la ventaja de estar basada en la PCR (necesita de una menor cantidad de DNA), posee una buena estandarización (reproducibilidad), es relativamente rápida y sencilla. Sin embargo, presenta un poder discriminativo inferior al del IS6110 RFLP por lo que puede utilizarse como cribado pero sería conveniente confirmar las agrupaciones detectadas con otros marcadores.

Es conocida la baja correlación que suele existir entre los datos del ECC y de la epidemiología molecular. Una de las razones es el papel que juegan en la transmisión de la infección contactos casuales difíciles de detectar por ECC. Por otra parte, en nuestra experiencia, estas dos aproximaciones estudian poblaciones en buena parte distintas por lo que las cadenas de transmisión detectadas no son coincidentes. Es llamativo como DiversiLab mantiene las nueve agrupaciones confirmadas por ECC mientras que rompe 2 de los 6 clusters sin confirmar por ECC. Existen diversos estudios en los que la utilización de segundos marcadores rompe alguna de estas agrupaciones sin soporte epidemiológico. Estos casos no relacionados podrían haberse infectado de forma independiente por cepas muy prevalentes en la población estudiada.

Palabras clave: DiversiLab, Tipificación, *Mycobacterium tuberculosis*

TEST DE SUSCEPTIBILIDAD CUANTITATIVO DE 1ª Y 2ª LÍNEA PARA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS USANDO LO BACTEC MGIT 960 CON SOFTWARE TB EXIST : UN PROTOCOLO EN DESARROLLO EN EUROPA

Autor/es: Miguel Viveiros, Emmanuelle Cambau y Erik Boettger en nombre del Grupo Europeo de Estudio “Quantitative Drug Susceptibility Test with TB eXiST software”

Institución: Grupo de Micobacterias da Unidade de Microbiologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, Rua da Junqueira, 100,1349-008 Lisboa, Portugal.

En todo el mundo, la actual epidemia de tuberculosis se caracteriza por una alarmante aparición de resistencia a los medicamentos antituberculosos. Dada las limitadas opciones terapéuticas en los casos de tuberculosis multiresistente (MDR) y especialmente en los casos de tuberculosis extensamente resistente (XDR), hay una urgente necesidad de definir los niveles de resistencia y los mecanismos presentes en aislados clínicos considerados como resistentes a los medicamentos antituberculosos a fin de facilitar decisiones terapéuticas rápidas y efectivas, para prevenir la aparición/transmisión de mas casos resistentes. Los casos de cepas resistentes a los medicamentos antituberculosos van en aumento, la simple clasificación en cepas “sensibles” y “resistentes”, basada en pruebas de susceptibilidad contra “concentraciones críticas” tiene que ser reconsiderada y un requisito indispensable para fundamentar esa reconsideración es la capacidad técnica para determinar exactamente los niveles de resistencia a los medicamentos en aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*.

La instrumentación MGIT 960 acoplada al software de EpiCenter equipado con el módulo TB eXiST permite las condiciones ideales para la determinación cuantitativa de la susceptibilidad a los medicamentos antituberculosos de primera y segunda línea para cada aislado clínico de *M. tuberculosis*.

Un grupo de usuarios europeos del software de EpiCenter-TBeXist están efectuando un análisis comparativo de una gama de aislados clínicos resistentes y sensibles bien caracterizados genotípicamente (mutaciones caracterizadas por PCR y secuenciación) para definir y testar un protocolo común para establecer y desarrollar criterios para la aplicación e interpretación de un “test de susceptibilidad cuantitativo - qDST” utilizando el sistema MGIT 960-Epicenter - TBeXist.

Los resultados obtenidos en el estudio de calibración y aptitud inter-laboratorios ha demostrado la robustez del protocolo y del sistema revelando que qDST es un sistema totalmente automatizado, con administración electrónica de los datos y con criterios de interpretación simples e intuitivos, siendo un importante instrumento para guiar la quimioterapia de las infecciones micobacterianas, en particular de las infecciones resistentes a los medicamentos antituberculosos. Estudios clínicos y de laboratorio prospectivos seran ahora necesarios para correlacionar los datos de la determinación de los niveles de resistencia in-vitro con el “Clinical Outcome” in-vivo.

Palabras clave: Tuberculosis resistente; quantitativeDST, TBeXist.

VIGILANCIA MOLECULAR DE LA TUBERCULOSIS MULTI-RESISTENTE EN EUROPA

Autor/es: Sofia Samper, Maria Soledad Jiménez, María José Iglesias y el Grupo de Trabajo de Tuberculosis Multirresistente.

Institución: Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Instituto de Salud Carlos III.

La OMS en 1994 implementó un programa de vigilancia de resistencias que de manera rutinaria recoge datos y analiza las resistencias detectadas en los distintos países. Como dato alarmante, el último informe de 2012 que incluye datos de 80 países y 8 territorios, recoge el mayor índice de tasas de multi-resistencia desde su inicio (1).

Desde enero de 1998, en España se realiza de forma sistemática el estudio genético de cepas de *M. tuberculosis* complex, multi-resistentes a los fármacos, en coordinación con el Instituto de Salud Carlos III de Madrid, donde se informan los casos idénticos que aparecen entre diferentes comunidades autónomas. Esta red de vigilancia molecular de la tuberculosis multi-resistente en España la forman voluntariamente los laboratorios de micobacterias del Sistema Nacional de Salud (2). Este sistema de alerta de brotes de tuberculosis multi-resistente posibilita la detección de epidemias en nuestro país o en el país de origen de nuestros inmigrantes (3).

En Europa, el ECDC trabaja en ello desde 2008, y coordina junto con el RIVM de Holanda, el mantenimiento de una base de datos de tuberculosis multi-resistente, que contiene los patrones genéticos de la cepas de tuberculosis multi-resistentes aisladas en los laboratorios de la Unión Europea, donde se posibilita la comparación de cada nuevo caso. El intercambio de datos hace posible detectar brotes entre diferentes países (4). En 2009, se acordó utilizar como método de tipificación el MIRU-VNTR 24. Se ha participado en controles de calidad de esta técnica. Se realizó ya la técnica de MIRU-VNTR 24, a los aislados de 2009 en adelante, y se realizó un segundo control de calidad de dicha técnica coordinado por el proyecto Europeo de Vigilancia de la tuberculosis MDR, desde Holanda RIVM-ECDC.

Los aislados tipificados mediante MIRU-VNTR 24 se incluyen periódicamente en la Base de Datos Europea. En Enero de 2012, España había introducido los casos retrospectivamente desde 2006, 242 casos con 200 patrones MIRU-VNTR diferentes, de un total de 1176 casos europeos. Los genotipos de 26 aislados españoles estarían formando parte de 13 clusters europeos. En 6 de estos clusters la cepa involucrada pertenecía a la familia Beijing. 5 de los 11 casos aislados en España pertenecientes a estos clusters, correspondían a pacientes nacidos en países del Este de Europa, 3 eran de origen desconocido, 1 en Nepal y 2 en España. Otros 17 patrones de esta familia, no detectados introducidos en la Base de Datos Europa se aislaron en nuestro país, encontrándose como aislados únicos, excepto en un caso que presentada 2 aislados. La posibilidad del seguimiento de estos casos puede hacerse desde el Centro Nacional de Epidemiología.

En colaboración con laboratorios de referencia Latinoamericanos, en una red apoyada por Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo, se compararon también los genotipos de aislados multi-resistentes, y como diferencias a resaltar se vieron, que las cepas mas prevalentes en aquellos países están circunscritas a su territorio (5).

El ECDC en su nuevo programa para luchar contra la enfermedad ve importante la continuidad de los estudios moleculares.

Referencias:

1. Zignol M., van Gemert W., Falzon D., Sismanidis C., Glaziou P., Floyd K. and Raviglione M. 2012. Surveillance of anti-tuberculosis drug resistance in the world: an updated analysis, 2007–2010. *Bull World Health Organ* 90:111–119.
2. Gavín P., Iglesias M.J., Jiménez M.S., Rodríguez-Valín E., Ibarz D., Lezcano M.A., Revillo M.J., Martín C., Samper S.; on behalf of The Spanish Working Group on MDR-TB. 2011. Long-term molecular surveillance of multidrug-resistant tuberculosis in Spain. *Infect Genet Evol.* May 27
3. Gavín, P., Iglesias, M.J., Jiménez, M.S., Herrera-Leon, L., Rodríguez-Valín, E., Rastogi, N., March, J., González-Palacios, R., Palenque, E., Ayarza, R., Hurra, E., Campos-Herrero, I., Vitoria, M.A., Lezcano, M.A., Revillo, M.J., Martín, C., Samper, S., 2009. Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis strain from Equatorial Guinea detected in Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1858–1860.
4. Devaux I., Kremer K., Heersma H., van Soolingen D. 2009. Clusters of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis cases, Europe. *Emerg Infect Dis* 15:1052-60.
5. Ritacco V., Iglesias M.J., Ferrazoli L., Monteserin J., Dalla Costa E.R., Cebollada A., Morcillo N., Robledo J., de Waard J.H., Araya P., Aristimuño L., Díaz R., Gavín P., Imperiale B., Simonsen V., Zapata E.M., Jiménez M.S., Rossetti M.L., Martín C., Barrera L., Samper S. 2011. Conspicuous multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis cluster strains do not trespass country borders in Latin America and Spain. *Infect Genet Evol.* Jun 21.

Palabras clave: Tuberculosis multirresistente, Epidemiología Molecular

GENOTYPE MTBDRPLUS VERSION 2.0 AND FLUOROTYPE MTB-NEW DEVELOPMENTS FOR HIGH SENSITIVE TB-DIAGNOSTIC

Autor: Dr. Michael Weizenegger.

Institucion: Laboratory Group Limbach, Heidelberg, Germany. Department of Microbiology and Molecular Genetic.

The commercially available assays FluoroType MTB and a new version of the GenoType MTBDRplus VER. 2.0 (Hain Lifescience, Germany) are high sensitive assays for direct detection of Mycobacterium tuberculosis(Mtb)-DNA.

The FluoroType MTB is targeting the IS 6110 element, which appears in multiple copies in Mtb. The assay runs on DNA either isolated fully automated on a GenoXtract instrument or manually with the FluoroLyse technique. Amplification and detection is done on a FluoroCycler (Hain Lifescience) using melting curve fluorescence Hybeacon-probe technology. Results are software based automatically interpreted regarding positivity, negativity and validity (internal amplification control). Clinical evaluation of this assay (Eigner et al.) done on pulmonary and extrapulmonary specimens yielded in very high sensitivity and specificity values of 96.8% and 98.8% for smear negative samples.

The MTBDRplus VER. 2.0 is an improved version of a line probe assay for direct detection of Mtb and drug resistance for rifampicin(RMP) and isoniazid(INH). This version now includes a ready to use amplification mix and achieves by redesigning primer and probes a higher sensitivity. Users have the possibility of fully automated (GenoXtract) or manual (FluoroLyse) DNA isolation.

The assay can either be implemented for direct detection of Mtb and drug susceptibility testing (DST) or applied to Mtb isolates derived from culture.

Crudu et al. 2012 validated the new assay on pulmonary specimens in a high Mtb drug resistance setting in Moldova. The focus was on detection of patients with negative microscopy result, but either culture or clinical positivity for Mtb.

Crudu et al. achieved an overall sensitivity of 87.8%, for smear negative samples of 79.6% and specificity values of 99.2%. RMP could be detected with a sensitivity of 94.4%, INH with a sensitivity of 91.4%.

We conclude that both assays are high sensitive for the detection of MTB also in smear negative samples. The MTBDRplus VER. 2.0 has the additional feature of sensitive genetic based identification of resistance to RMP and INH.

Both assays are fully ready to use kits and all steps can be automated.

Palabras clave: Mycobacterium tuberculosis, PCR, susceptibility testing

DESARROLLO DE NUEVOS ANTITUBERCULOSOS.

Autor/es: Alfonso Mendoza.

Institución: DDW GlaxoSmithKline.

Hasta la fecha los intentos para desarrollar nuevos fármacos con los que tratar las enfermedades del mundo en desarrollo se han llevado a cabo de una forma fragmentada y carente de una estrategia global. A pesar de los recursos destinados para ello, los avances han sido limitados.

El centro que GlaxosmithKline ha creado en Tres Cantos se pretende fomentar las interacciones entre la empresa y centros académicos para desarrollar nuevas ideas que conduzcan al descubrimiento de fármacos para tratar enfermedades del mundo en desarrollo.

En el campo de la tuberculosis los principales objetivos son identificar nuevos compuestos que administrados en combinación reduzcan la duración del tratamiento siendo además activos frente a cepas M(X)DR.

Para ello GSK cuenta con un grupo de científicos que cubren todas las fases del desarrollo de un fármaco (química, biología, bioquímica, toxicología, ensayos clínicos, desarrollo de ensayos y evaluación in vivo/in vitro así como instalaciones de high through-put screening), siguiendo tanto abordajes basados en célula entera como en el desarrollo racional frente a dianas.

INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE MTBVAC COMO NUEVA VACUNA CONTRA LA TUBERCULOSIS

Autor/es: Ainhoa Arbues, Jesús Gonzalo, Ignacio Aguiló, Dessi Marinova y Carlos Martín
<http://genmico.unizar.es/>

Institución: CIBERES, Departamento de Microbiología. Hospital Miguel Servet. Universidad de Zaragoza

Introducción/objetivos:

En la última década importantes esfuerzos en investigación han dado como resultado el diseño y construcción de nuevos candidatos a vacunas contra tuberculosis. La actual vacuna contra la tuberculosis, BCG, es una vacuna viva atenuada en uso desde hace más de 90 años ya que protege contra las formas más graves de la enfermedad. La eficacia de BCG es muy variable contra las formas de tuberculosis pulmonar, por lo que la investigación y desarrollo de nuevas vacunas es un reto importante para la comunidad científica. El objetivo es desarrollar una nueva generación de vacunas eficaces contra las formas respiratorias de la enfermedad, responsable de transmisión de la tuberculosis.

Material y método:

El desarrollo de la genética de micobacterias permite la construcción de nuevas vacunas vivas mediante inactivación de los genes implicados en virulencia de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Para ello nos propusimos atenuar racionalmente MTB y cumpliendo con el Consenso de Ginebra que recomienda “la presencia de dos mutaciones independientes y no reversibles en vacunas vivas derivadas del bacilo de la TB”. Para ello inactivamos los genes *phoP* y *fadD26* en una cepa clínica de MTB. El gen *phoP* es un regulador de virulencia responsable del control de aproximadamente el 4% de los genes de MTB 1. El gen *fadD26* es responsable de la síntesis de una familia de lípidos asociados a la virulencia del bacilo.

Resultados y conclusiones:

La construcción de este doble mutante es la primera vacuna viva atenuada que cumple los requisitos del consenso de Ginebra. La vacuna ha demostrado una excelente atenuación, perfil de seguridad y eficacia de la protección conferida por rigurosos estudios preclínicos en modelos animales pertinentes 2,3. Actualmente el proyecto “vacuna tuberculosis” cuenta con un socio fabricante, CZ Veterinaria www.czveterinaria.com/, que tiene una amplia experiencia en la producción de vacunas de uso en veterinaria y recientemente ha constituido una filial para el desarrollo de vacunas para humanos BIOFABRI <http://biofabri.com/>. Nuestro plan de investigación aplicada es el desarrollo de una vacuna viva atenuada contra la TB para su evaluación clínica en humanos.

1. Gonzalo-Asensio et al. PhoP: a missing piece in the intricate puzzle of *M. tuberculosis* virulence. PLoS ONE 2008;3(10):e3496.
2. Martin et al. The live *M. tuberculosis* *phoP* mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs. Vaccine 2006;24(17):3408-19.
3. Verreck et al. MVA.85A boosting of BCG and an attenuated, *phoP* deficient *M. tuberculosis* vaccine both show protective efficacy against tuberculosis in rhesus macaques. PLoS One 2009;4(4):e5264.

Palabras clave: Vacunas viva atenuada



LIBRO DE RESÚMENES

COMUNICACIONES ORALES. (Sesión 2)

Diagnóstico de *Mycobacterium leprae* en Fontilles.

Autor/es: Acosta Soto L(1,2), Torres Muñoz P.(1), Gómez Echevarría J.R.(1)

Institución: (1) Sanatorio Fontilles, Alicante, España. (2) Área de Parasitología. Universidad Miguel Hernández de Elche, Alicante, España.

Ausencia de colonización por *Micobacterias* no tuberculosas en pacientes con EPOC: Estudio mediante Metagenómica.

Autor/es: E. Aguirre¹, A. Galiana¹, A. Mira³, A. Valero², E. García Pachón², L. Álvarez¹, R. Cremades¹, M. Ruiz-García¹, JC Rodríguez¹, G. Royo¹.

Institución: S. Microbiología¹ y Neumología². Hospital General Universitario De Elche. Universidad Miguel Hernández. ³Centro Superior de Investigación en Salud Pública. Valencia

Úlcera de Buruli

Autor/es: Torres Muñoz P(1), Acosta Soto (1,2), Gómez Echevarría JR(1).

Institución: (1). Asociación Fontilles, Vall de Laguar, Alicante). Área de Parasitología, Universidad Miguel Hernández. Elche, Alicante.

Detección de autofluorescencia en biopelículas de micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido.

Autor/es: María del Carmen Muñoz Egea, María García Pedrazuela, María Jesús García, Jaime Esteban.

Institución: Fundación Jiménez Díaz y Universidad Autónoma de Madrid

Formación de cuerdas microscópicas en micobacterias no tuberculosas y su relación con la virulencia y la formación de biofilms.

Autor/es: Marina Luquin Fernández, Cecilia Toledo Brambilla, Esther Julián Gómez y Alejandro Sánchez Chardi.

Institución: Universidad Autónoma de Barcelona

COMUNICACIONES ORALES. (Sesión 12)

Evaluación de un método inmunocromatográfico rápido (BD MGIT TBc) para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis complex* a partir de cultivos positivos en MGIT.

Autor/es: Remedios Guna Serrano(1), Nuria Tormo Palop(1), Oscar Fraile Santos(2), Beatriz Muñoz-Cobo(2), María Dolores Ocete Mochón(1), Concepción Gimeno Cardona(1,3), Rafael Borrás Salvador(2,3.)

Institución: Servicio de Microbiología. CDB. Hospital General Universitario. Valencia(1). Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario. Valencia(2). Facultad de Medicina, Universidad de Valencia(3).

Estudio retrospectivo del uso del QFT en relación con el Mantoux en un Hospital de tercer nivel.

Autor/es: María García Pedrazuela, María del Carmen Muñoz Egea, Conchita Pérez-Jorge Peremarch, Jaime Esteban Moreno. Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

Evaluación del uso del Quantiferon para el manejo de la infección tuberculosa latente en el Servicio de Salud Laboral en un Hospital Universitario: 2007-2011.

Autor/es: Conchita Pérez-Jorge Peremarch, María del Carmen Muñoz Egea, María García Pedrazuela, Hadia Fouad Salih, Teresa Del Campo Balsa, Jaime Esteban Moreno.

Institución: Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

Caracterización molecular de la división micobacteriana: una nueva proteína esencial que interacciona con el divisoma.

Autor/es: Susanne Gola y Miguel Vicente Muñoz.

Institución: Centro Nacional de Biotecnología – CSIC, Madrid

Prevalencia de micobacterias atípicas en el área de influencia de un Hospital Universitario de la Comunidad Valenciana (2000 – 2011).

Autor/es: Juan M. Pazos Guarín(1), Remedios Guna Serrano(2), Luis D. Meza Antúnez(1), Beatriz Muñoz-Cobos Liria(1), Josep Prat Fornells(3), Oscar Fraile Santos(1,9), María Navarro Ors(4), Nieves Gonzalo Jiménez(4), Damiana González Granda(5), Nieves Orta Mira(6), Bárbara Gomila Sard(7), Victoria Domínguez Marqués(7,9), María Gil Fortuño(8), Rafael Borrás Salvador(1,9).

Institución: (1)Hospital Clínico Universitario, Valencia; (2)Consortio Hospital General Universitario, Valencia; (3) Hospital de Sagunto, Sagunto; (4)Hospital de la Vega Baja, Orihuela; (5)Hospital Lluís Alcanyis, Xàtiva; (6)Hospital San Francesc de Borja, Gandia; (7)Hospital General de Castellón, Castellón; (8)Hospital de la Plana, Villareal. (9) Universidad de Valencia, Facultad de Medicina y Odontología, Departamento de Microbiología, Valencia.

POSTERS CON DISCUSIÓN. (Sesión 4)

Influencia en la incidencia de Tuberculosis y en la resistencia a fármacos de la inmigración internacional en Castilla La Mancha

Autor/es: Martino Castañar, MV (1) ; Robles Domínguez, P (2); Mora Remón, F (3); Rodríguez Zurita, ME (4); Carrasco Ferrán, F (5); Asencio Egea, MA (6); Beteta López, A (7) ; Jiménez Álvarez, SM (8) ; Simarro Córdoba, E (2); Romero Portilla, C (9); Sánchez Maroto Lozano, A (10)

Institución: (1)CH de Toledo (2) H. General de Albacete (3) HGUCR C. Real (4) H. Universitario de Guadalajara (5) Sección de Epidemiología de Cuenca. (6) H. La Mancha Centro, Alcázar. (7) Hospital Gral. Ntra. Sra. del Prado, Talavera (8) H Santa Bárbara, Puertollano. (9) H. de Hellín. (10)H. Virgen de Altagracia, Manzanares.

Epidemiología y significación clínica de los aislamientos de Microbacterias no tuberculosas en muestras respiratorias. Serie de 4 años en el Hospital Universitario de Canarias.

Autor/es: Miriam Hernández Porto, Teresa Delgado Melián, María José Ramos Real, Milagros Cuervo Abarquero, María Antonia Miguel Gómez, Yanet Pedroso Fernández, María Lecuona Fernández.

Institución: Hospital Universitario de Canarias. Servicio de Microbiología y Medicina Preventiva

Caracterización de FtsZ de Mycobacterium tuberculosis in vitro.

Autor/es: Cristina Ortiz Cabello, Miguel Vicente Muñoz y Susanne Gola.

Centro Nacional de Biotecnología – CSIC, Madrid

QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (QFT-GIT) versus prueba de la tuberculina (PT): resultados discordantes en diferentes grupos de alto riesgo.

Autor/es: Armando Alberte Castiñeiras, Manuel Gonzalez Sagrado, Amparo Aragón Francos, Rosa Conde Vicente y Pilar Pérez Pascual.

Institución: Microbiología. Hospital Río Hortega. Valladolid.

Aislamiento de micobacterias del grupo M.fortuitum/M.chelonae en muestras quirúrgicas a partir de medios de cultivo convencionales mediante prolongación de la incubación de los cultivos.

Autor/es: C.Cuartero Bello, MA. Meseguer, A. Shan Nuñez, Y. González-Da Bouza, G.Gabilondo, R. del Campo, A. Sánchez Diaz, E.Gómez Mampaso.

Institución: Servicio de Microbiología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid.

Espondilodiscitis por micobacterias. Revisión de 16 casos.

Autor/es: M.L Monforte Cirac, N. Báez López, M. P. Palacián Ruiz, M.J Revillo Pinilla, M.A Lezcano Carrera.

Institución: Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Miguel Servet

Aislamiento de cepas XDR en un Centro de Referencia, en los últimos años.

Autor/es: P. Ruiz; JB. Gutierrez, M. Causse y M. Casal.

Institución: Centro de Referencia de Micobacterias. Departamento Microbiología. Facultad de Medicina. Servicio de Microbiología. Hospital Reina Sofia. Córdoba. España

POSTERS CON DISCUSION. (Sesión 7)

Estudio de cinco años en la evolución de la Tuberculosis en el Área Sanitaria del Hospital de Puerto Real.

Autor/es: Freyre Carrillo C., Rodiere K., Aznar Marin P., Espinosa García MJ., Jesús de la Calle I., Martínez Rubio C., Pérez Ramos S.

Institución: Hospital Universitario de Puerto Real (Cádiz)

Tuberculosis Laríngea en paciente con Disfonía. A propósito de un caso.

Autor/es: Freyre Carrillo C. Aznar Marin P., Espinosa García M.J., Rodiere Kathlyn, García Valdivia MS., Pérez Ramos Santiago.

Institución: Hospital Universitario de Puerto Real (Cádiz)

Evolución de la Tuberculosis de localización urinaria en un Hospital Terciario durante los últimos 30 años.

Autor/es: I Gómez-García*, C.Cuartero Bello, Y.González-Dabouza, A.Shan Núñez, M.Romero Molina*, M.Perona, FJ.Burgos, A.Sánchez Díaz, E.Gómez Mampaso.

Institución: Hospital Ramón y Cajal. Madrid. Hospital Virgen de la Salud, Toledo

Tuberculosis Infantil: Estudio de 10 años.

Autor/es: Inmaculada Guerrero-Lozano, Pilar Aznar-Marín, Lidia García-Agudo, Pedro García-Martos, María José Rodríguez-Jiménez, Manuel Rodríguez-Iglesias.

Institución: UGC Microbiología. Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz.

Resistencias de Mycobacterium tuberculosis en menores de 15 años en el Hospital Universitario Miguel Servet en el periodo comprendido entre 2000-2011.

Autor/es: M.L Monforte Cirac, M.A Lezcano Carrera, N. Báez López, F. de Juan Martín, M.J Revillo Pinilla, S. Samper Blasco.

Institución: Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Miguel Servet.

POSTERS SIN DISCUSIÓN

Incremento de la resistencia primaria (RP) de M. tuberculosis a fármacos antituberculosos en los últimos años en nuestra área sanitaria.

Autor/es: Armando Alberte Castiñeiras, Manuel Gonzalez Sagrado, Marta Domínguez-Gil Gonzalez, Sara Yáñez Soria y Pilar Pérez Pascual.

Institución: Microbiología. Hospital Río Hortega. Valladolid.

Estudio genotípico de Mycobacterium tuberculosis resistente a isoniazida en Galicia.

Autor/es: ML. Pérez del Molino(1), D. Navarro(1), P. Alonso(2), L. Barbeyto(3), A. Pascual(4), R. Villanueva(5) y Grupo Gallego de Micobacteriología.

Institución: Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela(1), Complejo Hospitalario Lucus Augusta(2). Complejo Hospitalario de Orense-Provincial(3). Complejo Hospitalario de Pontevedra(4). Complejo Hospitalario Universitario de Coruña(5).

Caracterización de cepas de M.tuberculosis resistentes a isoniazida procedentes de pacientes en Tratamiento Directamente Observado.

Autor/es: B. Mejuto (1), V. Tuñez (2), R. Garcia-Ramos(2), ML. Pérez del Molino(2).

Institución: (1)Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. (2)Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.

Resultados Preliminares del análisis genómico de una cepa extremadamente resistente de Mycobacterium bovis.

Autor/es: Sara Sagasti Escalona, Jesús Ángel Gonzalo Asensio, M^a Antonia Lezcano Carrera, Sofia Samper Blasco.

Institución: IIS Aragón, Hospital Miguel Servet, Zaragoza, España.

Linfadenitis Cervical por Microbacterias en la edad pediátrica.

Autor/es: Pedro García-Martos, Lidia García-Agudo, Inmaculada Guerrero-Lozano, Enrique González-Moya, María José Rodríguez Jiménez, Rodríguez-Iglesias Manuel.

Institución: UGC de Microbiología, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz.

Nocardiosis Cutánea Primaria Superficial.

Autor/es: Fátima Galán, Lidia García-Agudo, Inmaculada Guerrero-Lozano, Pilar Marín, Pedro García-Martos, Manuel Rodríguez-Iglesias.

Institución: UGC de Microbiología, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz.

Efecto antitumoral de Mycobacterium bovis BCG no viable y su actividad sinérgica con Mitomicina C.

Autor/es: Silvia Secanella Fandos, Marina Luquin Fernández, Esther Julián Gómez.

Institución: Depto. Genética y Microbiología, Universidad Autónoma de Barcelona.

Evaluación de la actividad antitumoral indirecta de Mycobacterium bovis BCG vivo y muerto por irradiación.

Autor/es: Silvia Secanella Fandos, Hasier Eraña Lasagabaster, Marina Luquin Fernández, Esther Julián Gómez.

Institución: Depto. Genética y Microbiología, Universidad Autónoma de Barcelona.

Las cepas rugosas de Mycobacterium abscessus forman cuerdas microscópicas similares a las formadas por las micobacterias del complejo tuberculosis.

Autor/es: Cecilia Toledo Brambilla, Alejandro Sánchez-Chardi, Esther Julián Gómez y Marina Luquin Fernández.

Institución: Universidad Autónoma de Barcelona.

Casos de tuberculosis en población autóctona e inmigrante en Navarra, 2000-2011.

Autor/es: Navascués Ana(1), García-Cenoz Manuel(2), Beristain Xabier(1), Torroba Luis(1), Ezpeleta Carmen1 y Gil-Setas Alberto(1).

Institución: (1)Servicio de Microbiología Clínica del Complejo Hospitalario de Navarra . (2) Instituto de Salud Pública de Navarra.

Tuberculosis Infantil en el Área Sanitaria de Guadalajara.

Autor/es: M^a Elena Rodríguez Zurita, Nora Mariela Martínez Ramírez, Cristina Fernández González, Sonia Solís del Baño, Julia Bisquert Santiago.

Institución: Hospital Universitario de Guadalajara.

Estudio de cargas de trabajo de Microbacterias en el Hospital de Ceuta. Estudio 2011.

Autor/es: José López Barba, Salomé Hijano Villegas, María Isabel José Acedo, Sol Martínez Llamas; Yolanda Rodríguez Mirón, María José Jiménez Gómez, Eva Morales de la Vega, Francisca León Rivera, Jacobo Díaz Portillo, Tomás Orgaz Morales.

Institución: Laboratorio de Microbiología. Hospital Universitario de Ceuta.

Atención Farmacéutica en pacientes con Mycobacterium leprae: experiencia en Costa Rica.

Autor/es: Esther Vaquero Álvarez y Maricruz Mora Vargas.

Institución: Universidad Córdoba y Hospital México (Caja Costarricense del Seguro Social).

Gestión de residuos peligrosos en un Centro de Referencia de Micobacterias.

Autor/es: José Emilio Aguilar Moreno, Antonio Gomera Martínez, Ana de Toro Jordano, Clara Guijarro Jiménez, Ana López Gómez, Manuel Vaquero Abellán.

Servicio de Protección Ambiental (SEPA). Universidad de Córdoba

Utilidad del XPERT MTB/RIF en el diagnóstico de la TB en un Hospital General.

Autor/es: B. Gomila, S. Sabater, F. Roach, A. Campos, R. Moreno.

Institución: Sección Microbiología. Hospital General de Castellón

Propuesta de ficha de datos de seguridad para Microbacterias.

Autor/es: Pablo López Roldán, Manuel Vaquero Abellán.

Institución: Universidad de Córdoba.

Infecciones por Mycobacterias en la cavidad oral. Una rara localización.

Autor/es: Rafael Segura Saint-Gerons(1), Alejandro Ceballos Salobreña(2), Luis Gaitan Cepeda(3), Mariano Toro Rojas(4), Josefa Fanego Fernandez(1).

Institución: (1)Servicio Andaluz de Salud, (2)Universidad de Granada, (3)Universidad Nacional Autónoma de México, (4)Universidad de Córdoba.

Espondilodiscitis por Mycobacterium tuberculosis vs. Canettii.

Autor/es: M.L Monforte Cirac, S. Samper Blasco, C. Ramos Paesa, M.J Revillo Pinilla, M.A Lezcano Carrera.

Institución: Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Miguel Servet.

Resistencia de Mycobacterium Tuberculosis a fármacos de 2ª línea.

Pilar Ruiz Martínez, J. B. Gutiérrez Aroca , Manuel Causse del Río, Casal Roman.

Centro Referencia de Micobacterias.Dpto. Microbiología. Facultad Medicina. CORDOBA

Estudio de las resistencias a fármacos de 3ª línea frente a Mycobacterium tuberculosis.

Autor/es: Pilar Ruiz Martínez, Juan Gutiérrez Aroca , Manuel Causse del Río, Manuel Casal Roman.

Institución: Centro de Referencia de Micobacterias.Facultad de Medicina. Servicio de Microbiología. Hospital Reina Sofia.

Estudio de las resistencias a fármacos de 3ª línea frente a Mycobacterium tuberculosis.

Autor/es: Pilar Ruiz Martínez, Juan Gutiérrez Aroca , Manuel Causse del Río, Manuel Casal Roman.

Institución: Centro de Referencia de Micobacterias.Facultad de Medicina. Servicio de Microbiología. Hospital Reina Sofia

Mutaciones de resistencias a fármacos de 2ª Línea.

Autor/es: Pilar Ruiz Martínez, Juan Gutiérrez Aroca , Manuel Causse del Río, Casal Roman

Institución: Centro Referencia Micobacterias.Dpto. Microbiología. Facultad Medicina. Córdoba.

Resistencia de M. Tuberculosis a fármacos de 1ª línea.

Autor/es: J. B. Gutiérrez Aroca , Pilar Ruiz Martínez, Manuel Causse del Río, Casal Roman.

Institución: Hospital Universitario Reina Sofia. Serv. Microbiología. Facultad Medicina. Cordoba.

Resistencia de M. Tuberculosis a fármacos de 2ª línea.

Autor/es: J. B. Gutiérrez Aroca , Pilar Ruiz Martínez, Manuel Causse del Río, Casal Roman.

Institución: Hospital Universitario Reina Sofia. Serv. Microbiología. Facultad Medicina. Cordoba.

Resistencia de M. Tuberculosis a fármacos de 3ª línea.

Autor/es: J. B. Gutiérrez Aroca , Pilar Ruiz Martínez, Manuel Causse del Río, Casal Roman.

Institución: Hospital Universitario Reina Sofia. Serv. Microbiología. Facultad Medicina. Cordoba.

Resistencia de M. Tuberculosis en Andalucía.

Autor/es: J. B. Gutiérrez Aroca , Pilar Ruiz Martínez, Manuel Causse del Río, Casal Roman.

Institución: Laboratorio de Referencia de Resistencias en Andalucía. Hospital Universitario Reina Sofia. Serv. Microbiología. Facultad Medicina. Cordoba.

Estudio de dos Tests de PCR a tiempo real para el diagnóstico de Tuberculosis en muestras respiratorias.

Autor/es: Causse, M. Gutierrez-Aroca, JB. Ruiz, P. Casal, M.

Institución: Servicio de microbiología. H.U. Reina Sofia (Córdoba, España)

Estudio genotípico de cepas resistente de Tuberculosis en la Comunidad Autónoma Andaluza.

Autores: Causse, M(1); Ruiz, P(2); Gutierrez-Aroca, JB (1,2); Casal, M(1,2).

Institución: (1)Servicio de Microbiología H.U. Reina Sofia. Cordoba (España), (2)Micobacteria Referente Center, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba (España).



LIBRO DE RESÚMENES

COMUNICACIONES ORALES (SESION 2)

DIAGNÓSTICO DE MYCOBACTERIUM LEPRAE EN FONTILLES

Autor/es: Acosta Soto L(1,2) ,Torres Muñoz P.(1), Gómez Echevarria J.R.(1)

Institución: (1)Sanatorio Fontilles, Alicante, España. (2)Área de Parasitología. Universidad Miguel Hernández de Elche, Alicante, España.

Introducción/objetivos:

Desde enero de 1909, el Sanatorio Fontilles, se ha dedicado al diagnóstico, tratamiento (desde su disponibilidad en 1952), y cuidado de los enfermos de lepra. En lo referente al diagnóstico, la baciloscopia es tradicionalmente la técnica de referencia. Sin embargo, puede resultar negativa en pacientes con baja carga bacteriana (límite de sensibilidad en ~100 bacilos ácido-alcohol resistentes). La histopatología es otra técnica muy útil en el diagnóstico de la enfermedad, ya que permite la observación de bacilos y observación de lesiones o reacciones inflamatorias en los tejidos afectados. Ante sospecha de lepra, pero que tras la realización de las técnicas anteriores, los resultados no son concluyentes, se puede proceder a la realización de varias técnicas complementarias de biología molecular (PCR). Que permiten por un lado determinar la presencia de ADN de *M. leprae* en la muestra, y por otro, el seguimiento y evaluación de la respuesta al tratamiento.

El objetivo de Fontilles es proporcionar un diagnóstico rápido, eficaz y específico como apoyo al sistemas de salud yanto en los nuevos casos, como en el seguimiento de pacientes ya tratados.

Material y método:

El paciente puede ser remitido en persona con objeto de determinar las lesiones cutáneas y/o neurológicas por los expertos del sanatorio y posterior recogida de muestra “in situ”. O puede ser remitida la muestra (torunda nasal o de la lesión, frotis fresco o teñido, biopsia fresca o en parafina, etc). En el caso de torundas nasales o de la lesión, se procede a la realización de la baciloscopia. Se puede realizar evaluación histopatológica de las biopsias. Posteriormente o en paralelo, se prepara la muestra para la extracción y precipitación de ADN y amplificación por medio de una PCR anidada “in house” (detecta 0.04 fg de ADN en la muestra (1 bacteria ~3 fg de ADN)), o PCR multiplex y posterior secuenciación para la evaluación de resistencias.

Resultados:

Se han remitido al sanatorio desde abril de 2011 a febrero de 2012, 34 muestras de 18 pacientes diferentes; 26 torundas de 12 antiguos pacientes de lepra que habían acudido al sanatorio para una revisión rutinaria, y 8 muestras (2 torundas y 6 biopsias de piel) de 6 pacientes diferentes remitidos desde distintos hospitales de España. Todos los pacientes resultaron negativos por baciloscopia. En las biopsias la histopatología no fue concluyente. Sin embargo, en uno de ellos se detectó ADN de *M. leprae*, sensible a rifampicina, dapsona y ofloxacino. Lo cual permite el tratamiento del paciente con la multiterapia (rifampicina, dapsona y clofacimina).

Conclusiones:

Dada la baja incidencia de casos en España (autóctonos o importados), el diagnóstico exhaustivo y completo de lepra en los sistemas de salud es poco viable. Fontilles ofrece la posibilidad de un diagnóstico, rápido específico y eficaz de la lepra.

Palabras clave: Lepra , baciloscopia,, PCR

AUSENCIA DE COLONIZACION POR MICOBACTERAS NO TUBERCULOSAS EN PACIENTES CON EPOC: ESTUDIO MEDIANTE METAGENOMICA

Autor/es: E. Aguirre(1), A. Galiana(1), A. Mira(3), A. Valero(2), E. García Pachón(2), L. Álvarez(1), R. Cremades(1), M. Ruiz-García(1), JC Rodríguez(1), G. Royo(1).

Institución: S. Microbiología y Neumología(2). Hospital General Universitario De Elche. Universidad Miguel Hernández. (3)Centro Superior de Investigación en Salud Pública. Valencia

Objetivo:

Conocer la colonización por micobacterias no tuberculosas en el tracto respiratorio de dos grupos de pacientes estables con EPOC: leves-moderados versus graves-muy graves

Material y método:

Pacientes: 20 pacientes estables diagnosticados de EPOC según los criterios internacionales

Cultivo cuantitativo: Se cultivó una muestra de esputo de buena calidad por los métodos habituales, con identificación fenotípica y genotípica de las bacterias presentes (secuenciación parcial del RNA 16S).

Técnicas metagenómicas: Se basan en la secuenciación masiva de todo el DNA presente en la muestra mediante pirosecuenciación. Tras la realización de miles de reacciones de amplificación y secuenciación en cada muestra, se puede realizar un análisis metagenómico del 16S ribosómico bacteriano. Mediante un análisis bioinformático de las pirosecuencias se obtiene una caracterización de los diferentes genes presentes en la muestra, que se traduce en una identificación de las diferentes especies bacterianas de la misma.

Resultados:

Se identifica la presencia de muchos más géneros mediante métodos moleculares (18 versus 61) aunque por ninguno de los dos métodos se detecta la presencia de micobacterias no tuberculosas en los pacientes estudiados.

Conclusiones:

Aunque en el grupo de pacientes estudiados no se detecta la presencia de colonización por micobacterias no tuberculosas, la metagenómica es una herramienta mucho más potente que el cultivo tradicional para conocer la verdadera flora respiratoria de estos enfermos, permitiendo identificar los diferentes géneros presentes y la proporción relativa de los mismos

La principal limitación de la misma es que actualmente no puede identificar a nivel de especie con fiabilidad porque el fragmento del gen secuenciado es aún pequeño pero las nuevas versiones de los pirosecuenciadores están ampliando este parámetro

Palabras clave: Micobacterias no tuberculosas, metagenómica, pirosecuenciación

ULCERA DE BURULI

Autor/es: Torres Muñoz P(1), Acosta Soto (1,2), Gómez Echevarria JR(1).

Institución: (1) Asociación Fontilles, Vall de Laguar, Alicante (2). Área de Parasitología, Universidad Miguel Hernández
Elche, Alicante.

Introducción:

La Ulcera de Buruli es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium ulcerans*. La fase inicial se caracteriza por la presencia de un nódulo indoloro que progresa hacia lesiones necrotizantes cutáneas y ocasionalmente presenta implicación ósea. La Organización Mundial de la Salud (OMS) registró alrededor de 6000 casos en 33 países durante el año 2010. *M.ulcerans* es una micobacteria medio ambiental de crecimiento lento (30-32°C) que segrega una toxina lipídica, la micolactona con propiedades inmunosupresoras que es responsable de la necrosis tisular. Se sospecha el contagio por traumatismos con plantas contaminadas y la existencia de vectores invertebrados. La infección se relaciona con agua estancada y afecta sobre todo a niños y adolescentes (70%) de las clases mas desfavorecidas. El tratamiento es quirúrgico o farmacológico (rifampicina oral y estreptomycin IM ,diarias durante 8 semanas.

Material y método:

La enfermedad activa presenta dos formas : no-ulcerada (pápula, nódulo, placa, edema) y la ulcerada (ulceras y osteomielitis). La OMS ha protocolizado la obtención y el transporte de muestras además de las técnicas a realizar.

Las técnicas recomendadas por la OMS son:

1. Examen directo de las extensiones.
2. Cultivo de *M. ulcerans*.
3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)(IS2404)
4. Histopatología.

Se requieren dos resultados positivos para confirmar un caso de UB.

Resultados:

En las formas no ulceradas se considera la toma mediante aspiración con aguja fina como la optima sobretodo a nivel periférico por ser sensible y adecuada para el transporte.

En las formas ulceradas se obtiene una muestra mediante torunda por debajo de los bordes de la ulcera. Nunca en el centro. Las técnicas mas empleadas son el examen directo por ser sencilla y rápida y la PCR por su elevada sensibilidad.

Conclusiones:

La UB esta considerada como enfermedad olvidada por la OMS. La Asociación Fontilles colabora actualmente en dos distritos endémicos de Ghana: Amansie y Asunafo Norte y Sur y próximamente con el Hospital Kimpese de RD Congo.

Palabras clave: Ulcera Buruli, no.ulcerada, PCR

DETECCIÓN DE AUTOFLUORESCENCIA EN BIOPELÍCULAS DE MICOBACTERIAS NO PIGMENTADAS DE CRECIMIENTO RÁPIDO.

Autor/es: María del Carmen Muñoz Egea, María García Pedrazuela, María Jesús García, Jaime Esteban.

Institución: Fundación Jiménez Díaz y Universidad Autónoma de Madrid.

Objetivo:

Estudiar la distribución y el comportamiento de la autofluorescencia en una biopelícula formada por micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido.

Material y método:

Se estudiaron las cepas tipo *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841, *Mycobacterium abscessus* DSM 44196, *Mycobacterium chelonae* ATCC19235 y *Mycobacterium peregrinum* ATCC 14467

La biopelícula se desarrolló usando placas estériles de 2x4 pocillos con superficie hidrofóbica y sin recubrimiento, que se incubaron a 37°C en agitación (80 rpm) durante 24h, 48h, 72h y 96h. El medio (Middlebrook 7H9) se renovó diariamente.

Los pocillos se tiñeron con Live/dead© BacLight© y Nile Red©, y se analizaron en el microscopio confocal láser de barrido. La primera fila de 4 pocillos se usó para el estudio de autofluorescencia y tinción Nile Red©, y la otra para analizar la proporción de micobacterias vivas y muertas con la tinción Live/dead© BacLight©. El espesor de la biopelícula fue medido en 8 puntos predefinidos/pocillo. Se midió además la superficie cubierta por la biopelícula en los mismos puntos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado para cada una de las especies.

Resultados:

La biopelícula de *M. abscessus* y *M. peregrinum* alcanzaron su máximo espesor a las 96 h ($13.64 \pm 6.22 \mu\text{m}$; $19.89 \pm 3.87 \mu\text{m}$, respectivamente), mientras que *M. fortuitum* y *M. chelonae* lo alcanzaron a las 72 h ($23.11 \pm 4.35 \mu\text{m}$; $19.24 \pm 5.02 \mu\text{m}$, respectivamente). La superficie de la biopelícula es más irregular para *M. abscessus* y *M. chelonae*. Por el contrario, el crecimiento es uniforme en *M. fortuitum* y *M. peregrinum*. El porcentaje de superficie cubierta a las 96 horas fue también mayor en *M. fortuitum* ($46.13 \pm 12.02 \%$) que en *M. abscessus* ($31.4 \pm 26.41 \%$), *M. peregrinum* ($31.03 \pm 8.01 \%$) y *M. chelonae* ($3.33 \pm 1.54 \%$). Cabe destacar que *M. fortuitum* tiende a cubrir rápidamente toda la superficie del pocillo, mientras que *M. chelonae* tiene tendencia a crecer verticalmente.

El mayor valor de porcentaje de superficie cubierta fue alcanzado a las 48 h por *M. fortuitum* ($55.67 \pm 23.73 \%$). El resto de micobacterias alcanzaron su máxima en los siguientes tiempos: *M. chelonae* a las 48h, *M. peregrinum* a las 72h y *M. abscessus* a las 96h. Cuando la biopelícula de todas las cepas alcanza su madurez, tiende a desprenderse parcialmente, un hecho que podría explicar estos resultados.

El porcentaje de autofluorescencia total en todas las especies es similar, aunque ligeramente menor en el caso de *M. peregrinum*. *M. fortuitum*, *M. abscessus* y *M. peregrinum* presentaron menor autofluorescencia cuando el porcentaje de superficie cubierta es mayor, al contrario que *M. chelonae*. Existe concordancia entre las bacterias teñidas con Nile Red© y aquellas que emiten autofluorescencia. Al mismo tiempo, la tinción Live/dead© demostró que la mayoría de las bacterias estaban vivas. Se detectó además la presencia de autofluorescencia fuera de la estructura bacteriana en todas las especies, con una distribución irregular dentro de la biopelícula.

Conclusiones:

Las biopelículas de micobacterias de crecimiento rápido muestran la presencia de autofluorescencia tanto dentro de las células como también en la matriz extracelular.

La detección de autofluorescencia observada en los experimentos puede ser de gran utilidad en futuras investigaciones sobre la estructura de biopelículas de micobacterias. Este conocimiento sería de gran importancia en los estudios sobre la patogenia de las infecciones causadas por estos organismos.

Palabras clave: Biopelícula, Autofluorescencia, Micobacterias de crecimiento rápido

FORMACIÓN DE CUERDAS MICROSCÓPICAS EN MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS Y SU RELACIÓN CON LA VIRULENCIA Y LA FORMACIÓN DE BIOFILMS.

Autor/es: Marina Luquin Fernández, Cecilia Toledo Brambilla, Esther Julián Gómez y Alejandro Sánchez Chardi.

Institución: Universidad Autónoma de Barcelona.

Introducción:

Cuando *Mycobacterium tuberculosis* o *Mycobacterium bovis* crecen en un cultivo líquido sin detergente, forman unas estructuras microscópicas características que recuerdan a una cuerda. En éstas, los bacilos se encuentran ordenados en paralelo, unos junto a otros siguiendo el eje más largo de la cuerda. La formación de cuerdas se considera un factor de virulencia en *M. tuberculosis* y la responsable de la formación de biofilms en la superficie de los cultivos líquidos. Aunque se han observado estructuras cordiformes similares en micobacterias no tuberculosas, estas se han calificado, casi siempre, como agregados o pseudocuerdas. Hoy en día la mayoría de microbiólogos clínicos tiene el convencimiento de que sólo *M. tuberculosis* y *M. bovis* pueden formar cuerdas. En algunos laboratorios de países en desarrollo la observación de cuerdas es el único criterio que se tiene en cuenta a la hora de identificar los bacilos ácido-alcohol resistentes como pertenecientes al complejo tuberculosis. **Objetivos:** Demostrar que las micobacterias no tuberculosas también forman cuerdas y que su presencia está relacionada, al igual que en *M. tuberculosis*, con la formación de un biofilm en la superficie del medio líquido y con un aumento de la virulencia. **Material y métodos:** Las cepas estudiadas fueron: *Mycobacterium chubuense* ATCC 27278T, *Mycobacterium gilvum* DSM 43547, *Mycobacterium obuense* ATCC 27023T, *Mycobacterium parafortuitum* ATCC 19686T, y *Mycobacterium vaccae* ATCC 15483T, todas ellas cepas lisas, y sus respectivas mutantes rugosas naturales. Además se estudiaron *Mycobacterium bovis* BCG cepa Japan y *Mycobacterium marinum* ATCC 927T. Los cultivos se realizaron en 7H10 de Middlebrok. Las cuerdas se observaron por microscopía electrónica de barrido (MEB) y la línea celular J774 se utilizó para estudiar la supervivencia de las micobacterias en macrófago. **Resultados:** Todas las cepas de morfología colonial rugosa fueron capaces de formar un biofilm en la superficie del medio líquido. La MEB demostró que en todos estos biofilms había cuerdas verdaderas, similares en ultraestructura a las formadas por *M. bovis*. Sin embargo ninguna de las cepas de morfología lisa fue capaz de formar un biofilm y su crecimiento tubo lugar, exclusivamente, en el interior del medio de cultivo. La MEB demostró la ausencia total de cuerdas en las cepas lisas crecidas en medio líquido. Los estudios de supervivencia en la línea J774 demostraron que las cepas rugosas formadoras de cuerdas eran capaces de persistir más tiempo en el interior de los macrófagos que las cepas lisas no formadoras de cuerdas.

Conclusiones:

- 1) Las micobacterias no pertenecientes al complejo tuberculosis son capaces de formar cuerdas microscópicas
- 2) La formación de cuerdas está ligada a la formación de biofilms y restringida a las micobacterias de morfología colonial rugosa
- 3) La formación de cuerdas es un factor de virulencia en las micobacterias no tuberculosas.

Palabras clave: Cuerdas, Microscopía electrónica, Biofilms

COMUNICACIONES ORALES (SESION 12)

EVALUACIÓN DE UN MÉTODO INMUNOCROMATOGRÁFICO RÁPIDO (BD MGIT TBC) PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX A PARTIR DE CULTIVOS POSITIVOS EN MGIT.

Autor/es: Remedios Guna Serrano(1), Nuria Tormo Palop(1), Oscar Fraile Santos(2), Beatriz Muñoz-Cobo(2), María Dolores Ocete Mochón(1), Concepción Gimeno Cardona(1,3), Rafael Borrás Salvador(2,3).

Institución: Servicio de Microbiología. CDB. Hospital General Universitario. Valencia(1). Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario. Valencia(2). Facultad de Medicina, Universidad de Valencia(3).

Introducción/Objetivo:

El objetivo del estudio es evaluar la utilidad de un método inmunocromatográfico (IC) para identificación de *Mycobacterium tuberculosis complex* (MYCTUBC) a partir de cultivos positivos en medio MGIT (BD).

Material y método:

El estudio se realizó en tres fases. En la primera fase, se ensayó el dispositivo BD MGIT Tbc frente a 87 aislados de las colecciones de los Servicios de Microbiología de dos Hospitales Universitarios de Valencia, identificados por métodos convencionales y moleculares (Accuprobe® Gen-Probe, bioMérieux; Genotype®, Hain Life Science) como: *Mycobacterium tuberculosis complex* (MYCTUBC) (55), *M. bovis* BCG (1), *M. bovis* (3), *M. africanum* 1 (3), *M. avium* (7), *M. kansasii* (4), *M. intracelulare* (2), *M. scrofulaceum* (2), *M. simiae* (1), *M. celatum* (1), *M. interjectum* (1), *M. chelonae* (3), *M. abscessus* (1) *M. fortuitum* (1) y dos aislados de *Nocardia* sp. En la segunda fase, 39 aislados clínicos, fueron estudiados en paralelo por dos métodos: Accuprobe® y BD MGIT Tbc. Las discrepancias o los resultados negativos por ambos métodos, fueron resueltos mediante Genotype®. En la tercera fase, tras el periodo de estudio en paralelo, 141 aislados clínicos morfológicamente compatibles con MYCTUBC (cord factor o cord factor like +) fueron estudiados únicamente con el dispositivo BD MGIT Tbc y los resultados negativos resueltos mediante los procedimientos comentados anteriormente.

Resultados:

De los aislados incluidos en las dos primeras fases, ambos procedimientos fueron positivos en 83/126 casos (65,9%), negativos en 39/126 (30,9%) y discrepantes en cuatro casos (3,1%), de los cuales tres fueron identificados (Genotype®) como *M. bovis* ssp. BCG y uno como MYCTUBC. En la tercera fase, 124 aislados fueron identificados por IC como MYCTUBC y los negativos (17) como pertenecientes a 6 especies de micobacterias atípicas mediante Genotype® CM / AS. La valoración estadística global de los resultados obtenidos en las tres fases del estudio, que está recogida en la siguiente tabla, demuestra una elevada concordancia de BD MGIT Tbc con las técnicas de hibridación.

Conclusiones: Con todo ello concluimos que BD MGIT Tbc es un procedimiento rápido, sencillo y fácil de interpretar que permite la identificación de la mayoría de las especies incluidas en el complejo *M. tuberculosis*.

		MYCTUBC		
		+	-	
BD	+	207	0	207
	-	4	56	60
Total		211	56	267

Estadígrafo	Valor
Sensibilidad	0,981
Especificidad	1
VPP	1
VPN	0,933
CVP	∞
CVN	0,02
Índice <i>kappa</i>	0,956

VPP: Valor predictivo positivo; VPN: Valor predictivo negativo; CVP: Cociente de verosimilitud positivo; CVN: Cociente de verosimilitud negativo.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis complex*, inmunocromatografía, identificación.

ESTUDIO RETROSPECTIVO DEL USO DEL QFT EN RELACIÓN CON EL MANTOUX EN UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL.

Autor/es: María García Pedrazuela, María del Carmen Muñoz Egea, Conchita Pérez-Jorge Peremarch, Jaime Esteban Moreno.

Institución: Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

Objetivo:

Estudio retrospectivo sobre la experiencia en el uso del Quantiferon TB-Gold© (QFT) en el diagnóstico de la infección tuberculosa latente (ITL) en la rutina asistencial de un Hospital de tercer nivel entre 2007-2011.

Material y método:

Revisión retrospectiva de la base de datos del Departamento Microbiología Clínica. Se seleccionaron para el estudio aquellos pacientes procedentes de servicios clínicos a los que se les había solicitado las pruebas de Mantoux y QFT simultáneamente con menos de 7 días de diferencia entre ellos. Se valoraron datos demográficos, vacunación con BCG, inmunodepresión, enfermedad tuberculosa y tratamiento de la ITL. El estudio estadístico incluye el análisis del coeficiente kappa, test de Fisher y la t de Student.

Resultados:

De un total de 389 pacientes a los que se les realizó la prueba del QFT, 308 fueron incluidos en el estudio. La media de edad de los pacientes fue de 42.44 (rango 0-93 años). El coeficiente kappa muestra una correlación moderada entre el QFT y Mantoux ($k=0.509$). En 211 pacientes ambas pruebas fueron idénticas (156 QFT negativo- Mantoux < 5 mm; 55 QFT positivo-Mantoux ≥ 5 mm). Los resultados de 45 pacientes fueron discordantes (21 QFT positivo-Mantoux < 5 mm; 24 QFT negativo-Mantoux ≥ 5 mm). Se obtuvieron resultados indeterminados en 12 pacientes debido al hecho de que el control positivo fue negativo. Se desconoce el dato del Mantoux de 42 pacientes dado que no acudieron a la lectura. El Departamento con mayor número de solicitudes fue Medicina Interna (N=168, incluyendo la Unidad de Enfermedades Infecciosas). El dato de la vacunación BCG sólo apareció registrado en 40 pacientes (únicamente 6 estaban vacunados). En cuanto a la infección por VIH, se registró el dato en 270 pacientes (103 positivos). 307 pacientes presentaban algún tipo de inmunodepresión (56 de ellos negativos para VIH). 29 pacientes fueron diagnosticados de tuberculosis activa y 5 de tuberculosis pasada. 41 pacientes recibieron tratamiento para la ITL, incluyendo 2 pacientes QFT positivo-Mantoux < 5 mm y 3 pacientes QFT negativo-Mantoux ≥ 5 mm (2 del Servicio de Reumatología y 1 del Servicio de Pediatría). El análisis estadístico demostró correlación entre la detección de QFT positivo y positividad frente a VIH ($p=0.0266$), inmunodepresión ($p=0.0319$), y diagnóstico de tuberculosis ($p<0.0001$). Dentro de los pacientes con induración ≥ 5 mm en la prueba de Mantoux, los diámetros más grandes se correlacionaron con resultados positivos para QFT ($p=0.0347$, t de Student).

Conclusiones:

El uso de la prueba del QFT se incluye en los protocolos de algunos departamentos como parte de la evaluación inicial del paciente. Sin embargo, los resultados del QFT no influyeron en la decisión del clínico a la hora de tratar a los pacientes con ITL. Sería necesario mejorar el conocimiento respecto al significado del QFT en la práctica clínica con el fin de mejorar su correcto uso.

Palabras clave: Quantiferon, Mantoux, Mycobacterium tuberculosis

EVALUACIÓN DEL USO DEL QUANTIFERON PARA EL MANEJO DE LA INFECCIÓN TUBERCULOSA LATENTE EN EL SERVICIO DE SALUD LABORAL EN UN HOSPITAL UNIVERSITARIO: 2007-2011.

Autor/es: Conchita Pérez-Jorge Peremarch, María del Carmen Muñoz Egea, María García Pedrazuela, Hadia Fouad Salih, Teresa Del Campo Balsa, Jaime Esteban Moreno.

Institución: Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

Objetivos:

Estudiar retrospectivamente la experiencia del uso del Quantiferon TB-Gold (QFT) para el manejo de la infección tuberculosa latente (ITL) en el ámbito de un Servicio de Salud Laboral. El personal sanitario es una población de riesgo de infectarse por *Mycobacterium tuberculosis* y su diagnóstico precoz resulta de suma importancia.

Material y método:

Se seleccionaron aquellos trabajadores del hospital a los que se les realizó un reconocimiento médico que, debido a sus riesgos laborales, incluía una prueba de Mantoux y de QFT con una diferencia entre ellas menor de 7 días. Fueron analizados los datos sobre vacunación con BCG, tratamiento de la ITL, y datos demográficos. Durante el periodo de estudio se empleó un protocolo de manejo de la ITL desarrollado conjuntamente entre los Servicios de Salud Laboral y Prevención, y Microbiología Clínica basado en las recomendaciones internacionalmente aceptadas (National Institute for Health and Clinical Excellence, 2006). El estudio estadístico incluye análisis del coeficiente kappa, asociación de Fisher y t de Student.

Resultados:

81 pacientes del Servicio de Salud Laboral fueron incluidos en el estudio. La edad media fue de 33.37 (rango 21-59 años). El análisis kappa mostró una correlación aceptable entre QFT y Mantoux ($k=0.2396$). 47 pacientes presentaron un resultado idéntico para ambas pruebas (20 negativos y 27 positivos), y 30 resultados discordantes (22 QFT negativo-Mantoux ≥ 5 mm; 8 QFT positivo-Mantoux < 5 mm), con una prueba de asociación de Fisher $p < 0.0001$. 4 de los pacientes no acudieron a la lectura de la prueba de Mantoux.

49 pacientes habían sido vacunados con BCG y 32 no habían recibido dicha vacuna. De los 49 pacientes vacunados, 42 fueron Mantoux positivo y de éstos, 34 dieron positiva la prueba de QFT ($p=0.0162$). No se detectaron casos de inmunodepresión ni enfermedad por VIH. No se diagnosticó ningún caso de enfermedad tuberculosa. Del total de pacientes a los que se les realizó ambas pruebas, 30 recibieron tratamiento por ITL, y de éstos, 22 presentaban ambas pruebas positivas y 8 eran QFT positivo-Mantoux < 5 mm. En los 47 pacientes presentaron QFT negativo no se pautó ningún tratamiento.

Conclusiones:

En la rutina asistencial del Servicio de Salud Laboral a todo paciente que presenta una prueba de Mantoux positiva (≥ 5 mm) se le realiza una prueba de QFT con el objetivo de ser o no tratados, de acuerdo con un protocolo específico desarrollado conjuntamente con el Servicio de Microbiología. Este protocolo permitió aumentar la especificidad en el diagnóstico de ITL y realizar tratamiento sólo en los casos demostrados.

Palabras clave: Quantiferon, Mantoux, Salud Laboral.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA DIVISIÓN MICOBACTERIANA: UNA NUEVA PROTEÍNA ESENCIAL QUE INTERACCIONA CON EL DIVISOMA

Autor/es: Susanne Gola y Miguel Vicente Muñoz.

Institución: Centro Nacional de Biotecnología – CSIC, Madrid.

Introducción/objetivos

Para avanzar la descripción del divisoma de *Mycobacterium* hemos identificado la proteína codificada por Rv2147c como uno de los componentes de la bacteria que interaccionan con elementos del divisoma y demostramos por una estrategia sistemática que implica la obtención de mutantes condicionales, la sobreexpresión controlada y la localización celular que se trata de una proteína esencial para la división micobacteriana.

La división celular de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) es un proceso esencial y todavía poco explotado para encontrar nuevos inhibidores que puedan atacar la tuberculosis (TB) inhibiendo la proliferación del patógeno. El proceso también parece ejercer un papel clave en la entrada y salida de la latencia y compuestos que interfieren con la dinámica de estados de proliferación y no proliferación de Mtb podrían ser candidatos para impedir la reactivación de la TB latente.

La división celular se inicia por el ensamblaje secuencial y muy coordinado de varias proteínas en el sitio de la futura división donde forman una estructura parecida a un anillo, el divisoma.

Hay diferencias importantes entre la maquinaria de división micobacteriana comparada con la de bacterias modelos como *Escherichia coli*. Mientras algunas proteínas bien conocidas por su relevancia para la construcción del divisoma de *E. coli* no están codificadas en el genoma de micobacteria, hay proteínas alternativas que están implicadas en nuevas interacciones moleculares.

Caracterizamos la división micobacteriana al nivel molecular empleando las técnicas genéticas más recientemente desarrolladas para este sistema con el objetivo final de encontrar nuevas vías de combatir la infección por Mtb.

Material y método:

Para encontrar y detallar nuevas interacciones proteicas en el divisoma utilizamos el sistema de dos híbridos de levadura (Y2H) tanto en un abordaje global de screening como en el análisis detallado de las interacciones moleculares. Por su naturaleza, los genes de división suelen ser esenciales y su desregulación es tóxica para las células. Para realizar un análisis funcional de los genes previamente identificados por Y2H como relevantes para la división combinamos la construcción de mutantes condicionales, la sobreexpresión controlada de genes, ambos procedimientos regulados por anhidrotetraciclina, y la localización de proteínas por su fusión a GFP.

Resultados:

Un ensayo del Y2H diseñado para encontrar proteínas que podrían regular la división celular micobacteriana al nivel de FtsZ, el homólogo funcional de la tubulina eucariota y primera proteína que se localiza en el divisoma, desveló una proteína, codificada por Rv2147c, como nueva pareja de interacción con MtbFtsZ. La presencia del extremo C-terminal de MtbFtsZ es esencial para esta interacción y hay actividad cruzada entre las dos proteínas derivadas de Mtb y *M. smegmatis* (Msm).

El análisis funcional del ortólogo de Rv2147c en Msm reveló que su expresión modificada, tanto por represión en un mutante condicional como por su sobreexpresión inducida, provoca un defecto grave de división que resulta en la formación de células filamentosas en estas cepas. El análisis ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión demuestra que los filamentos están totalmente exentos de septos de división. La proteína fusionada a GFP se localiza en forma de anillo en el centro de la célula y la formación de este anillo depende de la presencia de FtsZ como se puede observar en un mutante condicional de *ftsZ* en condiciones que reprimen su expresión.

La introducción de MtbRv2147c en el fondo genético del mutante condicional del ortólogo en Msm complementa su fenotipo letal en condiciones de represión lo que sugiere que los genes de las dos especies son funcionalmente equivalentes y codifican un componente esencial del divisoma micobacteriano hasta ahora no identificado.

Conclusiones:

Hemos identificado a la proteína codificada por Rv2147c como una nueva pareja de interacción con MtbFtsZ. Su función es esencial para la proliferación de Msm. Genes que codifican componentes del divisoma exhiben conservación entre las especies micobacterianas de crecimiento lento como Mtb y las del ciclo celular rápido como Msm. Demostramos que la investigación sistemática de genes de división en Msm, la bacteria no patógena, es útil para obtener conocimiento fundamental sobre la división celular del patógeno Mtb.

Palabras clave: división celular, divisoma, herramientas genéticas

PREVALENCIA DE MICOBACTERIAS ATÍPICAS EN EL ÁREA DE INFLUENCIA DE UN HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA COMUNIDAD VALENCIANA (2000 – 2011)

Autor/es: Juan M. Pazos Guarín(1), Remedios Guna Serrano(2), Luis D. Meza Antúnez(1), Beatriz Muñoz-Cobos Liria(1), Josep Prat Fornells(3), Oscar Fraile Santos(1,9), María Navarro Ors(4), Nieves Gonzalo Jiménez(4), Damiana González Granda(5), Nieves Orta Mira(6), Bárbara Gomila Sard(7), Victoria Domínguez Marqués(7,9), María Gil Fortuño(8), Rafael Borrás Salvador(1,9).

Institución: Servicios/Laboratorios de Microbiología de los hospitales: (1)Hospital Clínico Universitario, Valencia; (2)Consortio Hospital General Universitario, Valencia; (3)Hospital de Sagunto, Sagunto; (4)Hospital de la Vega Baja, Orihuela; (5)Hospital Lluís Alcanyis, Xàtiva; (6)Hospital San Francesc de Borja, Gandia; (7)Hospital General de Castellón, Castellón; (8)Hospital de la Plana, Villareal. (9)Universidad de Valencia, Facultad de Medicina y Odontología, Departamento de Microbiología, Valencia.

Introducción/Objetivo:

El objetivo ha sido conocer la frecuencia y distribución de las micobacterias de origen clínico, no pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, obtenidas de pacientes del área de influencia de un Hospital Universitario de la Comunidad Valenciana.

Material y método:

Se ha realizado un estudio retrospectivo descriptivo de los aislados estudiados durante 2000-2011. En el periodo de estudio fueron identificados mediante métodos convencionales y moleculares (Gen Probe®, bioMérieux; INNO-LiPA Mycobacteria®, Innogenetics; Genotype MTBC®, Genotype® Mycobacterium CM/AS Hain Lifescience, y secuenciación) 4.533 aislados de 2.690 pacientes; de los cuales, 769 aislados de 673 pacientes habían sido remitidos por otros centros para su identificación y estudio de sensibilidad.

Resultados:

De los aislados estudiados, 3.407 (75,2%) fueron identificados como *M. tuberculosis complex* y 1.126 (24,8 %) como micobacterias atípicas (ratio 3:1). *M. tuberculosis complex* (*M. africanum* 1: 9; *M. bovis*: 10; *M. bovis ssp. BCG*: 2; *M. caprae*: 7; *M. tuberculosis*: 1.724) fue obtenido de 1.752 pacientes (65,1%) y las micobacterias atípicas de 938 pacientes (34,9%), siendo la proporción entre ambos grupos de 1,9:1. Las micobacterias atípicas más prevalentes por paciente fueron: *M. gordonae* (217), *M. kansasii* (152), *M. fortuitum* (148), *M. chelonae* (120), *M. avium* (115), *M. intracellulare* (64) y *M. abscessus* (27). *M. lentiflavum* y *M. peregrinum* fueron aislados en 10 pacientes, cada uno de ellos, *M. mucogenicum* en nueve pacientes, *M. marinum* en siete, *M. scrofulaceum* en seis y *M. terrae* en cinco. *M. malmoense* y *M. szulgai* fueron aislados en cuatro pacientes, cada uno de ellos; *M. celatum*, *M. elephantis*, *M. frederiksbergense*, *M. interjectum*, *M. kumamotoense*, *M. simiae* y *M. xenopi* en dos pacientes, cada uno de ellos. Los aislados identificados como *M. arupense*, *M. asiaticum*, *M. aurum*, *M. bohemicum*, *M. brumae*, *M. canariense*, *M. cooki*, *M. cosmeticum*, *M. falax*, *M. gastri*, *M. goodii*, *M. holsaticum*, *M. immunogenicum*, *M. insubricum*, *M. neoaurum*, *M. nonchromogenicum*, *M. parascrofulaceum* y *M. phlei* fueron aislados de un paciente, cada uno de ellos. Un aislado reunió características genotípicas que permitieron la descripción de una nueva especie de crecimiento lento (*Mycobacterium orcellisense* sp. nov.), relacionada con *M. kumamotoense*, *M. senuense* y *M. terrae* (97%), y seis aislados de sendos pacientes están en vías de identificación (*Mycobacterium* spp.). La distribución temporal de los aislados en periodos sexenales (2000 a 2005: P1; 2006 a 2011: P2) demuestra el incremento del número de especies y de pacientes en P2 frente a P1 (42 especies frente a 22; 489 pacientes frente a 439, $p < 0,0002$).

Conclusiones:

1ª. Las micobacterias atípicas son un problema emergente ya que en esta serie suponen un tercio de las micobacterias aisladas. 2ª. Las especies más prevalentes son *M. gordonae*, *M. kansasii*, y *M. avium complex*, entre las micobacterias de crecimiento lento, y *M. fortuitum* y *M. chelonae*, entre las de crecimiento rápido. 3ª. En el periodo 2006-2011 se produjo un incremento significativo en el número de casos diagnosticados; así como, en el de especies identificadas, hecho quizás relacionado con la introducción de procedimientos moleculares más resolutivos.

POSTERS CON DISCUSIÓN (SESIÓN 4)

INFLUENCIA EN LA INCIDENCIA DE TUBERCULOSIS Y EN LA RESISTENCIA A FARMACOS DE LA INMIGRACIÓN INTERNACIONAL EN CASTILLA LA MANCHA

Autor/es: Martino Castañar, MV (1) ; Robles Domínguez, P (2); Mora Remón, F (3); Rodríguez Zurita, ME (4); Carrasco Ferrán, F (5); Asencio Egea, MA (6); Beteta López, A (7) ; Jiménez Álvarez, SM (8) ; Simarro Córdoba, E (2); Romero Portilla, C (9); Sánchez Maroto Lozano, A (10)

Institución: (1)CH de Toledo (2) H. General de Albacete (3) HGUCR C. Real (4) H. Universitario de Guadalajara (5) Sección de Epidemiología de Cuenca. (6) H. La Mancha Centro, Alcázar. (7) Hospital Gral. Ntra. Sra. del Prado, Talavera (8) H Santa Bárbara, Puertollano. (9) H. de Hellín. (10)H. Virgen de Altagracia, Manzanares.

Introducción:

La estabilización de la incidencia de tuberculosis (TB) lograda por los programas de control en los países desarrollados puede verse afectada por diversos factores que progresivamente van surgiendo, VIH, las corrientes migratorias desde países con alta incidencia de TB, la recesión económica, etc. Otro grave problema al que nos enfrentamos actualmente es la aparición de cepas con diversos grados de resistencia a los fármacos antituberculosos .

Objetivos: Evaluar la influencia que tienen sobre la prevalencia de TB, los pacientes nacidos fuera de España que residen en nuestra comunidad, y su contribución a las tasas de resistencias.

Material y método:

Estudio retrospectivo multicéntrico realizado en 9 hospitales de Castilla la Mancha y el S. epidemiología de Cuenca . El periodo de estudio fue de 5 años (2006-2010). Fueron investigados 898 pacientes, solo incluye casos de Tuberculosis con confirmación microbiológica: aislamiento de M. tuberculosis complex (TB-Mtc)

*Microbiología: Tinción de Zhiel-Neelsen y/o Auramina. Cultivo en medios sólidos y/o líquido (MGIT ó BactAlert). Antibiograma (a 856 cepas) con los sistemas de BD y BactAlert cuando se hicieron en el propio hospital. Muchas de las cepas fueron analizadas en el C.N.M.

**Revisión de las historia clínicas para investigar el país de nacimiento.

*** El N° de habitantes en nuestra comunidad, los nacidos en España y en el extranjero fueron recogidos del Instituto Nacional de Estadísticas (www.ine.es)

Resultados:

Tabla (1)	Total	Total TB-Mtc	x 10 ⁵ H	Nacidos España (NAC)	NAC TB-Mtc	x 10 ⁵ H	Nacidos Extranjero (EXT)	EXT TB-Mtc	x 10 ⁵ H
2006	1.932.261	154	7,9	1.789.180	103	5,7	143.081	51	35,6
2007	1.977.304	194	9,8	1.807.242	127	7,0	170.062	67	39,4
2008	2.043.100	201	9,8	1.826.123	123	6,7	216.977	78	35,6
2009	2.081.313	180	8,6	1.844.082	121	6,5	237.231	59	24,8
2010	2.098.373	169	8,0	1.857.234	105	5,6	241.139	64	26,5

- Pie de tabla:** Total: el n° de habitantes de la comunidad en cada año de estudio. NAC los que nacieron en España y EXT los nacidos en el extranjero. TB-Mtc el N° absoluto de casos, (x 10⁵ H) El n° de casos por cada 100,000 habitantes censados

En estos 5 años, la tasa media de TB-Mtc X 10⁵ H fue de 8.8 para el total, 6.3 para los nacidos en España (PN) y 32.4 en extranjeros (PE). La distribución de las 319 TB-Mtc de pacientes extranjeros por grupos de nacionalidades fue: América latina 77, África del norte, 63, África Subsahariana 9, Asia central 6, Asia oriental 1, Europa del este 159 y 9 de otras nacionalidades o de nacionalidad desconocida. En el estudio de susceptibilidad hallamos que presentaron algún tipo de resistencia 68 cepas de las 859 estudiadas (7.9%) de las cuales 36 procedían de PN (de 544 testadas) lo que supone un 6.6% y 32 de PE (de 313 cepas testadas) que implica 10.2%. Se observó monoresistencia en 43

cepas, (26 en PN y 17 en PE). 22 cepas se consideraron MDR-tb (9 PN y 13 PE) y 3 XDR-Tb (1 PN y 2 PE).

Conclusiones:

La prevalencia de TB es muy superior en los nacidos fuera de España ya que la tasa media de aislamientos de Mtc por cada 105 Habitantes en estos pacientes es de 32,4 frente a una tasa de 6.3 en la población autóctona, probablemente exista un sesgo importante en este dato ya que muchos extranjeros no figuran en el censo. Los nativos de Europa del Este son los que más casos aportan (154). No podemos saber si el debut de la enfermedad se debe al desarrollo de su TB latente o a contagios ocurridos durante su estancia en nuestro país (no se realizaron estudios RFLP). Podemos percibir un mayor índice de resistencias a fármacos antituberculosos en cepas aisladas en pacientes extranjeros, sobre todo en MDR-Tb sin apreciarse diferencias significativas en lo que a su procedencia se refiere.

Palabras clave: Inmigración Tuberculosis Resistencias

EPIDEMIOLOGÍA Y SIGNIFICACIÓN CLÍNICA DE LOS AISLAMIENTOS DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS EN MUESTRAS RESPIRATORIAS. SERIE DE 4 AÑOS EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CANARIAS

Autor/es: Miriam Hernández Porto, Teresa Delgado Melián, María José Ramos Real, Milagros Cuervo Abarquero, María Antonia Miguel Gómez, Yanet Pedroso Fernández, María Lecuona Fernández.

Institución: Hospital Universitario de Canarias. Servicio de Microbiología y Medicina Preventiva

Introducción/Objetivos:

Diversos estudios sugieren un incremento de la enfermedad pulmonar causada por Micobacterias no tuberculosas (MNT), afectando tanto a pacientes inmunocompetentes como inmunodeprimidos. Nuestros objetivos son: estudiar la epidemiología de las MNT en nuestro medio durante un periodo de cuatro años, su incidencia anual, así como valorar su significado clínico en muestras respiratorias (MR).

Material y método:

Se incluyeron todos los aislamientos de MNT obtenidos en el Servicio de Microbiología entre Enero 2008-Diciembre 2011 y se clasificaron en episodios en función de la especie y de la fecha de aislamiento. Las muestras clínicas no estériles se descontaminaron según el método N- acetil-L-cisteína/ NaOH y posteriormente se inocularon en medio sólido (Lowenstein-Jensen) y en medio líquido (Sistema BACTEC MGIT 960®). Las muestras de sangre fueron recuperadas a partir de hemocultivos convencionales (sistema Bact/ Alert®). Las cepas aisladas fueron identificadas mediante hibridación reversa (INNO-Lipa Mycobacteria v2®) y en algún caso mediante PCR (Speed-oligo®). Se consultaron las historias clínicas y se aplicaron los criterios de la American Thoracic Society (ATS) 2007. Realizamos un análisis de la evolución anual de la incidencia acumulada (IA) por 100.000 habitantes de los casos de tuberculosis, casos de infección pulmonar por MNT y aislamientos de MNT). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de chi cuadrado.

Resultados:

Se obtuvieron 185 aislamientos de MNT, correspondientes a 142 episodios y a 138 pacientes. La distribución de los aislamientos fue: *M. fortuitum* 133 (71,9%), *M. chelonae* 20 (10,8%), *M. avium* complex 11 (6%), *M. simiae* 9 (4,8%), *M. gordonae* 7 (3,7%), *M. mucogenicum* 2 (1%), *M. marinum* 2 (1%), *M. xenopi* 1 (0,5%). La distribución de los aislamientos por muestras fue: MR 155 (83,7%), hemocultivos 19 (10,27%), biopsia cutánea 3 (1,6%), absceso cutáneo 2 (1%), orina 2 (1%), exudado úlcera 1(0,5%), exudado catéter 1(0,5%), jugo gástrico 1 (0,5%), heces 1 (0,5%). La distribución de las MR fue: esputo 146 (94,19%), secreción bronquial 7 (4,5%), LBA 1 (0,6%), biopsia pulmón 1 (0,6%). Las 155 MR correspondieron a 118 pacientes, de los cuales 98 presentaron un único aislamiento de MNT, mientras que 20 presentaron más de un aislamiento repetido de la misma especie. De los pacientes con aislamientos en MR, 10 cumplieron los criterios de la ATS (siendo valorados como 10 casos clínicos) representando el 8,4% de los pacientes con aislamiento de MNT en MR. Las MNT causantes de infección respiratoria fueron: *M. fortuitum* 6 (60%), *M. avium* complex 2 (20%), *M. chelonae* 1 (10%), *M. simiae* 1 (10%). El 60% fueron mujeres, la edad media 58 +14 años y el 99% de nacionalidad española. Como hallazgos radiológicos y clínicos destacaron: Bronquiectasias 7, tos crónica 7, secreción purulenta 5, disnea 4. Factores de riesgo: Bronquiectasias previas 6, Tuberculosis previa 3, EPOC 1, fibrosis quística 1, VIH 1y Diabetes 1. Recibieron tratamiento específico 8 casos.

Se observaron las siguientes IA (Tabla 1)

Año	2008	2009	2010	2011	Incremento 2008 - 2011
Aislamientos MNT	4,22	5,81	7,61	10,03	p<0,001
CASOS MNT	0,46	0,23	0,22	1,33	p=0,36
TBC	6,57	6,97	4,70	8,69	P=0,26

Conclusiones:

Hemos observado un incremento significativo de los aislamientos de MNT entre los años 2008 y 2011, no siendo así en *Mycobacterium tuberculosis*.

Las especies diagnosticadas con más frecuencia han sido aquellas de crecimiento rápido.

A pesar del elevado número de aislamientos de MNT solo un pequeño porcentaje de aislamientos han resultado tener significación clínica a nivel pulmonar.

Palabras clave: Micobacterias no tuberculosas. Epidemiología. Patología pulmonar

CARACTERIZACIÓN DE FTSZ DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN VITRO

Autor/es: Cristina Ortiz Cabello, Miguel Vicente Muñoz y Susanne Gola.

Institución: Centro Nacional de Biotecnología – CSIC, Madrid.

Introducción/objetivos:

Caracterizamos las propiedades bioquímicas y biofísicas de FtsZ obtenida de *Mycobacterium tuberculosis* (MtbFtsZ) para desarrollar ensayos de inhibición in vitro.

FtsZ es una proteína esencial para la división celular. Es el homólogo funcional de la tubulina eucariótica y polimeriza dependiendo de GTP para formar una estructura similar a un anillo en el centro de la célula. Es el primer componente que se ensambla en el sitio de la división y por lo tanto una proteína central para la proliferación bacteriana.

FtsZ es la diana molecular de varios compuestos inhibitorios lo que corrobora la idea que la división celular y específicamente los componentes del divisoma son en principio utilizables como dianas de nuevos compuestos antibacterianos para prevenir la Proliferación.

Material y método:

Se produjo MtbFtsZ como proteína fusionada a seis histidinas en *Escherichia coli* para purificarla a continuación por cromatografía de afinidad en condiciones nativas. La formación de polímeros de la proteína purificada se observó indirectamente por light scattering y directamente por microscopía electrónica de transmisión. FtsZ de *E. coli*, una proteína bien caracterizada, sirvió como control en nuestros ensayos in vitro.

Resultados:

Para encontrar las condiciones en que se puede obtener MtbFtsZ mayoritariamente como proteína soluble comparamos la producción heteróloga en diferentes estirpes de *E. coli* y determinamos que la cepa C41 tiene el mejor rendimiento de proteína nativa. Existen datos discrepantes sobre la influencia que puede tener la presencia de aminoácidos adicionales en los dos extremos, N-terminal y C-terminal, de MtbFtsZ. En nuestros ensayos ninguna de las versiones provistas de la cola de histidina tiene actividad. Sin embargo, la proteólisis específica por la proteasa trombina que libera el tag de afinidad de la proteína purificada produce una forma de MtbFtsZ capaz de polimerizar. Observamos que las estructuras que adoptan los polímeros de MtbFtsZ son polimórficas y dependen de las condiciones de polimerización, por ejemplo la concentración de magnesio.

Conclusiones:

Hemos purificado MtbFtsZ y iniciado su caracterización in vitro. Los ensayos bioquímicos complementarán nuestro sistema experimental in vivo para encontrar compuestos que inhiben la proliferación micobacteriana a nivel de los componentes del divisoma.

Palabras clave: división celular, ftsZ, polimerización

QUANTIFERON®-TB GOLD IN-TUBE (QFT-GIT) VERSUS PRUEBA DE LA TUBERCULINA (PT): RESULTADOS DISCORDANTES EN DIFERENTES GRUPOS DE ALTO RIESGO

Autor/es: Armando Alberte Castiñeiras, Manuel Gonzalez Sagrado, Amparo Aragón Francos, Rosa Conde Vicente y Pilar Pérez Pascual.

Institución: Microbiología. Hospital Río Hortega. Valladolid

Objetivo:

Evaluar retrospectivamente la prueba QFT-GIT para el diagnóstico de infección latente tuberculosa (ILT) comparándola con la PT en un área de baja endemicidad de tuberculosis.

Material y método:

La prueba QFT-GIT fue realizada en 2006 muestras de sangre total, pertenecientes a 877 hombres (43,7%) y 1129 mujeres (56,3%), con una edad media de $45,3 \pm 17,4$ años (rango, 1-94 años), clasificados en las siguientes categorías: A. Pacientes con tuberculosis microbiológicamente activa (TB) (1,9% del total); B. Contactos íntimos (10,7%); C. Pacientes con clínica y/o radiología de tórax sospechosas (14,9%); D. Pacientes con Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o terapia inmunosupresora (48,6%); E. Trabajadores sanitarios (23,9%). La prueba QFT-GIT fue realizada de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La Prueba de la tuberculina fue realizada en 501 pacientes y definida como positiva si la induración era mayor de 5 mm. La concordancia entre QFT-GIT y PT fue calculada mediante el índice kappa en los mismos pacientes (N=501).

Resultados:

Globalmente, hubo 154/501 casos (30,7%) con resultado positivo para QFT, con la siguiente distribución por categorías: 75%, 44,8%, 38,9%, 29,1% y 19,6% por categorías (A, B, C, D y E, respectivamente). La PT fue positiva en 160/501 casos (31,9%), con la siguiente distribución: 50% (A), 35,4% (B), 44,4% (C), 25,6% (D) y 33,5% (E). La concordancia global fue de 0,45, siendo de 0,77 en la Categoría C (Tabla 1).

Categoría	N	Q+ T-	Q- T+	kappa	IC 95%	Sig
Global	499*	57 (11,4%)	62 (12,4%)	0,45	0,36 – 0,53	<0,001
A	8	2 (25,0%)	0 (0,0%)	0,50	-0,02 – 1,00	NS
B	94	20 (21,3%)	10 (10,6%)	0,35	0,16 – 0,53	0,001
C	36	1 (2,8%)	3 (8,3%)	0,77	0,56 – 0,98	<0,001
D	199	23 (11,6%)	16 (8,0%)	0,51	0,37 – 0,64	<0,001
E	158	11 (7,0%)	33 (20,9%)	0,30	0,15 – 0,46	<0,001

Tabla 1, Quantiferon vs tuberculina, Estudio de concordancia

(*): se excluyen 2 pacientes con QFT indeterminado

Conclusiones:

QFT-GIT es más útil para el diagnóstico de TB que la PT. Con nuestros datos, la mayor concordancia entre ambos métodos fue la observada en los pacientes clínica o radiológicamente sospechosos de tuberculosis, siendo moderada en los infectados por HIV o los que reciben inmunosupresores. Por el contrario, la concordancia más pobre fue observada en los trabajadores sanitarios. Por lo tanto, el QFT-GIT reduce el sobre-diagnóstico de ILT haciendo innecesaria la quimioprofilaxis.

Palabras clave: IGRA, interferón, infección latente tuberculosa

AISLAMIENTO DE MICOBACTERIAS DEL GRUPO M.FORTUITUM/M.CHELONAE EN MUESTRAS QUIRÚRGICAS A PARTIR DE MEDIOS DE CULTIVO CONVENCIONALES MEDIANTE PROLONGACIÓN DE LA INCUBACIÓN DE LOS CULTIVOS

Autor/es: C.Cuartero Bello, MA. Meseguer, A. Shan Nuñez, Y. González-Da Bouza, G.Gabilondo, R. del Campo,A. Sánchez Diaz, E.Gómez Mampaso.

Institución: Servicio de Microbiología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid.

Introducción:

En los pacientes inmunocompetentes, las infecciones por micobacterias del área quirúrgica, principalmente de cirugía ortopédica y de cirugía general, se deben fundamentalmente al grupo M.fortuitum/M.chelonae. En muchas ocasiones, las muestras procedentes de estas infecciones no son remitidas para el estudio de micobacterias pero se mantienen en incubación en los medios habituales hasta 14 días para la detección de otros patógenos, fundamentalmente Staphylococcus epidermidis, Propionibacterium acnes y Corynebacterium spp.

Objetivos:

Observar la incidencia de este grupo de micobacterias en enfermos quirúrgicos, su evolución a lo largo de 35 años así como su detección en los cultivos habituales en los últimos 8 años.

Material y método:

Se han revisado los registros de enfermos con micobacterias de crecimiento rápido en muestras quirúrgicas agrupando por periodos de 7 años los hallazgos obtenidos durante el periodo total de estudio (1977-2011). Durante este tiempo los procedimientos para el cultivo y aislamiento de micobacterias de crecimiento rápido no han sufrido grandes variaciones en el laboratorio de micobacterias. Por el contrario, en la última década, en el procesamiento de las muestras quirúrgicas, líquidos peritoneales, catéteres y reservorios se ha modificado el tiempo de incubación de los medios convencionales (Columbia agar sangre y agar chocolate) prolongándose hasta los 14 días.

Resultados:

En la tabla adjunta se expresan los resultados por periodos de tiempo y microorganismos.

	1977	1984	1991	1998	2005	1977
	1983	1990	1997	2004	2011	2011
<i>M.fortuitum</i>	1	1	2	3	11	18
<i>M.chelonae</i>	3	1	1		2	7
<i>M.abscessus</i>					1	1
Otras grupo IV			2	1		2
Total	4	2	5	4	14*	28

*No solicitado el estudio de micobacterias en 11 casos.

Se han aislado 28 micobacterias del grupo crecimiento rápido; M.fortuitum en 18 enfermos, M.chelonae en 7, M.abscessus en 1, no consiguiendo la identificación en dos aislados. En el último periodo de 7 años hemos realizado el diagnóstico en 14 ocasiones, en 11 de las cuales, 78,5% no se había solicitado el estudio de micobacterias, obteniendo su crecimiento en medios de cultivo convencionales del laboratorio de exudados, en 9 casos gracias a la incubación prolongada.

Conclusiones:

- 1) M.fortuitum es la bacteria con mas frecuencia detectada.
- 2) Mas del 50% de los enfermos corresponden al área de cirugía ortopédica.
- 3) No existen diferencias diagnósticas entre los primeros periodos de estudio pero sí en el último periodo donde se realizan 14 diagnósticos, 11 de los cuales (78,5%) tienen lugar en el laboratorio de exudados quirúrgicos, 9 de ellos debido a la prolongación del tiempo de cultivo.

Palabras clave: M.fortuitum, cirugía, incubación prolongada.

ESPONDILODISCITIS POR MICOBACTERIAS. REVISIÓN DE 16 CASOS

Autor/es: M.L Monforte Cirac, N. Báez López, M. P. Palacián Ruiz, M.J Revillo Pinilla, M.A Lezcano Carrera

Institución: Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Miguel Servet

Introducción/Objetivos:

La espondilodiscitis infecciosa es una entidad rara cuyo diagnóstico en muchas ocasiones es difícil debido a lo inespecífico de sus síntomas, siendo el diagnóstico etiológico muy importante para prescribir un tratamiento correcto.

El mal de Pott, es la enfermedad granulomatosa más frecuente de la columna vertebral, la puerta de entrada del bacilo a la columna es fundamentalmente por vía hematogena. Un diagnóstico correcto y precoz es esencial, ya que con un tratamiento adecuado mejora el pronóstico del paciente.

El objetivo de este estudio ha sido revisar los casos de espondilodiscitis producidos por micobacterias entre los años 2002-2011 en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Miguel Servet.

Material y método:

Revisión de los casos de espondilodiscitis producidas por micobacterias, recogiendo las características clínicas y microbiológicas, estudiando las siguientes variables: año de aislamiento, edad, sexo, nacionalidad, sintomatología clínica, pruebas diagnósticas, localización de la lesión, baciloscopias, sensibilidad a tuberculostáticos de 1ª línea: isoniacida (H), rifampicina (R), estreptomycin (S) y etambutol (E) y tratamiento recibido por el paciente.

Resultado:

Los datos obtenidos se reflejan en la siguiente tabla.

Caso	Año	Sexo	Edad	Nacionalidad	Micobacteria	Muestra	Afectación	BAAR	AP	VIH	PPD	S. clínicos	Sensibilidad
1	2004	H	27	Española	MTB	PAAF	D10-D11	P(++)	SI	D	D	Dorsalgia	S
2	2005	H	23	Africana	MTB	PAAF	D8-D9	N	SI	N	D	Dorsalgia	S
3	2006	H	53	Española	MTB	PAAF	D7-D11	P(++)	SI	D	D	Dorsalgia	S
4	2006	M	21	Rumana	MTB	PAAF	D12-L1	P(+)	NO	N	D	Dorsalgia, fiebre	S
5	2008	H	27	Española	MTB	Biopsia	L3-S1	P(+)	SI	P	D	Lumbalgia, fiebre	S
6	2008	H	32	Española	MTB	PAAF	D11	P(+)	NO	N	+	Dorsalgia, fiebre	S
7	2009	M	84	Española	MTB	Biopsia	L3-L4	N	SI	N	+	Lumbalgia	S
8	2009	H	29	Africana	M.africanum	PAAF	D1-L1	N	NO	D	+	Cervicalgia, Dorsalgia	S
9	2009	M	69	Española	MTB	Biopsia	D9-I1	N	SI	D	D	Dorsalgia, paraparesia	S
10	2009	H	24	Africana	M.africanum	Biopsia	C7-D2	N	SI	N	D	Dorsalgia, pérdida de fuerza	S
11	2009	H	84	Española	MTB	Biopsia	D6-D7	N	SI	N	D	Dorsalgia, pérdida peso, astenia	S
12	2010	H	75	Española	MTB	PAAF	L4-I5	N	SI	D	D	Dorsalgia	S
13	2010	H	33	Rumana	MTB	Biopsia	D9-D11	N	SI	N	D	Lumbalgia, fiebre	S
14	2010	M	37	Africana	M.bovis	Biopsia	C2-C4	N	SI	N	+	Coxalgia, limitación funcional	S R:Pz
15	2011	M	49	Española	M.intracellulare	Biopsia	L3-L4	N	NO	N	D	Lumbalgia	R
16	2011	H	28	Africana	MTB	Biopsia	D4-D6	N	NO	N	+	Dorsalgia, fiebre	S

H: Hombre. M: Mujer. MTB: Mycobacterium tuberculosis. PAAF: Punción con aguja fina. P: Positiva. N: Negativa. D: Desconocido.

S: Sensible a tuberculostáticos de 1ª línea. R: Resistente a todo, excepto cicloserina y claritromicina.

A todos ellos se les realizó Resonancia Nuclear Magnética (RMN) y Radiografía de columna y tórax.

Todos los pacientes recibieron tratamiento con: H + R + S + E

Conclusiones:

Hemos observado un aumento del número de casos a lo largo del periodo estudiado, siendo el año 2009 en el que más casos se han aislado.

La sintomatología clínica fue similar a la referida en otros estudios sobre espondilodiscitis piógenas, pero más larvada, lo que conlleva a un mayor retraso diagnóstico.

No se detectó ninguna resistencia en los aislados de M.tuberculosis

La RMN fue diagnóstica en todos los casos, coincidiendo con otros autores, creemos que esta técnica permite establecer un diagnóstico precoz y debería considerarse como la prueba de elección cuando se sospecha una espondilodiscitis

Palabras clave: Espondilodiscitis, Micobacterias, Diagnóstico

AISLAMIENTO DE CEPAS XDR EN UN CENTRO DE REFERENCIA, EN LOS ÚLTIMOS AÑOS.

Autor/es: P. Ruiz; JB. Gutierrez , M. Causse y M. Casal.

Institución: Centro de Referencia de Micobacterias. Departamento Microbiología. Facultad de Medicina. Servicio de Microbiología. Hospital Reina Sofia . Córdoba. España.

Introducción:

El aislamiento de cepas con resistencia a los principales fármacos utilizados en el tratamiento de la tuberculosis constituye un grave problema para el control de la enfermedad. La existencia de cepas extremadamente multiresistentes (XDR, XXDR) ha causado una considerable alarma. En Octubre de 2006 (OMS) definió estas cepas XDR como aquellas que presentaban resistencia a rifampicina , isoniazida y una fluorquinolona y al menos una de las tres antituberculosos inyectables (capreomicina, amikacina, kanamicina). Posteriormente fué propuesto el término XXDR para definir las cepas con resistencia a todos los fármacos de segunda línea.

Nuestro objetivo ha sido estudiar la posible aparición de cepas XDR en nuestro Centro , en los últimos años.

Material y método:

Se utilizaron un total de 553 cepas de M. tuberculosis recibidas en nuestro Centro desde 2006-2011. Todas fueron aisladas para descartar mezclas e identificadas mediante procedimientos bioquímicos, HPLC, Accuprobe ó Genotype. La determinación de las resistencias se llevó a cabo por el sistema MGIT 960, para los fármacos, estreptomicina (STR), rifampicina,(RIF) , etambutol (ETB), pirazinamida (PZA), amikacina (AMK), capreomicina (CAP), kanamicina (KAN), etionamida (ETH), cicloserina (CSN), pas (PAS, rifabutina (RFB), rifapentina (RFP), ofloxacin (OFX), ciprofloxacina (CIP), moxifloxacina (MXF), levofloxacina (LVX), linezolid (LZD).

Resultados:

De las 553 cepas estudiadas, 76 (13,85 %) presentaron alguna resistencia a los fármacos de 1ª línea. 43 cepas (7,77 %) fueron resistentes a algún fármaco de segunda línea. Se detectaron 31 (5,6%) cepas MDR y 5 cepas (0,94 %) fueron XDR de acuerdo con la definición establecida.

Las cepas MDR fueron las siguientes:

RIF+INH+CAP+OFX	1
RIF+INH+STR+ETB+CAP+RFB+OFX+CIP	2
RIF+INH+STR+CAP+KAN+ETH+OFX+RFB	2

Conclusión :

La detección de estas cepas XDR en los cultivos recibidos en nuestro Centro, nos alerta de la necesidad de realizar estudios de resistencia al mayor número de fármacos posibles cuando se sospeche la posibilidad de aislamientos con estas resistencias.

Palabras clave: Tuberculosis, resistencia, XDR

POSTERS CON DISCUSIÓN (SESIÓN 7)

ESTUDIO DE CINCO AÑOS DE LA EVOLUCION DE LA TUBERCULOSIS EN EL AREA SANITARIA DEL HOSPITAL DE PUERTO REAL

Autor/es: Freyre Carrillo C., Rodiere K., Aznar Marin P., Espinosa García MJ., Jesús de la Calle I., Martínez Rubio C., Pérez Ramos S.

Institución: Hospital Universitario de Puerto Real (Cádiz)

Introducción:

La tuberculosis (TBC) sigue siendo un serio problema de salud pública. Nuestro Hospital abarca un área sanitaria que incluye la población reclusa de tres centros penitenciarios diferentes. Nuestro objetivo ha sido conocer el número de casos de TBC que presentamos en nuestra área en los últimos cinco años y el número de solicitudes para estudio de micobacterias que registramos anualmente.

Material y Método:

Se han recogido datos de todas las solicitudes procesadas para estudio de Micobacterias desde el año 2007 a 2011 mediante el sistema estadístico Omnium (Roche). Se han seleccionado datos de resultados de cultivo micobacteriano, servicio solicitante, nombre y apellidos del pacientes, así como el tipo de muestra recogida. Los datos obtenidos se han analizado mediante el gestor de bases de datos Access.

Resultados:

A lo largo de estos últimos 5 años se ha observado un mantenimiento de los casos de TBC durante los años 2008-2009 (43 y 39 casos respectivamente), con un descenso a casi la mitad en los últimos dos años (22 y 23 casos). En cuanto al tipo de muestra, la mayoría de los aislamientos de MTB fue en muestras de esputo. Los servicios donde se produjeron los aislamientos se detallan en la tabla:

	2007	2008	2009	2010	2011
Nº PETICIONES	2256	2522	2452	2002	1593
Nº PACIENTES	1463	1807	1742	1505	1189
Nº CASOS MTB	32	43	39	22	23
Procedencia casos:					
CCEE Neumología	7	2	8	2	7
CCEE Infecciosos	4	3	4	1	3
Urgencias	4	4	10	4	3
Centro Salud	1	14	4	2	0
Hospital	8	15	9	11	5
Prisión	0	2	3	2	5

De la misma manera se han reducido el número de peticiones, especialmente en el año 2011, así como el número de pacientes estudiados. En los dos últimos años del estudio, se ha detectado que son mucho menores el número de peticiones repetidas por paciente. El incremento en el número de peticiones en el año 2008 es demandada fundamentalmente por los centros periféricos y la planta del hospital, previsible puesto que fueron los servicios con mayor número de casos de TBC. En el año 2009 disminuyen considerablemente las solicitudes desde centros de salud y se incrementan notablemente las de los centros penitenciarios. Durante los años 2010 y 2011 se observa un descenso en general de todas las solicitudes para estudio de TBC.

Conclusiones:

Observamos que en los dos últimos años del estudio han disminuido los casos de TBC en nuestra área y por ello el número de solicitudes para estudio de micobacterias.

Es destacable el reducido número de casos de TBC en los centros penitenciarios.

La mayoría de los casos de TBC son diagnosticados en pacientes ingresados en la planta del hospital.

Palabras clave: Tuberculosis, solicitudes, prisión.

TUBERCULOSIS LARÍNGEA EN PACIENTE CON DISFONÍA. A PROPÓSITO DE UN CASO

Autor/es: Freyre Carrillo C. Aznar Marin P., Espinosa García M.J., Rodiere Kathlyn, García Valdivia MS., Pérez Ramos Santiago

Institución: Hospital Universitario de Puerto Real (Cádiz)

Varón de 31 años que ingresa de forma programada para intervención quirúrgica por padecer desde hace meses una disfonía intensa, crónica asociada a una laringitis severa. Fumador de 20 cigarrillos al día, bebedor de 4-5 cervezas al día y consumidor ocasional de cannabis.

Se le realiza al paciente una laringoscopia directa observándose una lesión de aspecto coliflorado, cubierta de mucosa de aspecto normal, sangrante al roce que se extiende desde la comisura posterior hasta la comisura anterior, afectando al cartilago aritenoides derecho, a la banda derecha, y a la cuerda vocal derecha en su totalidad. Se extirpa la banda derecha para estudio anatomopatológico intraoperatorio, que es informado como “cambios inflamatorios sin signos de malignidad”. Y se envía muestra al laboratorio de Microbiología para estudio de HPV y micobacterias.

Durante la intervención el paciente presenta tensiones arteriales muy altas sin poder controlarlas. Tras la intervención el paciente es trasladado a URP por presentar compromiso respiratorio, sudoración profusa, taquicardia, taquipnea, diagnosticándose de cardiopatía isquémica hipertensiva y edema agudo de pulmón. El paciente es valorado por el servicio de cardiología. El ecocardiograma se informó como: Ventrículo izquierdo ligeramente dilatado con aquinesia apical, y septo apical con FE 45%. Se le realizó bioquímica de urgencia que presentó ligera elevación de los marcadores cardíacos (troponina en 7). El diagnóstico fue Síndrome Coronario Agudo postoperatorio (SCA postoperatorio) y al paciente se le trató con clopidogrel, emconcro, ramipril, pantoprazol, urbason y distraneurine.

En cuanto al estudio Microbiológico: se realizó PCR para detección en muestra directa de Mycobacterium tuberculosis mediante el sistema GeneXpert (Cepheid) además de realizarse cultivo de micobacterias en medios convencionales (Lowestein y MGIT). La PCR fue positiva, informándose a las pocas horas de la llegada de la muestra al laboratorio del resultado, mostrando además sensibilidad a rifampicina. El cultivo de micobacterias también fue positivo y el antibiograma sensible a las cuatro drogas testadas (isoniazida, rifampicina, etambutol y estreptomycin). No se detectó HPV de alto riesgo.

El diagnóstico fue Tuberculosis laríngea. Al paciente se le prescribió tratamiento con Rimstar (Mayo-Junio2011) y Rifinah (Junio 2011-Junio2012).

Tras darle el alta, el paciente es remitido a la consulta de infecciosos para estudio y seguimiento. Solicitan estudio de micobacterias en esputo. En una primera muestra, presentó baciloscopia negativa y cultivo positivo para el Complejo Mycobacterium tuberculosis.

Se envían 2 esputos más, siendo las baciloscopias en ambos positivas (5 bacilos por campo) y cultivo positivo para Mycobacterium tuberculosis. Los cultivos y baciloscopias se negativizan al mes de tratamiento. Los cultivos de control enviados en el mes de Enero de 2012 se mantienen negativos.

Actualmente el paciente está asintomático, presenta buen estado general, y buena tolerancia al nuevo tratamiento.

Palabras clave: Tuberculosis, otorrino, disfonía

EVOLUCION DE LA TUBERCULOSIS DE LOCALIZACIÓN URINARIA EN UN HOSPITAL TERCIARIO DURANTE LOS ULTIMOS 30 AÑOS

Autor/es: I Gómez-García*, C. Cuartero Bello, Y. González-Dabouza, A. Shan Núñez, M. Romero Molina*, M. Perona, F.J. Burgos, A. Sánchez Díaz, E. Gómez Mampaso.

Institución: Hospital Ramón y Cajal. Madrid. Hospital Virgen de la Salud, Toledo*.

Introducción:

En España la tuberculosis (TB) humana ha disminuido progresivamente en los últimos años, a pesar de las circunstancias de la coinfección con el VIH y de la inmigración. Sin embargo la TB extrapulmonar no ha disminuido en la proporción que se podría esperar y dentro de esta no es bien conocida la incidencia de la TB de localización urinaria, TBU, y en ocasiones, su significado clínico, por lo que hemos tratado de: 1) Evaluar incidencia de la TBU en el momento actual y conocer cual ha sido su evolución a lo largo de los últimos 35 años en el Hospital Ramón y Cajal. 2) Definir las formas clínicas de la TB en las que se aisló *Mycobacterium tuberculosis* en la orina.

Material y método:

Se han revisado los registros de los enfermos con aislamiento de *M. tuberculosis* en la orina desde 1977-2011, analizando la incidencia por periodos de 5 años y considerando la forma clínica de la TB y la coinfección por VIH.

Resultados:

Vienen expresados en la tabla adjunta.

Periodo	Enfermos TB			Enfermos VIH(-)				Enfermos VIH(+)					
	Total	Nº	%	Total	Nº	%	TBUG	TBDI	Total	Nº	%	TBUG	TBDI
1977-81	489	141	28,8	489	141	28,8	89,4	10,6	0	0	0	0	0
1982-86	515	102	19,8	491	94	19,1	85,1	14,9	24	8	33,3	12,5	87,5
1987-91	678	94	13,9	499	51	10,2	84,3	15,7	179	43	24,0	2,3	97,7
1992-96	716	89	12,4	404	31	7,7	89,5	10,5	312	58	18,6	10,4	89,6
1997-01	473	53	11,2	365	26	7,1	80,8	19,2	108	27	25,0	7,4	92,6
2002-06	365	38	10,4	319	21	6,6	76,2	23,8	46	16	34,8	0	100
2007-11	303	37	12,2	279	23	8,2	89,9	13,1	29	14	48,3	0	100
1977-11	3.539	553	15,6	2.846	387	13,6	86,6	13,4	698	166	23,8	1,4	98,6

Tabla.-Enfermos con aislamiento de *M. tuberculosis* en orina, VIH(-) y VIH(+) 1977-2011.

TBUG: TB urogenital. TBDI: TB diseminada

Conclusiones:

- 1) Durante este periodo de tiempo se han diagnosticado 3.539 enfermos de tuberculosis de los cuales 553, (15,6 %) tenían localización urinaria.
- 2) La localización urinaria de la TB ha disminuido desde 28,8% al 12,2% de los enfermos diagnosticados de TB durante el periodo 1977 al 2011.
- 3) En los enfermos inmunocompetentes, la disminución en números absolutos ha sido de 141 enfermos en el quinquenio 1977-81 a 23 enfermos en el periodo 2007-11. En la inmensa mayoría de los casos se corresponde con TBUG y en menos del 15% a TBDI.
- 4) En los enfermos VIH(+) se ha producido un descenso del nº de enfermos, paralelo a la disminución a los casos de SIDA y a la efectividad de los tratamientos antirretrovirales; al contrario que en los enfermos VIH(-) la inmensa mayoría de los casos corresponde con una TBDI y son excepcionales los casos de una TBUG.
- 5) *M. tuberculosis* se ha aislado 532 enfermos (96,2%), *M. bovis* y BCG en 21 (3,8%).

Palabras clave: *M. tuberculosis* en orina, Tuberculosis urogenital, Tuberculosis diseminada

TUBERCULOSIS INFANTIL: ESTUDIO DE 10 AÑOS

Autor/es: Inmaculada Guerrero-Lozano, Pilar Aznar-Marín, Lidia García-Agudo, Pedro García-Martos, María José Rodríguez-Jiménez, Manuel Rodríguez-Iglesias.

Institución: UGC Microbiología. Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz.

Introducción:

La tuberculosis es un problema importante de salud en todo el mundo. En países en vías de desarrollo, se encuentra afectada el 30% de la población menor de 15 años (sobre todo menores de 5 años). La presentación extrapulmonar es la más frecuente en este período de edad, mientras que en la población adulta es la forma pulmonar. El objetivo de este trabajo ha sido revisar la incidencia de tuberculosis infantil en el Área Sanitaria de Cádiz, durante los últimos 10 años.

Material y método:

Se realizó un estudio retrospectivo de los nuevos casos de tuberculosis diagnosticados microbiológicamente en niños menores de 15 años en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Puerta del Mar, de Cádiz, durante el período comprendido entre el año 2002 y 2011. En los pacientes pediátricos se investigaron los siguientes parámetros: edad, sexo, procedencia, forma clínica de tuberculosis, reacción de Mantoux, tipo de muestra diagnóstica, especie aislada y sensibilidad de las cepas a fármacos antituberculosos. El diagnóstico de tuberculosis se realizó mediante tinción de Ziehl-Neelsen y cultivo en medios de Löwenstein-Jensen y Middlebrook 7H9. La sensibilidad se llevó a cabo con el método SIRE.

Resultados:

En el período estudiado detectamos 274 nuevos casos de tuberculosis (tasa de infección anual de 13,7/100.000 habitantes), de los cuales 20 (7,3%) correspondieron a pacientes de edad pediátrica (tasa de infección anual de 1/100.000 habitantes). La edad de los pacientes osciló entre los 2 meses y los 14 años, con un predominio de 1 y 5 años (60%). Un 55% de los casos correspondieron al sexo femenino. De los 20 pacientes con tuberculosis, 10 eran norteafricanos (6 saharauis y 4 marroquíes), por lo que la tasa de infección en la población pediátrica de nuestra zona desciende (0,5/100.000 habitantes). Solamente 4 pacientes presentaron primoinfección pulmonar (2 marroquíes y 2 españoles); el resto, mostraron formas extrapulmonares: 8 meningitis, 4 linfadenitis, 2 pleuritis, 1 peritonitis y 1 pericarditis. La reacción de Mantoux fue positiva en el 75% de los niños. El diagnóstico microbiológico se realizó preferentemente en jugo gástrico (45%). En todos los casos la etiología se debió a *Mycobacterium tuberculosis*, y en un paciente con tuberculosis pulmonar se aisló además *M. kansasii*. Todas las cepas mostraron sensibilidad a antituberculosos de primera línea.

Conclusiones:

La tasa interanual de tuberculosis ha descendido drásticamente en nuestra zona desde el año 2000, y en los últimos 5 años de manera gradual (no supera los 12 casos/100.000 habitantes). La tuberculosis en niños supone un 7,3% del total de casos registrados en los últimos diez años. La incidencia en población pediátrica autóctona no supera 0,5 casos/100.000 habitantes y se mantiene estable. La edad más frecuente de presentación es menos de 5 años, con un ligero predominio del sexo femenino. La forma pulmonar no es frecuente (20%); predomina la tuberculosis extrapulmonar (80%): meningitis (40%) y linfadenitis (20%). La reacción de Mantoux no es positiva en todos los casos. El jugo gástrico es la muestra con mayor rendimiento diagnóstico.

Palabras clave: Tuberculosis, pediatría, tuberculosis extrapulmonar, meningitis, linfadenitis.

RESISTENCIAS DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EN MENORES DE 15 AÑOS EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO MIGUEL SERVET EN EL PERIODO COMPRENDIDO ENTRE 2000-2011

Autor/es: M.L Monforte Cirac, M.A Lezcano Carrera, N. Báez López, F. de Juan Martín, M.J Revillo Pinilla, S. Samper Blasco

Institución: Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Miguel Servet.

Introducción/Objetivo:

La enfermedad tuberculosa en niños es un signo de transmisión continua de la infección, las formas graves de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar pueden contribuir a un incremento de las tasas de mortalidad.

En los países en vías de desarrollo el 40% de los casos de tuberculosis se producen en menores de 15 años.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la incidencia de tuberculosis (TBC) en menores de 15 años y la sensibilidad a tuberculostáticos de 1ª línea de las cepas de Mycobacterium tuberculosis aisladas en estos pacientes en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Miguel Servet entre los años 2000-2011.

Material y método:

Estudio descriptivo retrospectivo de los casos de TBC con aislamiento microbiológico detectados en nuestro hospital. Se revisaron las historias clínicas, analizándose las siguientes variables: edad, sexo, tipo de muestra, localización, baciloscopia, Virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH) y nacionalidad. Se estudió la sensibilidad a tuberculostáticos de 1ª línea: Isoniacida (H), rifampicina (R), estreptomycin (S) y etambutol (E) y la tipificación molecular por la técnica Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Las muestras se procesaron por el método de N-acetil-L-cisteína cultivándose en medio líquido BacT/ALERT®MP (bioMérieux) y BACTEC MGITM 960 (Becton Dickinson). La identificación se realizó por sondas Accuprobe® Gen-Probe (bioMérieux) y Genotype® Mycobacterium CM (HAIN LIFESCIENCE). La sensibilidad antibiótica se realizó por el método de las proporciones en medio de BacT/ALERT®MP (BioMérieux), en Lowenstein-Jensen MYCOBIO-T (BioMérieux) y por el sistema BACTEC MGITM 960 (Becton Dickinson).

Resultados:

Hubo un total de 60 pacientes menores de 15 años con aislamiento de Mycobacterium tuberculosis, de los cuales el 61% fueron del sexo masculino y el 39% del femenino. La distribución por edades fue la siguiente: 39 pacientes eran menores de 5 años (65%) y 21 (35%) tenían entre 6 y 15 años. La muestra más frecuente fue el aspirado gástrico en 38 pacientes (65%). La localización más frecuente fue la pulmonar en 40 pacientes (86%). La baciloscopia fue positiva en 14 pacientes (23,3%). El VIH fue negativo en 46 pacientes, positivo en 1 y desconocido en 13. En cuanto a la nacionalidad: 48 pacientes eran españoles (80%), 6 africanos (10%) y 6 de Europa del este (10%).

Detectamos 5 cepas con algún tipo de resistencia. (Ver tabla).

Pacientes (CLUSTER)	Sexo	Edad	Localización	Muestra	VIH	Baciloscopia	Resistencias	RFLP
1	M	< 5	Pulmonar	AG	Negativo	Negativa	H-S	ARA 91
2	M	< 5	Ocular	AG	Negativo	Negativa	H-R	ARA 21
3	M	< 5	Pulmonar	AG	Negativo	Negativa	H-S	ARA 91
4	M	< 5	Pulmonar	AG	Negativo	Positiva H		ARA 21
5	M	< 5	Pulmonar	AG	Negativo	Negativa	H	ARA 50

M: Masculino. AG: Aspirado gástrico. ARA: Número de Cluster de la Comunidad Autónoma de Aragón (CCAA)

Conclusiones:

En nuestro estudio predominan los niños varones menores de 5 años.

La localización más frecuente fue la pulmonar, con baciloscopia y VIH negativos.

La tasa de resistencias fue del 8,3%, siendo 1 cepa multirresistente (MDR), 2 polirresistentes y 2 monorresistentes.

Los 5 casos pertenecían a clusters de nuestra CCAA, presentando las mismas resistencias que los casos asociados, excepto en el caso de TBC multirresistente, que fue el único detectado.

Es importante conocer los casos de TBC en niños por ser un buen indicador de las tasas de tuberculosis y de transmisión continua.

En pacientes pediátricos la multirresistencia aparece por la exposición del niño a pacientes adultos enfermos de tuberculosis con cepas resistentes, por lo tanto la primera herramienta contra el desarrollo de TBC multirresistente en niños es asegurar el buen cumplimiento del tratamiento en adultos.

Palabras clave: Niños, Mycobacterium tuberculosis, Resistencias

POSTER SIN DISCUSIÓN

INCREMENTO DE LA RESISTENCIA PRIMARIA (RP) DE M. TUBERCULOSIS A FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS EN LOS ÚLTIMOS AÑOS EN NUESTRA ÁREA SANITARIA

Autor/es: Armando Alberte Castiñeiras, Manuel Gonzalez Sagrado, Marta Domínguez-Gil Gonzalez, Sara Yáñez Soria y Pilar Pérez Pascual.

Institución: Microbiología. Hospital Río Hortega. Valladolid

Introducción:

Mycobacterium tuberculosis continua siendo un patógeno aislado frecuentemente de muestras clínicas en nuestra área sanitaria.

Objetivos:

Evaluar la tendencia de la resistencia de las cepas de *M tuberculosis*, a los fármacos de primera línea, especialmente en el ultimo lustro, en una área sanitaria de 240.000 habitantes.

Material y método:

Se presentan los resultados de la RP a 1097 cepas de *M tuberculosis* procedentes de pacientes, todos ellos casos nuevos, VIH negativos, aislados entre 1981 y 2010, divididos en cinco periodos. Las pruebas de susceptibilidad fueron realizadas y/o confirmadas por el Centro Nacional ISCIII (Dra. M. Jiménez), usando el método de las proporciones. Cepa resistente era aquella que mostraba un crecimiento de colonias \geq al 1% comparada con el crecimiento control, a las concentraciones críticas de los siguientes fármacos de primera línea: estreptomina, 4 mg/l; isoniazida, 0,2 mg/l; rifampicina, 40 mg/l y etambutol, 2 mg/l.

Nº	Año	Isoniazida				Rifampicina		S*	E	Z	ETH	OFLO 1-4	LZ 0,5- 2	A 0,5- 2
		H 0,1	H 0,4	<i>katG</i>	<i>inhA</i>	R	<i>rpoB</i>							
1	1996	R	R	S315T1	N	R	WT8/MUT3	S	S	S	S	≤ 1	1	$\leq 0,5$
2	1997	R	R	N	N	R	WT7	R	R	S	S	≤ 1	1	$\leq 0,5$
3	1998	R	R	S315T1	N	R	WT7/H526Y	S	S	S	S	≤ 1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$
4	1998	R	S	N	N	S	N	S	S	S	S	≤ 1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$
5	1999	R	S	N	C15T	S	N	R	S	S	S	≤ 1	1	$\leq 0,5$
6	2000	R	R	D	N	S	N	S	S	S	S	4	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$
7	2000	R	R	S315T1	N	R	WT8	S	S	S	S	≤ 1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$
8	2000	R	S	N	C15T	S	N	S	S	S	S	≤ 1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$
9	2000	R	R	N	N	S	N	S	S	S	S	≤ 1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$
10	2002	R	R	N	N	S	N	S	S	S	S	≤ 1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$
11	2002	R	R	N	N	S	N	S	S	S	S	≤ 1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$
12	2003	R	R	S315T1	N	R	WT7	R	R	S	S	≤ 1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$
13	2004	R	R	S315T1	N	R	WT8	S	S	S	S	≤ 1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$
14	2005	R	R	N	N	S	N	R	S	S	S	≤ 1	1	$\leq 0,5$
15	2006	R	S	N	N	S	N	S	S	S	S	≤ 1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$
16	2006	R	R	S315T1	N	R	WT8	S	S	S	S	≤ 1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$
17	2006	R	R	S315T1	N	R	WT8	S	S	S	S	≤ 1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$
18	2006	R	R	S315T1	N	S	N	R	S	S	S	≤ 1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$

H: isoniazida; R: rifampicina; S*: estreptomina; E: etambutol; Z: pirazinamida; ETH: etionamida; OFLO: ofloxacino; LZ: linezolid; A: amikacina; R: resistente; S: sensible; D: no hibridación WT; WT7: codon 526-529; WT8: codon 530-533.

Resultados:

Los resultados de la RP a los largo de los periodos sucesivos, pueden observarse en la Tabla 1

Periodos (n° de cepas)	1981-90 (N=301)	1991-95 (N=338)	1996-2000 (N=185)	2001-2005 (N=170)	2006-2010 (N=103)
Resistencia	6,3	4,7	3,2	1,7	5,8
Primaria	(3,4-9,2)	(2,3-7,1)	(0,4-6,1)	(0,4-5,1)	(0,8-10,8)
Cepas resistentes a un fármaco	5,0 (2,4-7,6)	3,8 (1,6-6,0)	2,7 (0,9-6,2)	1,2 (0,1-4,2)	4,8 (1,6-10,9)
Cepas resistentes a varios fármacos	1,3 (0,4-3,4)	0,9 (0,2-2,6)	0,5 (0,01-3,0)	0,5 (0,01-3,2)	0,97 (0,02-5,3)
Cepas multi- resistentes	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)
Resistencia a estreptomicina	3,0 (0,9-5,1)	2,3 (0,6-4,1)	1,0 (0,1-3,8)	1,2 (0,1-4,2)	1,9 (0,24-6,8)
Resistencia a isoniazida	4,3 (1,9-6,8)	1,8 (0,2-3,3)	2,1 (0,6-5,4)	1,2 (0,1-4,2)	4,8 (1,6-10,9)
Resistencia a rifampicina	0,3 (0,01-1,84)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)
Resistencia a etambutol	0,0 (0,0-0,0)	1,5 (0,5-3,4)	0,5 (0,01-3,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)
Resistencia a pirazinamida					3,9 (1,1-9,6)

Tabla 1. Resistencia primaria de *M. tuberculosis* a uno o mas medicamentos aislados de 1097 pacientes VIH (-) o desconocido, diagnosticados por primera vez, en % (IC 95%)

Todas las muestras con algún tipo de resistencia eran de procedencia pulmonar y, en un caso (paciente inmigrante) con resistencia a dos fármacos.

Conclusiones:

A lo largo de los cuatro primeros periodos, la RP mostró una tendencia descendente, con niveles bajos de resistencia a isoniazida que propiciaban la pauta terapéutica con tres fármacos. Sin embargo, el último lustro mostró un cambio de la misma sin observar factores implicados, como tratamientos previos, infección por el VIH, o inmigración, debiendo plantearse nuevas actitudes terapéuticas. No se observaron cepas multirresistentes a los largo de los 30 años.

Palabras clave: resistencia primaria, resistencia antimicrobiana, antibióticos y M tuberculosis

ESTUDIO GENOTÍPICO DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS RESISTENTE A ISONIAZIDA EN GALICIA.

Autor/es: ML. Pérez del Molino(1), D. Navarro(1), P. Alonso(2), L. Barbeyto(3), A. Pascual(4), R. Villanueva(5) y Grupo Gallego de Micobacteriología.

Institución: Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela(1), Complejo Hospitalario Lucus Augusta(2). Complejo Hospitalario de Orense-Provincial(3). Complejo Hospitalario de Pontevedra(4). Complejo Hospitalario Universitario de Coruña(5).

Introducción:

Desde la puesta en marcha en 1998 del Programa Gallego de Prevención y Control de la tuberculosis, uno de los objetivos prioritarios ha sido el control la tuberculosis resistente a fármacos. La implantación y difusión de sistemas rápidos de detección de las mutaciones de resistencia más frecuentes en *M. tuberculosis* a isoniazida (H) y rifampicina (R), nos ha hecho plantearnos el conocimiento de la distribución de éstas en nuestro medio.

Material y método:

Se realizó antibiograma de primera línea, mediante el sistema BACTEC MIGIT 960, a todas las cepas aisladas en Galicia desde el 2008 a 2011. En las cepas con resistencia al menos a isoniazida (H) se realizó estudio genotípico por el sistema Genotype MTBDRplus (Hain-Lifescience).

Resultados:

En los cuatro años objeto de estudio, se detectaron 68 cepas resistentes a H, de las que 7 (10,3%) eran también resistentes a rifampicina (MR).

En 48 cepas (70,6%) se detectaron modificaciones genéticas; correspondiendo un 36,8% a mutaciones en el gen *katG* (S315T1) y un 33,8% a mutaciones en el promotor *inhA* (22 con mutación C15T y una T8C). De las cepas que no presentan no presentaron ninguna modificación en las regiones genéticas estudiadas, el 80% son aislados de los años 2010 y 2011.

En todas las cepas de *M tuberculosis* MR se encontraron mutaciones en los genes de resistencia para H (4 en *katG* y 3 en *inhA*) y rifampicina.

Conclusiones:

La técnica genotípica rápida utilizada es de gran utilidad para la detección de las cepas resistentes a rifampicina e isoniazida. Consideramos que en nuestro medio, los métodos fenotípicos siguen siendo imprescindibles.

Palabras clave: Resistencia, Molecular, Galicia

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE M.TUBERCULOSIS RESISTENTES A ISONIAZIDA PROCEDENTES DE PACIENTES EN TRATAMIENTO DIRECTAMENTE OBSERVADO.

Autor/es: B. Mejuto(1), V. Tuñez (2), R. Garcia-Ramos(2), ML. Pérez del Molino(2).

Institución: (1)Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia.(2)Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.

Introducción:

El tratamiento directamente observado (TDO) de tuberculosis (TB) se implanta en pacientes con riesgo de incumplimiento o con factores de mala respuesta como resistencia a algún medicamento antituberculoso. El objetivo de este estudio es caracterizar las cepas de M.tuberculosis resistentes a isoniazida (H) procedentes de pacientes a TDO en nuestro área sanitaria.

Material y método:

Se seleccionaron todos los pacientes a TDO desde 1996 a 2006 con aislamiento de cepas resistentes a isoniazida (H) a los que les realizó antibiograma mediante el sistema BACTEC MIGIT 960, estudio genotípico (Genotype MTBDRplus. Hain-Lifescience) y tipificación molecular mediante la técnica de rep-PCR automatizada (DiversiLab System®).

Resultados:

De 2455 pacientes diagnosticados de TB se instauraron 255 TDO (10,4%) en 250 pacientes. En 197 pacientes (77.3%) hubo confirmación microbiológica. Se encontró un 8.2 % de cepas resistentes al menos a H y un 3.9% TBMR.

En 7 cepas (38,9%), 1 TBMR, no se encontraron modificaciones en las regiones genéticas estudiadas para la H. En las 11 cepas (61,1%) en las que se detectaron modificaciones, 2 (11,1%) presentaron mutación en C15T del promotor inhA, 8 (44,4%) mostraron mutación S315T1 en katG y 1(5,6%) tenía otro tipo de mutación en katG. En el estudio de tipificación molecular se encontraron 13 patrones distintos (72,2%); 6 cepas (33,3%) presentaron un patrón similar.

Conclusiones:

La sensibilidad del método genotípico en la detección de la resistencia a la isoniazida en cepas no resistentes a rifampicina es moderada. Las cepas estudiadas con un patrón similar, presentan un escaso número de bandas, lo que demuestra un bajo poder discriminatorio de la técnica.

Palabras clave: TDO, Resistencia, Molecular

RESULTADOS PRELIMINARES DEL ANÁLISIS GENÓMICO DE UNA CEPA EXTREMÁDAMENTE RESISTENTE DE MYCOBACTERIUM BOVIS

Autor/es: Sara Sagasti Escalona, Jesús Ángel Gonzalo Asensio, M^a Antonia Lezcano Carrera, Sofia Samper Blasco.

Institución: IIS Aragón, Hospital Miguel Servet, Zaragoza, España.

Introducción/objetivos:

MBZ es un aislado de *Mycobacterium bovis* que pertenece al *M. tuberculosis* complex (MTBC) y causó un brote letal en los años 90 en España (Samper y Martín, 2007). Es extremadamente resistente (XDR) con resistencia a isoniácida, rifampicina, piracinamida, etambutol, estreptomina, amikacina/kanamicina, capreomicina, quinolonas, etionamida y PAS. A pesar de que los bacilos humano y bovino pueden diferenciarse según el huésped, la virulencia y la fisiología, las bases genéticas de estas diferencias no se conocen todavía. El objetivo es encontrar las diferencias moleculares de la cepa MBZ frente a los genomas de otros aislados miembros del MTBC ya secuenciados.

Material y método:

La secuenciación a gran escala del genoma de la cepa MBZ y el análisis de sus diferencias respecto a la de referencia AF2122/97 se realizó con la plataforma SOLiD (Applied BiosystemsTM) por Sistemas Genómicos, Valencia. Para el análisis genómico comparativo se utilizó el servidor BLAST. El resto de cepas publicadas de *mycobacterium*: *M. tuberculosis* H37Ra, *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* CDC1551, *M. tuberculosis* KZN, *M. tuberculosis* F11, *M. bovis* BCG Pasteur y *M. bovis* BCG Tokio; se utilizaron para comparar los SNPs, inserciones y deleciones detectados. Además también se realizó la comparación con el linaje recientemente publicado Eu2 (Rodríguez-Campos y col., 2011).

Resultados:

La comparación entre los genomas de MBZ y AF2122/97 identificó 741 SNPs de los cuales 633 (85%) se localizaron en regiones codificantes. 401 fueron no sinónimos y 158 de estos fueron específicos de MBZ, es decir, que no se encontraron en el resto de cepas comparadas. Según la distribución funcional de los ORFs publicada en H37Rv podemos afirmar que las categorías funcionales donde presentan mayor número de SNPs no sinónimos específicos son PE/PPE y secuencias de inserción y fagos, mientras que las categorías funcionales donde presentan menos SNPs no sinónimos específicos son virulencia, detoxificación y adaptación. De los 54 SNPs intergénicos específicos detectados solo cuatro se localizaron en posibles secuencias promotoras. También se detectaron 68 indels de los cuales 52 (77%) se encontraron en regiones codificantes y 31 de ellos fueron específicos. Por otro lado se detectaron 7 inserciones de las cuales una resultó específica y codifica para un transportador ABC transmembrana de unión a ATP. También se detectó una deleción específica que entre otros genes abarca el gen *thyA* implicado en la resistencia a PAS. Se vio que esta cepa MBZ pertenece al nuevo linaje Eu2.

Conclusiones:

Los resultados preliminares obtenidos de esta cepa MBZ podrían ser la clave para estudiar los cambios específicos estructurales que podrían servir como explicación de su diseminación y extensa adquisición de resistencias

- Samper S y Martín C. *Emerg Infect Dis.* 13:647-648. 2007

- Rodríguez-Campos S, Schürch AC, Dale J, Lohan AJ, Cunha MV, Botelho A, Cruz KD, Boschiroli ML, Boniotti MB, Pacciarini M, Garcia-Pelayo MC, Romero B, de Juan L, Domínguez L, Gordon SV, van Soolingen D, Loftus B, Berg S, Hewinson RG, Aranaz A, Smith NH. *Infect Genet Evol.* 2011 Sep 14

Palabras clave: análisis genómico, bovis, resistencias

LINFADENITIS CERVICAL POR MICOBACTERIAS EN LA EDAD PEDIÁTRICA

Autor/es: Pedro García-Martos, Lidia García-Agudo, Inmaculada Guerrero-Lozano, Enrique González-Moya, María José Rodríguez Jiménez, Rodríguez-Iglesias Manuel.

Intitución: UGC de Microbiología, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz.

Introducción:

La infección por micobacterias representa el 10-20% de las linfadenitis en niños de edad preescolar y parece estar aumentando en los últimos años. La forma clínica es la linfadenitis cervical. El complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* es responsable de la mayoría de los casos, y la especie *M. avium* se ha referido en el 70-80% de los mismos, al contrario de los adultos, donde es más frecuente *M. tuberculosis*. La infección es más común en los menores de 5 años de edad. Presentamos nuestra casuística de los últimos 15 años.

Material y método:

Se analizaron retrospectivamente los pacientes con adenopatías por micobacterias diagnosticados en el período 1997-2011 en la Unidad de Micobacterias del Hospital Universitario Puerta del Mar de Cádiz. Las muestras para estudio microbiológico e histopatológico se obtuvieron mediante exéresis de la masa adenopática, drenaje y biopsia. En los pacientes pediátricos se determinaron las siguientes variables: edad, sexo, factores de riesgo, características de la adenopatía, diagnóstico (reacción de Mantoux, tinción, cultivo), estudio anatomopatológico, agente etiológico, tratamiento.

Resultados:

Se diagnosticaron microbiológicamente 25 casos de linfadenopatías por micobacterias, de los cuales 18 correspondían a adultos y 7 a niños. En estos últimos, las infecciones se concentraron en los años 2002, 2006 y 2010, con un predominio del sexo femenino (6/7) y una edad comprendida entre los 1 y 5 años. Todos los niños eran inmunocompetentes. La mayoría de las adenopatías eran únicas (6/7). La afectación cervical unilateral fue la forma más común (6/7), así como la infección de los ganglios submaxilares anteriores y preauriculares. La reacción de Mantoux y la tinción de Ziehl-Neelsen/auramina fueron positivas en 2 niños. El cultivo de las muestras obtenidas por punción-aspiración con aguja fina (PAAF) fue positivo en medio líquido de Midebrook en todos los casos, y en medio sólido de Löwenstein-Jensen en 6 casos; la biopsia ofreció un peor rendimiento (positiva en 3 casos). El estudio anatomopatológico demostró hallazgos compatibles con infección por micobacterias en todos los pacientes. La especie *M. tuberculosis* se aisló en 3 pacientes, y *M. avium* en otros 3. El tratamiento de los pacientes se realizó con antibióticos en politerapia, drenaje y exéresis quirúrgica.

Conclusiones:

En países desarrollados existe un incremento de las linfadenopatías por micobacterias en niños menores de 5 años. Los casos descritos se diagnosticaron a partir de 2002 y correspondían a niños de esta edad, con predominio del sexo femenino. En los niños hasta un 92% de los casos de linfadenitis cervicales son atribuidos a micobacterias atípicas. El complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* es predominante, y la especie *M. avium* se ha referido en el 70-80% de las infecciones. En nuestra serie las micobacterias atípicas solamente se aislaron en 3 casos (42,8%), todas *M. avium*, y en el resto se aisló *M. tuberculosis*.

En ocasiones la infección se resuelve espontáneamente pero lo habitual es que evolucione a la cronicidad. La exéresis quirúrgica fue el tratamiento más eficaz pues consiguió la curación definitiva en el 100% de los casos.

Palabras clave: Tuberculosis, linfadenitis, pediatría, adenopatías, absceso.

NOCARDIOSIS CUTÁNEA PRIMARIA SUPERFICIAL

Autor/es: Fátima Galán, Lidia García-Agudo, Inmaculada Guerrero-Lozano, Pilar Marín, Pedro García-Martos, Manuel Rodríguez-Iglesias.

Intitución: UGC de Microbiología, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz.

Introducción:

La nocardiosis cutánea es una enfermedad inflamatoria supurativa y granulomatosa infrecuente en inmunocompetentes, causada por bacterias del género *Nocardia*. El mecanismo de transmisión es por inoculación directa en una zona piel traumatizada o por inhalación. Presentamos el caso de una paciente sana de 31 años que manifestó una ulceración cutánea en la pierna.

Caso clínico:

La mujer carecía de antecedentes patológicos de interés. La ulceración se localizaba la pierna derecha, apareció tras depilación a la cera 20 días antes, y presentaba 7 meses de evolución. La lesión comenzó como un nódulo eritematoso con vértice blanquecino, que pasó a drenar contenido purulento y permaneció en forma de úlcera crónica. Se había tratado con mupirocina tópica y amoxicilina-clavulánico oral, sin respuesta. Se tomó muestras del exudado purulento para cultivo en medios generales, en medio de Löwenstein-Jensen y en medios micológicos. En medios habituales creció *Staphylococcus coagulasa* negativo; en medios micológicos no se detectó crecimiento; en Löwenstein-Jensen, a los 4-5 días de incubación, se desarrollaron unas colonias pigmentadas que, tras tinción de Gram, mostraron estructuras filamentosas ramificadas grampositivas que pasaron a ser cocobacilares a las 48 horas. En el subcultivo en agar sangre se apreciaron colonias blancas, secas, con aspecto molar, incrustadas en el agar. En la tinción de Kinyoun presentaban ácido-alcohol resistencia. Se identificó *Nocardia farcinica* mediante el patrón de sensibilidad a gentamicina, tobramicina, amikacina y eritromicina, (resistente-resistente-sensible-sensible), ureasa, esculina, glucosa, ramnosa y eritritol positivas, crecimiento a 45°C, y citrato negativo. La histología evidenció ulceración inespecífica con microabsceso, sin detección de microorganismos. Se instauró tratamiento con trimetoprim-sulfametoxazol (800/160 mg/12 horas/3 meses) consiguiendo la curación de la ulcera al final del tratamiento.

Conclusiones:

La nocardiosis es una enfermedad a considerar ante una ulceración cutánea crónica, debido el aumento de su prevalencia en paciente inmunodeprimidos, y también en pacientes sanos, como en nuestro caso. *Nocardia* es una bacteria ubicua en el medio ambiente y puede causar infección a través de traumatismos en la piel. *Nocardia asteroides* es la especie más frecuente, miembro de un complejo que incluye además a *N. nova*, *N. farcinica* y *N. transvalensis*. El hallazgo de *N. farcinica* en infecciones humanas es ocasional. La afectación cutánea puede presentarse como infección superficial de la piel, forma linfocutánea (esporotricoides), enfermedad sistémica con afectación cutánea, y micetoma. La infección superficial se debe sospechar en pacientes con lesiones nodulares o ulcerosas de evolución tórpida, secundarias a un traumatismo y que no responden a los antibióticos habituales. El diagnóstico se realiza fundamentalmente por cultivo en agar sangre, medio de Löwenstein-Jensen o agar de Sabouraud, considerando que se trata de microorganismos de crecimiento relativamente lento. El tratamiento de elección es el trimetoprim-sulfametoxazol, pero puede ser necesario el drenaje quirúrgico. Antibióticos alternativos amikacina, minociclina, imipenem, cefalosporinas de tercera generación y linezolid.

Palabras clave: Nocardiosis, Löwenstein-Jensen, *Nocardia farcinica*, Ulceración cutánea

EFFECTO ANTITUMORAL DE MYCOBACTERIUM BOVIS BCG NO VIABLE Y SU ACTIVIDAD SINÉRGICA CON MITOMICINA C

Autor/es: Silvia Secanella Fandos, Marina Luquin Fernández, Esther Julián Gómez.

Institución: Depto. Genética y Microbiología, Universidad Autónoma de Barcelona.

Introducción:

Mycobacterium bovis BCG es el tratamiento de elección para el cáncer de vejiga superficial no invasivo. Tras la resección transuretral se administra una dosis del quimioterápico Mitomicina C (MMC), y posteriormente se instila intravesicalmente BCG vivo, el cual previene la recidiva y la progresión tumoral. Aunque el tratamiento con BCG es muy efectivo, produce efectos secundarios, entre ellos infecciones diseminadas por BCG. El uso de bacilos no viables ha sido muy discutido. Mientras algunos autores defienden que el efecto de BCG sólo se consigue instilando la micobacteria viva, extractos lipídicos de BCG se están evaluando actualmente en enfermos con el fin de sustituir el tratamiento actual. En este trabajo se pretende determinar la capacidad antitumoral directa de BCG muerto por calor o irradiación y, a su vez, determinar si mantiene un efecto sinérgico con MMC.

Material y método:

Líneas celulares humanas de cáncer de vejiga (T24, J82 y RT4) se infectaron con BCG vivo o muerto por calor e irradiación. Se analizó la inhibición de la proliferación celular y la inducción de la producción de IL-6 e IL-8 mediante ELISA. Se estudiaron los mismos parámetros tratando los cultivos con BCG junto con MMC.

Resultados. BCG muerto por calor o irradiación inhibe la proliferación celular de las tres líneas tumorales igual que BCG vivo. Esta inhibición se ve incrementada cuándo es administrado junto con MMC. El uso de BCG muerto induce una menor producción de citocinas en las tres líneas, únicamente BCG irradiado induce una producción similar a BCG vivo en la línea T24. En la línea J82, BCG, tanto vivo como muerto, junto con MMC induce niveles mayores de citocinas que BCG solo, mientras que en las líneas T24 y RT4, BCG solo, tanto vivo como muerto, induce mayores niveles de citocinas.

Conclusión:

La muerte de la bacteria no disminuye su capacidad antitumoral directa, pero sí la de inducir la producción de citocinas importantes para la respuesta antitumoral. El efecto antitumoral de BCG no viable se ve incrementado cuando se utiliza junto con MMC. En cambio, en la inducción de la producción de citocinas, esta sinergia sólo se observa en las células J82.

Palabras clave: BCG, antitumoral, cáncer de vejiga

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL INDIRECTA DE MYCOBACTERIUM BOVIS BCG VIVO Y MUERTO POR IRRADIACIÓN.

Autor/es: Silvia Secanella Fandos, Hasier Eraña Lasagabaster, Marina Luquin Fernández, Esther Julián Gómez.

Institución: Depto. Genética y Microbiología, Universidad Autónoma de Barcelona.

Introducción:

El tratamiento del cáncer de vejiga superficial con *Mycobacterium bovis* BCG vivo es el más eficaz y aceptado actualmente. BCG ejerce una actividad antitumoral directa y, además, es capaz de estimular una respuesta inmune mediada por macrófagos y células dendríticas, incluyendo la producción de citocinas proinflamatorias (actividad antitumoral indirecta). En nuestro laboratorio hemos demostrado que la capacidad antitumoral directa de BCG se mantiene aún cuando el bacilo está muerto por irradiación. Dada la ventaja que supone la utilización del bacilo no viable, este trabajo tiene como objetivo determinar si BCG muerto también ejerce una actividad antitumoral indirecta.

Material y método:

Se infectaron macrófagos murinos (J774) con BCG y *Mycobacterium gastri* (control negativo), vivas y muertas por irradiación, y se analizó el nivel de expresión de marcadores de activación de dichos macrófagos. Se determinó la capacidad citotóxica de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) estimuladas con las micobacterias, vivas e irradiadas, frente a las células tumorales de cáncer de vejiga T24. En ambos casos se determinó la concentración de citocinas inducidas por las micobacterias.

Resultados:

BCG muerto es capaz de inducir, en los macrófagos J774, la expresión de CD86, mientras que la expresión de CD40 y CD80 sólo incrementa cuando BCG está vivo. La inducción de las citocinas en macrófagos estimulados con BCG muerto es significativa, aunque menor que con el bacilo viable. Las PBMC estimuladas con BCG irradiado mantienen la capacidad citotóxica frente a las células tumorales, pero sólo BCG vivo es capaz de inducir la secreción de factores solubles con capacidad citotóxica por parte de las PBMC. BCG vivo induce niveles mayores de IL-10, IL-12 y TNF- α , pero menores de IFN- γ que el bacilo irradiado.

Conclusión:

BCG muerto por irradiación induce una menor expresión de marcadores de activación y una menor producción de citocinas en macrófagos. Además se requiere el bacilo vivo para una completa actividad citotóxica frente a las células tumorales.

Palabras clave: BCG, antitumoral, cáncer de vejiga

LAS CEPAS RUGOSAS DE MYCOBACTERIUM ABSCESSUS FORMAN CUERDAS MICROSCÓPICAS SIMILARES A LAS FORMADAS POR LAS MICOBACTERIAS DEL COMPLEJO TUBERCULOSIS

Autor/es: Cecilia Toledo Brambilla, Alejandro Sánchez-Chardi, Esther Julián Gómez y Marina Luquin Fernández.

Institución: Universidad Autónoma de Barcelona.

Introducción:

Mycobacterium abscessus es una micobacteria de crecimiento rápido responsable de infección diseminada en pacientes inmunodeprimidos, infección de tejidos blandos y enfermedades pulmonares en pacientes con enfermedades de base como la fibrosis quística. Actualmente se considera un patógeno oportunista emergente, siendo la tercera micobacteria no tuberculosa más frecuentemente aislada en Estados Unidos. La mayoría de aislados clínicos de *M. abscessus* presentan una morfología colonial lisa, pero, recientemente, se han aislado cepas rugosas extremadamente virulentas a partir de pacientes con fibrosis quística y de pacientes con otras patologías. La morfología colonial rugosa y la virulencia se asocian en el complejo tuberculosis con la formación de cuerdas microscópicas. En la cepa rugosa de *M. abscessus* 390R, aislada de un granuloma del íleon de un paciente con enfermedad de Crohn, se describió la presencia de cuerdas microscópicas por microscopía óptica. Esta técnica no tiene suficiente resolución como para distinguir entre las cuerdas verdaderas o los acúmulos que se pueden formar por la tendencia natural de las micobacterias a agregarse.

Objetivo:

Investigar si la cepa 390R formaba cuerdas verdaderas empleando la microscopía electrónica de barrido.

Material y método:

Se utilizó la cepa lisa *M. abscessus* DSMZ44196T, la cepa rugosa 390R más las variantes de esta última: 390S, (lisa) y 390V (rugosa). Como control positivo se utilizó una cepa del complejo tuberculosis *Mycobacterium bovis* (BCG Japan) ATCC51384 T. Las micobacterias fueron cultivadas en TSB líquido (Tryptic Soy Broth) a 30°C y a 37°C (en el caso de BCG). A las dos (para *M. abscessus*) o cuatro (para BCG) semanas se procesaron los cultivos para ser observados por microscopía electrónica de barrido siguiendo un procesado convencional.

Resultados:

Las cepas lisas 390S y DSMZ44196T no fueron capaces de crecer en medio líquido formando cuerdas, sin embargo las dos cepas rugosas 390R y 390V formaron cuerdas verdaderas similares a las formadas por la cepa control BCG Japan.

Conclusión:

Solamente las variantes rugosas de *M. abscessus* son capaces de formar cuerdas microscópicas verdaderas. La microscopía electrónica de barrido es una excelente técnica para establecer claramente y sin ninguna ambigüedad, si una micobacteria forma cuerdas o no.

Palabras clave: cuerdas, microscopía electrónica de barrido, morfología colonial

CASOS DE TUBERCULOSIS EN POBLACIÓN AUTÓCTONA E INMIGRANTE EN NAVARRA, 2000-2011

Autor/es: Navascués Ana(1), García-Cenoz Manuel(2), Beristain Xabier(1), Torroba Luis(1), Ezpeleta Carmen(1) y Gil-Setas Alberto(1).

Institución: (1)Servicio de Microbiología Clínica del Complejo Hospitalario de Navarra. (2)Instituto de Salud Pública de Navarra.

Objetivo:

La mejora del nivel socioeconómico en nuestro medio ha contribuido a mejorar el control de la tuberculosis. Sin embargo han aparecido nuevos factores que suponen un reto en el control de la enfermedad como la epidemia de VIH, la aparición de micobacterias resistentes y la movilidad de la población. El objetivo de este estudio es revisar los casos de tuberculosis diagnosticados en Navarra en el periodo 2000-2011 y analizar la distribución de casos según el país de origen.

Método:

Los casos de tuberculosis se han obtenido del registro de enfermedades de declaración obligatoria de Navarra, confirmados para *Mycobacterium tuberculosis complex* por el laboratorio de Microbiología de referencia de la Red Sanitaria de Navarra. Se han comparado los casos de tuberculosis en población autóctona e inmigrante en función de la edad y sexo. La Comunidad Foral de Navarra tiene una población de 634.000 habitantes, de los que aproximadamente un 12% son inmigrantes. En algunas zonas sobre todo del sur de Navarra el porcentaje es mayor llegando a cifras del 18%.

Resultados:

En los 12 años de seguimiento se han confirmado un total de 968 casos de tuberculosis: 74, 77, 84, 68, 90, 80, 96, 84, 112, 87, 49 y 67. El 34,2% ocurrieron en la población inmigrante. El 56,5% de los casos ocurrieron en hombres; no hubo diferencias en cuanto al sexo entre la población autóctona (58,1%) e inmigrante (54,6%). La media de edad en el grupo de población autóctona fue de 49,9 años y de 31,1 en el de población inmigrante ($p < 0.001$). Los datos de porcentaje anual de casos entre población inmigrante y autóctona, incidencia de tuberculosis en Navarra y porcentaje de población inmigrante en Navarra se presentan en la siguiente gráfica.

Conclusiones:

La incidencia de tuberculosis en Navarra ha disminuido durante el periodo de estudio pasando de 18,95 casos/100.000 en el año 2000 a 12,15/100.000 en el año 2011.

El porcentaje de casos de tuberculosis en población inmigrante ha aumentado en 10 años desde el 16% del año 2000 al 50% de los últimos años siendo diagnosticados la mitad de los casos de tuberculosis en un 12% de la población.

En promedio, la población inmigrante presenta tuberculosis a una edad significativamente menor que la población autóctona.

Palabras clave: Tuberculosis, inmigración, edad

TUBERCULOSIS INFANTIL EN EL ÁREA SANITARIA DE GUADALAJARA

Autor/es: M^a Elena Rodríguez Zurita, Nora Mariela Martínez Ramírez, Cristina Fernández González, Sonia Solís del Baño, Julia Bisquert Santiago

Institución: Hospital Universitario de Guadalajara.

Introducción y objetivos:

La tuberculosis infantil representa un problema sanitario debido a su incidencia, la aparición de cepas resistentes y su difícil diagnóstico. Además faltan datos respecto al impacto de la inmigración, las resistencias y la aportación de los nuevos métodos diagnósticos. El objetivo de este estudio es analizar los casos declarados de tuberculosis infantil en Guadalajara y los métodos microbiológicos empleados.

Material y método:

Se analizaron retrospectivamente las características clínicas, microbiológicas y demográficas de niños diagnosticados de tuberculosis en el área sanitaria de Guadalajara en los años 2008 -2011.

Resultados:

Se declararon 20 casos de tuberculosis en niños de 0 a 16 años (tasa media de 12,2 casos/100.000 habitantes/año), de las cuales 12 eran pulmonares, 4 linfáticas, 2 del SNC, 1 pleural y 1 diseminada. Quince niños (75%) eran de origen extranjero (tasa en 2011 de 89 casos/100,000 habitantes extranjeros/año) y sólo 5 (25%) eran nacionales. Los países de origen fueron Rumanía (9), Norte de África (5) y Perú (1).

La confirmación microbiológica, bien por cultivo de *Mycobacterium tuberculosis complex* (medios Lowenstein-Jensen o MGIT) o por técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (GenoType Micobacteria Direct, Hain o Xpert MTB/RIF, Cepheid), se obtuvo en el 45% de los casos (9), cifra que asciende al 66% en los casos de tuberculosis pulmonar (8/12). Los cultivos de jugos gástricos seriados mostraron una sensibilidad del 42% en los casos de tuberculosis pulmonar. La PCR fue positiva en 2 pacientes en los que los cultivos eran negativos, lo que supone un 10% de los casos. Todos los aislados de *M.tuberculosis complex* fueron sensibles a estreptomycin, isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida.

PCR NR: PCR no realizada

TIPO MUESTRA	CULTIVO+			CULTIVO-		
	PCR+	PCR-	PCR NR	PCR+	PCR-	PCR NR
J.GÁSTRICO	0	1	10	2	3	25
ESPUTO/BAL/BAS	0	1	5	0	0	2
ADENOPATÍA	0	0	0	0	1	0
LCR	0	0	0	0	2	2
SANGRE	0	0	0	0	0	1
ORINA	0	0	1	0	0	2

Conclusiones:

La tuberculosis infantil en nuestro área sanitaria es un problema sanitario en niños de origen extranjero. Sin embargo la resistencia de momento es baja en este grupo.

Para llegar al diagnóstico microbiológico en casos de tuberculosis pulmonar recomendamos el cultivo de jugos gástricos seriados junto con la realización de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.

Palabras clave: Tuberculosis Infantil Guadalajara

ESTUDIO DE CARGAS DE TRABAJO DE MICOBACTERIAS EN EL HOSPITAL DE CEUTA ESTUDIO 2011

Autor/es: José López Barba, Salomé Hijano Villegas, María Isabel José Acedo, Sol Martínez Llamas; Yolanda Rodríguez Mirón, María José Jiménez Gómez, Eva Morales de la Vega, Francisca León Rivera, Jacobo Díaz Portillo, Tomás Orgaz Morales.

Institución: Laboratorio de Microbiología. Hospital Universitario de Ceuta.

Introducción:

En el laboratorio de Micobacterias (LM) del Hospital Universitario de Ceuta se procesan muestras biológicas de pacientes residentes en la Ciudad Autónoma (CA) de Ceuta, no obstante, nuestra cercanía a otros países del norte de África, y nuestra situación como zona de tránsito entre Europa y África provoca que al LM lleguen muestras de pacientes sin tarjeta sanitaria (TS) del SNS y de pacientes con TS pero de otras Comunidades Autónomas (CCAA).

Objetivo:

Analizar la carga de trabajo (CDT) y rentabilidad de los estudios del LM en 2011, entendiendo como CDT el volumen de determinaciones realizadas particularizando en el origen de los pacientes estudiados según su afiliación sanitaria.

Material y método:

Todos los estudios de micobacterias abarcaron baciloscopia y cultivo en medio líquido MGIT (BD) en sistema BACTEC™ MGIT™ 960. Se ha confeccionado una tabla de datos extraída del SIL de laboratorios. Para el estudio estadístico se ha utilizado el sistema Statgraphics Centurion® XVI.I.

Resultados:

Se han recibido en el periodo referido un total de 874 solicitudes de estudios de micobacterias realizadas a 370 pacientes distintos. Los resultados detallados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1	PACIENTES		PRUEBAS		Nº pacientes con <i>M. Tuberculosis (TBC)</i>		Nº pacientes con <i>M. Atípica</i>	
	nº	%	nº	% (CDT)	nº	%	nº	%
ORIGEN								
Con TS de CA								
Ceuta	243	65,68%	1161	69,77%	25	58,14%	3	75,00%
Con TS otras CCAA	73	19,73%	286	17,19%	7	16,28%	0	0,00%
Centro Penitenciario	10	2,70%	40	2,40%	1	2,33%	0	0,00%
Sin TS								
Extracomunitarios	44	11,89%	177	10,64%	10	23,26%	1	25,00%
Totales	370	100%	1664	100%	43	100%	4	100%

Conclusiones:

Existe una CDT muy importante en el LM de un 27.83% de pacientes extracomunitarios o con TS de otras CCAA. Los estudios que presentan la mayor rentabilidad diagnóstica son los realizados en pacientes sin TS con 1 caso detectado de TBC por cada 4.4 estudios realizados, frente a 1 caso por cada 9.5 estudios en los pacientes con TS de la CA de Ceuta. La incidencia de casos detectados microbiológicamente en Ceuta se ve sesgada por pacientes que no son de esta Ciudad, siendo un 39.54% de las cepas aisladas en 2011.

Palabras clave: Carga de trabajo, micobacterias, sobrecarga

ATENCIÓN FARMACÉUTICA EN PACIENTES CON MYCOBACTERIUM LEPRAE: EXPERIENCIA EN COSTA RICA.

Autor/es: Esther Vaquero Álvarez y Maricruz Mora Vargas

Institución: Universidad Córdoba y Hospital México (Caja Costarricense del Seguro Social)

Introducción:

Desde 2006 el Hospital México de San José de Costa Rica asumió el Programa de Atención Farmacéutica (PAF), con el fin de educar y dar seguimiento a los enfermos de lepra para alcanzar el éxito terapéutico.

Objetivos:

Describir el abordaje del paciente con enfermedad de Hansen, desde la aplicación de la Atención Farmacéutica. Caracterizar el grado de cumplimiento de la terapia medicamentosa de los pacientes con lepra que han ingresado en el PAF.

Material y método:

A partir de los registros de pacientes activos incluidos en PAF, y de la base de datos del sistema integrado de farmacias (SIFA-programa informático utilizado en la Caja Costarricense de Seguro Social-), se extraen perfiles terapéuticos de los pacientes, historial de fechas de retirada de medicamentos, etc.

El farmacéutico encargado del Programa de Atención Farmacéutica explica al paciente recién diagnosticado, que trae la prescripción médica, el seguimiento y supervisión que se dará durante los 24 meses siguientes. Se trata de un sistema de citas programadas, donde se administra una dosis de carga mensual supervisada y se dispensa el tratamiento restante para 28 días. El proceso consiste en evaluar mensualmente: presencia o ausencia de efectos secundarios y/o intolerancia, cumplimiento de las dosis diarias de medicamentos,... Tras la administración del antimicrobiano, se da una explicación relacionada con generalidades sobre la enfermedad, adherencia, efectos secundarios, trámites administrativos, vida saludable y de los fármacos.

Para medir el cumplimiento terapéutico se considera la fecha programada al paciente para la toma supervisada versus la fecha en que el paciente se presenta a tomar el tratamiento y la dispensación de los días restantes. Si la fecha es exacta, se le adjudica un punto, de lo contrario no se le asigna puntaje. El grado de cumplimiento respecto al total de citas pactadas se expone en forma de proporción.

Resultados:

Entre 2006 y 2011 se han atendido 30 pacientes de los cuales 10 han sido dados de alta (33,33%), 13 (43,33%) se encuentran en tratamiento activo, 5 (16,67%) han abandonado terapia y seguimiento; y 2 (6,67%) fallecieron durante los 24 meses de tratamiento, por causas ajenas a la enfermedad o medicamento.

De los pacientes activos, el 76,92% han cumplido 18 meses o más consecutivos de tratamiento y el 23,08% restante, están dentro de su primer año de tratamiento. Entre los pacientes dados de alta y los activos, (23 pacientes: 76,67%), se ha alcanzado un cumplimiento terapéutico del 95%, comparando la fecha programada de toma del medicamento versus la fecha en que se presentó el paciente. El 5% restante se asignó a los que se presentaron hasta 2 días de retraso de la cita pactada.

Conclusiones:

La intervención del farmacéutico en este Programa ha contribuido al cumplimiento terapéutico en un 95%. Los pacientes que abandonaron representan un 16% por causa voluntaria y un 6.7% por fallecimiento.

El proceso educativo al que se somete tanto al paciente como a la red de apoyo, favorece el cumplimiento, la adherencia y, por consiguiente, la curación de la enfermedad.

Palabras clave: Cumplimiento, Adherencia, Atención Farmacéutica.

GESTIÓN DE RESIDUOS PELIGROSOS EN UN CENTRO DE REFERENCIA DE MICOBACTERIAS

Autor/es: José Emilio Aguilar Moreno, Antonio Gomera Martínez, Ana de Toro Jordano, Clara Guijarro Jiménez, Ana López Gómez, Manuel Vaquero Abellán.

Institución: Servicio de Protección Ambiental (SEPA). Universidad de Córdoba.

Introducción y objetivos:

En un Centro de Referencia de Micobacterias se manejan gran cantidad de muestras, productos, medios de cultivo; efectuando operaciones que conllevan la generación de residuos, algunos de ellos derivados de agentes biológicos que pueden resultar peligrosos para la salud y el medio ambiente. La normativa española vigente determina obligaciones e instrucciones para los productores de residuos peligrosos y la Universidad de Córdoba ha implantado un programa para su control y recogida. Todas las fuentes de generación de estos residuos deben conocer y participar en el procedimiento establecido, con objeto de optimizar el control de la producción de residuos biológicos, a la vez que mejorar la calidad en el trabajo de laboratorio, garantizando la seguridad y salud de los trabajadores y estudiantes. Nuestro objetivo es dar a conocer la experiencia del Servicio de Protección Ambiental de la Universidad de Córdoba en la Gestión de los residuos peligrosos en el Centro de Referencia de Micobacterias de la Universidad.

Material y método:

Estudio de actividades y selección de envases; clasificación, etiquetado y llenado; esterilización; almacenamiento temporal por parte del SEPA hasta su retirada definitiva por parte del gestor; trámites administrativos relacionados; formación e información.

Resultados:

Principales tipos de residuos generados: Agujas, puntas y jeringuillas con material biológico; material contaminado con Micobacterias; material plástico con medios de cultivo y restos celulares; sólidos contaminados con material biológico; vidrio de laboratorio.

Cantidades de residuos y envases gestionados:

Año	Kg Residuos	Nº Envases
2006	12	11 (todos de puntas<10 L)
2007	15,6	17 (todos de puntas<10 L)
2008	10	14 (todos de puntas<10 L)
2009	132,9	16 (12 de puntas<10 L; 4 bidones 60 L)
2010	160,2	24 (11 de puntas<10 L; 13 bidones 60 L)
2011	36,4	7 (4 de puntas<10 L; 3 bidones 60 L)

Conclusiones:

El sistema de gestión de residuos peligrosos en el Centro de Referencia de Micobacterias de la Universidad de Córdoba resulta eficaz. Se aprecia una tendencia fluctuante a lo largo de los años, así como una optimización en el uso de envases, utilizando los de mayor capacidad. Apreciamos una mejora en los procedimientos establecidos, así como una mayor conciencia medioambiental de los profesionales a la hora de gestionar adecuadamente los residuos. La participación y el compromiso de toda la comunidad universitaria, a todos los niveles (personal docente e investigador, técnicos de laboratorio, alumnado y proveedores), contribuyen al éxito de este sistema. Tan importante como la correcta gestión es la minimización de la generación de residuos. De entre las medidas utilizadas para disminuir la producción de estos residuos destacamos: la realización de cursos de formación a trabajadores y estudiantes, la elaboración y distribución de guías y manuales de laboratorio y buenas prácticas ambientales; y, el control de nuevas actividades de investigación, promoviendo el uso de normas básicas medioambientales.

Palabras clave: residuos, medio ambiente, minimización.

UTILIDAD DEL XPERT MTB/RIF EN EL DIAGNOSTICO DE LA TB EN UN HOSPITAL GENERAL

Autor/es: B. Gomila, S. Sabater, F. Roach, A. Campos, R. Moreno.

Institución: Sección Microbiología. Hospital General de Castellón.

Introducción:

La técnica Xpert MTB/Rif (Cepheid) es una PCR a tiempo real que detecta simultáneamente *M. tuberculosis* complex y las mutaciones que confieren resistencia a Rifampicina a partir de la amplificación de una región de 81 pares de bases de gen *rpoB*. Esta técnica es de fácil realización, requiere poco tiempo de personal y permite obtener un resultado en 2 horas.

Objetivo:

El objetivo de este estudio ha sido evaluar su utilidad de en el diagnóstico de tuberculosis y en la detección de resistencia a rifampicina en nuestro medio.

Material y método:

Desde junio de 2009 a diciembre de 2011 se procesaron 159 muestras: 114 eran respiratorias Y 45 extra-respiratorias (líquidos estériles, biopsias y orinas). A éstas se les realizó tinción con Auramina, PCR (Xpert MTB/Rif) y cultivo en medio líquido BACTEC MGIT960® (Becton Dickinson). Los cultivos positivos con aislamiento de BAAR se identificaron mediante la técnica de inmunoanálisis cromatográfico BD MGIT TBc ID® (Becton Dickinson) que detecta el antígeno MPT64. La sensibilidad se estudió con el método SIRE-Pz en BACTEC MGIT960 (Becton Dickinson). Se compara los resultados de la PCR con la baciloscopia, el cultivo y la sensibilidad a rifampicina.

Resultados: Los resultados obtenidos con la técnica de PCR y su correlación con la baciloscopia y el cultivo se resumen en las siguientes tablas:

TIPO MUESTRA	Nº MUESTRAS PROCESADAS	PCR POSITIVA	AURAMINA		CULTIVO	
			POS	NEG	POS	NEG
RESPIRATORIAS	114	56	45	11	53	3
EXTRA-RESPIRATORIAS	45	7	5	2	6	1

TIPO MUESTRA	Nº MUESTRAS PROCESADAS	PCR NEGATIVA	AURAMINA		CULTIVO	
			POS	NEG	POS	NEG
RESPIRATORIAS	114	58	4	54	1	57
EXTRA-RESPIRATORIAS	45	38	1	37	0	38

		Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
RESPIRATORIAS	AURAMINA	97.8	77.1	80.4	97.4
	CULTIVO	98.1	95	94.6	98.3
EXTRA-RESPIRATORIAS	AURAMINA	83.3	94.5	71.4	97.4
	CULTIVO	100	97.4	85.7	100

De las 63 muestras con PCR positiva, se detectaron 2 falsas resistencias a rifampicina, una por fallo de software y otra que no se confirmó por antibiograma con SIRE-Pz ni tras enviarla al Centro Nacional de Microbiología.

Conclusiones:

En nuestro medio la técnica tiene una buena sensibilidad sobre todo en muestras respiratorias. Aunque la técnica sólo está validada para muestras respiratorias, en nuestro caso comprobamos que también fue útil en extra-respiratorias. Ante una baciloscopia positiva con BAAR compatibles con micobacteria atípica el resultado negativo de la PCR nos confirma esta sospecha. -El buen VPN que presenta nos ayuda a descartar el diagnóstico de tuberculosis. -En caso de tener una prevalencia alta de resistencia, éstas se detectarían de forma precoz.

Palabras clave: GenXpert, muestras pulmonares, muestras extrapulmonares

PROPUESTA DE FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD PARA MICOBACTERIAS

Autor/es: Pablo López Roldán, Manuel Vaquero Abellán.

Institución: Universidad de Córdoba.

Introducción:

El trabajo en un Laboratorio de diagnóstico e investigación de Micobacteriología conlleva actividades en las que existe intención deliberada de manipular agentes biológicos de tipo 2 y 3 (RD 664/97). Facultativos, Investigadores y Técnicos deben recibir la información necesaria en relación con los riesgos para la seguridad y la salud de los trabajadores en el trabajo. La legislación vigente no contempla un modelo de ficha de datos de seguridad para agentes biológicos.

Objetivos:

- Proponer una ficha de datos de seguridad (FDS) para micobacterias, teniendo como referencia las que existen para agentes químicos, la legislación y los modelos que proponen diversas instituciones de reconocido prestigio.
- Proporcionar información útil al personal que trabaja con micobacterias, de forma que se les dote de herramientas adecuadas que garanticen la seguridad y salud en el trabajo.

Material y método:

Los criterios que se han tenido en cuenta han sido:

- Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.
- Nota Técnica de Prevención nº 636: Ficha de datos de seguridad para agentes biológicos del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.
- Modelo de FDS de la Public Health Agency of Canada.

El método de análisis ha sido el estudio comparativo de la normativa sobre agentes químicos, biológicos y de seguridad y salud en el trabajo, así como los diversos modelos de FDS.

Resultados:

Se ha conseguido un modelo de FDS adaptado a agentes biológicos, aplicado a micobacterias, que contiene las siguientes secciones:

1. Agente biológico: denominación, características, sinónimos y grupo de riesgo.
2. Riesgos para la salud: patogenicidad, epidemiología, tipo de huésped, dosis infectiva, mecanismo de transmisión, periodo de incubación
3. Propagación: reservorio, zoonosis, vectores.
4. Viabilidad: sensibilidad a los antimicrobianos, sensibilidad a los desinfectantes, inactivación por medios físicos, supervivencia fuera del huésped.
5. Primeros auxilios: primeros auxilios, tratamiento, vacunas y profilaxis.
6. Riesgos en el laboratorio: muestras, procesos de trabajo y peligros.
7. Control de la exposición: niveles de contención, ropa de trabajo y equipos de protección.
8. Manipulación: derrames accidentales, eliminación, almacenamiento y transporte.
9. Gestión residuos
10. Otras informaciones: Otros datos de interés y fecha de elaboración de la FDS.

Conclusiones:

La implementación de FDS para micobacterias es necesaria para garantizar la formación e información en materia de seguridad y salud laboral de los trabajadores que habitualmente están expuestos a estos agentes biológicos.

La legislación debería contemplar un modelo oficial de FDS, de forma que en toda empresa en la que se manipulen micobacterias haya información mínima disponible para los trabajadores.

Palabras clave: Ficha de datos de seguridad; micobacterias; riesgos en el trabajo

INFECCIONES POR MYCOBACTERIAS EN LA CAVIDAD ORAL UNA RARA LOCALIZACIÓN

Autor/es: Rafael Segura Saint-Gerons(1),Alejandro Ceballos Salobreña(2),Luis Gaitan Cepeda(3),Mariano Toro Rojas(4),Josefa Fanego Fernandez(1).

Institución: (1)Servicio Andaluz de Salud, (2)Universidad de Granada, (3)Universidad Nacional Autónoma de México, (4)Universidad de Córdoba.

Introducción:

La infección por Mycobacterias en la cavidad oral es una rara afección que suele ser secundaria a infecciones en otra localización, en las cuales en el curso de la enfermedad puede afectar por colonización directa a la mucosa oral donde producen patología.

La infección por VIH/SIDA ha sido una de las causas que ha hecho que veamos un repunte de las enfermedades causadas Mycobacterias fundamentalmente por *M. avium*, pero no siempre debemos esperar que sea un paciente VIH+ el que padezca estas enfermedades.

El objetivo de este trabajo es presentar tres casos clínicos de infección en la cavidad oral por Mycobacterias.

Casos Clínicos:

Caso 1. Paciente varón de 35 años VIH+, con tuberculosis pulmonar previa conocida que acude a consulta por presentar ulcera lingual de más de un mes de evolución, dolorosa y que no remite con los tratamientos usuales de las úlceras orales. Se realiza la biopsia de la lesión resultando el diagnóstico anatomo-patológico, ulcera tuberculosa.

Caso 2. Paciente femenino de 81 años emitida por su médico de familia por presentar tos, disnea y disfagia. Ha sido remitida al servicio de ORL sin que se le haya encontrado ninguna causa de esta sintomatología. En la exploración oral se encuentran amplias ulceraciones en paladar y lengua, por lo que se decide biopsiar dando el resultado anatomopatológico lepra lepromatosa.

Caso 3. Niña de 6 años remitida por el servicio de pediatría por presentar tumoración en mandíbula izquierda. La tumoración no sabe la madre cuanto tiempo de evolución lleva pero hace año y medio se le realizó una extracción de un diente deciduo. Se realiza la biopsia de la lesión informando el anatomopatólogo de osteomielitis tuberculosa. Se estudia la paciente por el servicio de infecciosos no encontrando tuberculosis en otra localización.

Las afecciones por Mycobacterias de localización oral aunque ocurren en raras ocasiones, son una posibilidad diagnóstica y debe hacernos pensar en ellas cuando encontramos lesiones torpidas de larga evolución y de escasa o ninguna respuesta a las terapéuticas habituales.

Palabras clave: Tuberculosis, Lepra, Mucosa Oral

ESPONDILODISCITIS POR MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS VS. CANETTII

Autor/es: M.L Monforte Cirac, S. Samper Blasco, C. Ramos Paesa, M.J Revillo Pinilla, M.A Lezcano Carrera.

Institución: Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Miguel Servet.

Introducción/Objetivos:

La espondilodiscitis tuberculosa o mal de Pott constituye la localización más frecuente de la tuberculosis en el aparato locomotor. La puerta de entrada del bacilo a la columna vertebral es generalmente por vía hematológica. La mayor dificultad en el diagnóstico viene dada porque en los periodos iniciales la sintomatología es inespecífica y anodina, tarda mucho tiempo en aparecer, y pueden producirse complicaciones neurológicas en el curso de la enfermedad. Nuestro objetivo es comunicar un caso de espondilodiscitis tuberculosa producida por *Mycobacterium tuberculosis complex* y describir sus características clínicas y microbiológicas.

Caso Clínico:

Presentamos el caso de un hombre de 28 años de edad, natural de Mali, lleva viviendo 4 años en España, ingresa en nuestro hospital por presentar un cuadro de dorsalgia de características mecánicas de 4 meses de evolución sin fiebre ni síndrome constitucional. En la exploración física se observa, dolor a la palpación y puño percusión a nivel de columna dorsal, no existen déficits sensitivo-motores y el resto de la exploración es normal.

Se realizó una resonancia nuclear magnética de columna vertebral, en la cual se apreció una extensa formación con áreas centrales de comportamiento líquido-necrótico ocupando los tejidos blandos paravertebrales D4, D5 y D6 con extensión intracanalicular a nivel D6 y comprimiendo al saco dural (ver imagen). Se realizaron serologías de: Brucella, Lues, Virus de la hepatitis B, C y de la Inmunodeficiencia Humana resultando negativas. La prueba de mantoux fue positiva.

Posteriormente se realizó biopsia de la masa paravertebral y se envió muestra al laboratorio de microbiología para estudio de bacterias y micobacterias.

La muestra se procesó para micobacterias y se inoculó en medio sólido de Löwenstein-Jensen y líquido MB/BactAlert® (bioMérieux). La sensibilidad antibiótica se realizó por el sistema BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson).

En la baciloscopia no se observaron BAAR y tras 38 días de incubación en medio líquido se obtuvo el crecimiento de una micobacteria.

Se realizó la identificación por la técnica de GenoType® *Mycobacterium* CM (HAIN LIFESCIENCE), reducción de nitratos y sensibilidad al TCH identificándose como *M.tuberculosis complex*. Ante el aspecto liso y brillante de la colonia, la coloración blanca y dificultad de crecimiento decidimos realizar GenoType® MTBC (HAIN LIFESCIENCE) para diferenciar entre los miembros del complejo tuberculosis, identificándolo como *M. tuberculosis/M.canetti* por lo que con este resultado continuamos realizando las siguientes técnicas moleculares: IS6110-RFLP, Spoligotyping, y la ausencia de la región TBD1 que nos confirmaron que se trataba de un aislado moderno de *M.tuberculosis*.

Se realizó la sensibilidad a los siguientes tuberculostáticos: Isoniacida, rifampicina, estreptomycin, etambutol y pirazinamida, resultando sensible a todos ellos.

El paciente recibió tratamiento médico con cuatro tuberculostáticos: Isoniacida, pirazinamida, rifampicina y etambutol y tratamiento quirúrgico, en el que se realizó Artrodesis vertebral D2-D10.

La evolución del paciente fue buena.

Discusión:

La tuberculosis causada por *M. canettii* es una enfermedad emergente en el Cuerno de África, que parece estar limitada a esta región, aunque están empezando a aparecer casos por todo el continente

M. canettii se caracteriza por el crecimiento de colonias blancas, lisas y brillantes en medio sólido, diferentes a las colonias de *M. tuberculosis*.

La identificación rápida y precisa de *M. canettii* es útil para obtener más información de la importancia epidemiológica de este patógeno.

Conclusiones:

Es necesaria la identificación exacta de los miembros del complejo tuberculosis tanto para instaurar una terapia adecuada en algunos casos (*M. bovis* ssp. *bovis*), como para conocer su incidencia, importante desde el punto de vista epidemiológico

Como en el caso que nos ocupa, ante el aislamiento de una colonia lisa, brillante y blanca y ante la duda de *M. tuberculosis*/*M. canettii*, se debe realizar una correcta identificación del miembro dentro del complejo. La técnica empleada GenoType® MTBC (HAIN LIFESCIENCE), es válida para la identificación de los miembros del complejo, pero en este caso fue necesario ampliar la identificación con técnicas moleculares complementarias.

Palabras clave: Espondilodiscitis, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium canettii*

RESISTENCIA DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS A FARMACOS DE 2ª LINEA

Autor/es: Pilar Ruiz Martínez, J. B. Gutiérrez Aroca , Manuel Causse del Río, Casal Roman.

Institución: Centro Referencia de Micobacterias.Dpto. Microbiología. Facultad Medicina. Córdoba.

Introducción:

Los aislamientos de cepas multirresistentes, obliga a la utilización de fármacos de 2ª Línea para el tratamiento de la tuberculosis. Con el objeto de poder detectar las posibles resistencias a estos fármacos se aconseja, la realización de estudios de sensibilidad a fármacos de 2ª línea. Objetivos:

El objetivo de nuestro estudio es ver cual es la incidencia en nuestro medio de cepas resistentes a fármacos de segunda línea .

Material y método:

Estudiamos 527 cepas de M. tuberculosis aisladas en nuestro Hospital en el periodo 2006-2011. Estos aislamientos fueron identificadas mediante procedimientos Accuprobe ó Genotype Mycobacteria. A todas ellas se les realizó el estudio de sensibilidad a los fármacos de segunda línea: amikacina (AK) 1.0 µg/ml , capreomicina (CAPREO) 2.5 µg/ml, etionamida (ETH) 5.0µg/ml , linezolid (LZ)1.0µg/ml y moxifloxacin (MOXI) 2.0 µg/ml, El método utilizado fué el sistema MGIT.

Resultados:

AÑO	2006	2007	2008	2009	2010	2011	TOTAL
Nº	90	45	75	119	97	101	527
ABG							
AK			1				1 (0,18%)
CAP			3			1	4 (0,75%)
ETH		1	2	4	6		13 (2,46%)
LZ							0
MOX						2	2 (0,75%)

Conclusión:

Ante la detección de cepas con resistencia a fármacos de segunda línea en tuberculosis, en las cepas recibidas en nuestro Centro consideramos de gran utilidad la realización de estudios de sensibilidad , no solo a fármacos de de 2ª línea sino ampliarlos a otros fármacos.

Palabras clave: Micobacterias , Resistencias y 2ª Línea.

ESTUDIO DE LAS RESISTENCIAS A FÁRMACOS DE 3ª LÍNEA FRENTE A MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Autor/es: Pilar Ruiz Martínez, Juan Gutiérrez Aroca , Manuel Causse del Río, Manuel Casal Roman.

Institución: Centro de Referencia de Micobacterias.Facultad de Medicina. Servicio de Microbiología. Hospital Reina Sofia.

Introducción/ Objetivo:

El estudio de las resistencias a fármacos de tercera línea en tuberculosis, tiene cada día más interés ante la detección de cepas sólo MDR sino también XDR (La OMS define como cepas de Mycobacterium tuberculosis extremadamente resistentes (XDR) a aquellas que presentan resistencia al menos a rifampicina , isoniazida y una fluorquinolona y al menos una de las tres antituberculosos inyectables (capreomicina, amikacina, kanamicina).

El objetivo de nuestro estudio es conocer la sensibilidad de las cepas recibidas en nuestro Centro en los últimos años, a los fármacos que pueden constituir una alternativa terapéutica en las cepas con resistencias.

Metodos:

Se utilizaron un total de 553 cepas de M. tuberculosis. Todas fueron aisladas para descartar mezclas e identificadas mediante procedimientos bioquímicos, HPLC, Accuprobe ó Genotype. La determinación de las resistencias se llevó a cabo por el sistema MGIT 960, para los fármacos , Kanamicina (KAN), Ofloxacino (OFX), Ciprofloxacino (CIP), Levofloxacino (LVX), Rifabutina (RFB), Rifapentina (RFP), Cicloserina (CSN) y PAS.

Resultados:

De las 553 cepas estudiadas, 73 (13,85%) presentaron resistencia alguno de los fármacos de 1ª línea, y 43 (7,77%) presentaron resistencias a otros fármacos. De estas 43 cepas, detectamos resistencia a rifabutina en 21 cepas (3,79%), a rifapentina en 17 cepas (3,07%), , a Ofloxacino en 15 cepas (2,71%), 10 cepas fueron resistentes a ciprofloxacino (1,80%); 5 a levofloxacino (0,90%) y a Kanamicina en 3 cepas (0,54%). No se detectaron resistencias a cicloserina ó PAS.

Conclusión:

A la vista de los resultados, se aconseja la realización de los estudios de sensibilidad a todos los fármacos que puedan ser utilizados en el tratamiento de la tuberculosis resistente.

Palabras clave: Tuberculosis.Resistencia. 3ª línea.

MUTACIONES DE RESISTENCIAS A FARMACOS DE 2ª LINEA

Autor/es: Pilar Ruiz Martínez, Juan Gutiérrez Aroca , Manuel Causse del Río, Casal Roman.

Institución: Centro Referencia Micobacterias.Dpto. Microbiología. Facultad Medicina. Córdoba.

Introducción:

Los métodos genéticos nos permiten detectar en unas horas , la presencia de mutaciones.GenotypeR MTBRD sl permite la identificación simultánea de M. tuberculosis complex y la resistencia a fluorquinolonas como ofloxacino y moxifloxacino por detección de las mutaciones más frecuentes en el gen gyrA y la resistencia a los fármacos inyectables (Viomicina, kanamicina, amikacina y capreomicina) por detección de las mutaciones más comunes en el gen rrs y la resistencia al fármaco etambutol, por detección de las mutaciones más comunes en el gen embB.

Objetivos:

El objetivo de nuestro trabajo es determinar la eficacia de GenotypeR MTBRD sl para determinar mutaciones de Mycobacterium tuberculosis a fármacos de segunda línea

Material y metodo:

Hemos estudiado 85 cepas de Mycobacterium tuberculosis .Todas fueron aisladas para descartar mezclas e identificadas mediante procedimientos bioquímicos, HPLC, Accuprobe ó Genotype.. . A todas ellas se les realizó el estudio de sensibilidad fenotípico a los fármacos de primera línea según protocolo MGIT 960 y a los fármacos de segunda línea: Amikacina (AK) 1.0 µg/ml , capreomicina (CAPREO) 2.5 µg/ml , kanamicina (K) 1µg/ml , etionamida (ETH) 5.0µg/ml , rifabutina (RB)0.5 µg/ml , ofloxacina (OFLO) 2.0 µg/ml, ciprofloxacina (CIPRO) 2.0 µg/ml, moxifloxacina (MOXI) 2.0 µg/ml, levofloxacina (LEVO) 4.0 µg/ml , linezolid (LZ)1.0µg/ml , cicloserina (CICLO) 75 µg/ml y PAS 50µg/ml . Para ellos tambien se utilizó el mismo protocolo. Para el estudio Genotípico se utilizó el GENOTYPE MTBDRsl (Hain Lifescience, Nehren, Germany). A las cepas discordantes se les realizó estudio de secuenciación.

Resultados:

De las 85 cepas estudiadas, 68 fueron sensibles por ambos métodos, y 14 cepas fueron resistentes por ambos métodos: 7 a quinolonas, 2 a amikacina, kanamicina ó capreomicina y 5 a etambutol. Las cepas discordantes fueron: 3 cepas fenotípicamente resistentes a ofloxacina y sensibles al resto de las fluorquinolonas y genotípicamente se detectó mutación en el gyrA.; 2 cepas fueron resistentes fenotípicamente a capreomicina , 1 a capreomicina y kanamicina y 1 capreomicina, kanamicina y amikacina y no fueron detectadas mutaciones; en cuanto a etambutol 2 cepas fueron resistentes fenotípicamente y no se detectó mutación y 2 cepas fueron sensibles fenotípicamente pero si se detectó mutación. La secuenciación de estas discordancias confirmó los resultados genotípicos.

Conclusiones:

Genotype MTBDRsl parece un método fiable y rápido para la detección de mutaciones a los fármacos de segunda línea : Fluorquinolonas, capreomicina,kanamicina ó amikacina. Además permite detectar mutaciones a Etambutol.

Palabras clave: Genotype, Mutaciones, Tuberculosis

RESISTENCIA DE M.TUBERCULOSIS A FARMACOS DE 1ª LINEA

Autor/es: J. B. Gutiérrez Aroca , Pilar Ruiz Martínez, Manuel Causse del Río, Casal Roman.

Institución: Hospital Universitario Reina Sofia. Serv. Microbiología. Facultad Medicina.Córdoba.

Introducción:

Las resistencias a los fármacos en Tuberculosis en los últimos años, ha variado en función de los distintos tipos de población actual. No obstante aunque en nuestro medio con una baja incidencia de población inmigrante con Tuberculosis, debemos estar alerta ante los aislamientos de cepas MDR y XDR.

Objetivo:

El objetivo de nuestro estudio es ver cuál es la incidencia en nuestro medio de cepas resistentes a fármacos de primera línea.

Material y método:

Se utilizaron un total de 650 cepas de M. tuberculosis. Todas fueron aisladas para descartar mezclas e identificadas mediante procedimientos Accuprobe ó Genotype. A todas ellas se les realizó el estudio de sensibilidad a Estreptomina (SM), Rifampicina (RF), Etambutol (EB), Isoniazida (INH) y Pirazinamida (PZ). según protocolo MGIT 960.

Resultados:

ANOS	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Nº de ABG	68	79	60	50	65	60	69	73	73	53
SM	1	0	0	0	3	1	4	4	7	5
RF	2	2	3	3	7	3	1	3	0	1
EB	1	0	0	2	1	0	0	2	1	1
INH	4	1	2	3	9	4	5	6	6	8
PZ	0	0	0	1	3	0	2	1	2	2

Conclusión:

A la vista de los resultados se observa que hay un incremento evidente en los últimos años sobre todo en Estreptomina, Isoniazida. También destacar que en el año 2005 hubo un aumento de las resistencias a todos los fármacos en general. La resistencia a fármacos de primera línea en tuberculosis, hace que sean necesarios los estudios de sensibilidad in vitro.

Palabras Clave: M. tuberculosis, Resistencias, Primera línea

RESISTENCIA DE M.TUBERCULOSIS A FARMACOS DE 2ª LINEA

Autor/es: J. B. Gutiérrez Aroca , Pilar Ruiz Martínez, Manuel Cause del Río, Casal Roman.

Institución: Hospital Universitario Reina Sofia. Serv. Microbiología. Facultad Medicina. Córdoba.

Introducción:

Considerando las resistencias a 1ª Línea en los aislamientos de M. tuberculosis en nuestro ambiente, es necesario realizar antibiogramas a otros fármacos como alternativa al tratamiento normalizado en Tuberculosis.

Objetivo:

El objetivo de nuestro estudio es ver cual es la incidencia en nuestro medio de cepas resistentes a fármacos de segunda línea.

Material y método:

Se utilizaron un total de 650 cepas de M. tuberculosis. Todas fueron aisladas para descartar mezclas e identificadas mediante procedimientos Accuprobe ó Genotype. A todas ellas se les realizó el estudio de sensibilidad a Estreptomina (SM), Rifampicina (RIF), Etambutol (EB), Isoniazida (INH) y Pirazinamida (PZA). según protocolo MGIT 960 y a los fármacos de segunda línea: Amikacina (AK) 1.0 µg/ml, Capreomicina (CA) 2.5 µg/ml, Etionamida (ETH) 5.0µg/ml, Moxifloxacina (Mox) 2.0 µg/ml, Para ellos tambien se utilizó el mismo protocolo.

Resultados:

AÑO	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Nº ABG	68	79	60	50	65	60	69	73	73	53
Amikacina	0	0	0	0	0	0	2 / 2,89%	3 / 4,10 %	0	0
Capreomicina	0	0	1 /	0	1 /	2 /	2 / 2,89%	2 / 2,73	0	2 / 3,77
Ethionamida	0	0	0	0	0	0		3 / 4,10 %		1 /
Linezolid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Moxifloxacina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Conclusión:

En los últimos años observamos un incremento en la detección de cepas resistentes a estos fármacos, que coincide con las resistencias a primera línea, en estos años. La resistencia a fármacos de segunda línea en tuberculosis, hace que sean necesarios los estudios de sensibilidad in vitro

Palabras Clave: M. tuberculosis, Resistencia Segunda línea

RESISTENCIA DE M.TUBERCULOSIS A FARMACOS DE 3ª LINEA

Autor/es: J. B. Gutiérrez Aroca , Pilar Ruiz Martínez, Manuel Causse del Río, Casal Roman.

Institución: Hospital Universitario Reina Sofia. Serv. Microbiología. Facultad Medicina. Córdoba.

Introducción:

La detección de cepas XDR (Resistentes al menos a Rifampicina e isoniazida mas alguna Fluorquinolona mas alguno de los farmacos inyectables Amikacina, Kanamicina o Capreomicina) hace imprescindible la ampliacion del antibiograma de M tuberculosis al mayor numero de farmacos disponible para poder tener una alternativa terapeutica.

Objetivo:

El objetivo de nuestro estudio es ver cual es la incidencia en nuestro medio de cepas resistentes a fármacos de tercera línea .

Material y método:

Se utilizaron un total de 650 cepas de M. tuberculosis. Todas fueron aisladas para descartar mezclas e identificadas mediante procedimientos Accuprobe ó Genotype. A todas ellas se les realizó el estudio de sensibilidad a Estreptomicina (SM), Rifampicina (RIF), Etambutol (EB), Isoniazida (INH) y Pirazinamida (PZA). según protocolo MGIT 960 y a los fármacos de tercera línea: Ciprofloxacina (Cip) 2.0 µg/ml, Cicloserina (CCL) 75 µg/m Kanamicina (K) 1µg/ml , Levofloxacina (Lev) 4.0 µg/ml , Ofloxacina (Oflo) 2.0 µg/ml, PAS 50µg/ml Rifabutina (Rb) 0.5 µg/ml , Rifapentina (Rp) . Para ellos tambien se utilizó el mismo protocolo.

AÑO	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Nº ABG	68	79	60	50	65	60	69	73	73	53
CIPROFLOXACINA	0	0	0	0	1	0	1	1	0	2
CICLOSERINA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KANAMICINA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LEVOFLOXACINA	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
OFLOXACINA	0	0	0	0	1	2	0	1	1	1
PAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RIFABUTINA	0	2	2	0	6	1	0	0	0	0
RIFAPENTINA	0	2	2	0	6	0	0	0	0	0

Conclusión:

A pesar de la baja resistencia a estos farmacos de 3ª linea, es aconsejable realizar los estudios de sensibilidad a estos farmacos.

Palabras Clave: M. tuberculosis, Resistencias, Tercera línea.

RESISTENCIA DE M. TUBERCULOSIS EN ANDALUCIA

Autor/es: J. B. Gutiérrez Aroca , Pilar Ruiz Martínez, Manuel Causse del Río, Casal Roman.

Institución: Laboratorio de Referencia de Resistencias en Andalucía. Hospital Universitario Reina Sofia. Serv. Microbiología. Facultad Medicina. Córdoba.

Introducción:

Nuestro Hospital ha sido encargado de la confirmación de las resistencias en cultivos de M tuberculosis en la zona Occidental de Andalucía. Los resultados que se exponen corresponden a cultivos enviados de Hospitales de esta Zona, Estos no representan la incidencia de resistencias en esta zona, pues estas son cepas seleccionadas.

Objetivo:

El objetivo de nuestro estudio es ver cual es la incidencia en nuestro medio de cepas resistentes a fármacos de primera línea .

Material y Metodo:

Se utilizaron un total de 78 cepas de M. tuberculosis. Todas fueron aisladas para descartar mezclas e identificadas mediante procedimientos Accuprobe ó Genotype. A todas ellas se les realizó el estudio de sensibilidad a Estreptomina (SM), Rifampicina (RF), Etambutol (EB), Isoniazida (INH) y Pirazinamida (PZ). según protocolo MGIT 960

Resultados:

AÑO	2006	2007	2008	2009	2010	TOTAL
Nº ABG	6	16	24	17	42	105
SM	1	4	4	7	5	21
RF	3	1	3	0	1	8
EB	0	0	2	1	1	4
INH	4	5	6	6	8	29
PZ	0	4	1	2	2	9

Conclusiones:

Es de destacar la resistencia a la Estreptomina, quizás por ser cepas aisladas en pacientes tratados en otros países.

Palabras clave: Tuberculosis, Resistencias, 1ª Línea

ESTUDIO DE DOS TESTS DE PCR A TIEMPO REAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS EN MUESTRAS RESPIRATORIAS

Autor/ es: Causse, M. Gutierrez-Aroca, JB. Ruiz, P. Casal, M.

Institución: Servicio de microbiología. H.U. Reina Sofía (Córdoba, España)

Introducción:

El diagnóstico precoz de la tuberculosis es uno de los principales objetivos de la Organización Mundial de la Salud. El Center for Disease Control and Prevention (CDC) recomienda en su última actualización la utilización de una técnica molecular de diagnóstico rápido en al menos una muestra por paciente.

Objetivos:

Evaluar un nuevo kit (COBAS Taqman MTB®, Roche) para el diagnóstico de tuberculosis en muestras respiratorias. Se usó como referencia el cultivo (Lowestein o MGIT 960). Se comparó con el kit COBAS Amplicor MTB.

Material y método:

Se procesaron un total de 141 muestras respiratorias. Tras la descontaminación con Nacetilcisteína-NaOH 2%, se procedía a la realización de tinción de auramina y cultivos en medio sólido (Lowestein piruvato) y líquido (MGIT 960). A continuación se realizaba una sola extracción mediante el kit AMPLICOR Respiratory Specimen Preparation Kit y con el mismo eluido se procedía a realizar las dos amplificaciones con los kits COBAS Amplicor MTB y COBAS TaqMan MTB.

Resultados:

80 cultivos resultaron positivos para MTB, de los cuales 78 fueron correctamente detectados por COBAS Amplicor y 79 por COBAS TaqMan. Esta muestra resultó ser un líquido pleural que se consideró como falso negativo de COBAS Amplicor.

Los controles internos resultaron inhibidos en 3 muestra para COBAS Amplicor y una para COBAS TaqMan.

Las 76 muestras en las que la baciloscopia resultó positiva fueron detectadas correctamente por ambos kits.

La sensibilidad de COBAS TaqMan MTB fue de 98,8% ligeramente superior a COBAS Amplicor MTB (97,5%), mientras que la especificidad de ambos se situó en el 96%.

Conclusiones:

COBAS TaqMan MTB resulta ser un kit de PCR a tiempo real tan eficaz como COBAS Amplicor en el diagnóstico de tuberculosis en muestras respiratorias.

Permite acortar el tiempo de obtención de resultados de 6 a 2,5h y la visualización de las curvas para la comprobación de los resultados.

ESTUDIO GENOTÍPICO DE CEPAS RESISTENTE DE TUBERCULOSIS EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA ANDALUZA

Autor/es: Causse, M1.; Ruiz, P2.; Gutierrez-Aroca, JB 1,2.; Casal, M1,2.

Institución: 1.-Servicio de Microbiología H.U. Reina Sofía. Cordoba (España)
2.-Micobacteria Referente Center, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba (España).

Introducción:

La resistencia a antibióticos en tuberculosis es un problema de gran importancia actual.

Se ha visto en *Mycobacterium tuberculosis*, que la adquisición adicional de mutaciones al margen de las que confieren la resistencia contribuye significativamente a la supervivencia de bacterias resistentes en las poblaciones humanas. Si se confirma que las cepas resistentes con estas mutaciones son especialmente transmisibles, deberían ser incorporadas en los programas de vigilancia de tuberculosis pues pueden indicar cepas que probablemente generen brotes de tuberculosis resistente en el futuro.

Objetivos:

Nuestro objetivo en este trabajo fue realizar el estudio molecular de cepas de *M.tuberculosis* y probar la relación entre aquellas con resistencia en el antibiograma de primera y/o segunda línea.

Material y método:

Se utilizaron 51 cepas de *M. tuberculosis* de nuestra colección desde los años 2009 hasta el 2011

Se empleó una técnica basada en tecnología rep-PCR denominada Diversilab (Biomérieux®). La extracción se realizó mediante una modificación del protocolo del Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit. A continuación se procedió a la rep-PCR en el termociclador Applied 9700 y el análisis de los fragmentos se realizó en un chip mediante electroforesis capilar en el Agilent 2100 Bioanalyzer. Estos datos eran analizados mediante el sistema informático de Diversilab a través de página web que permite la comparación entre las cepas probadas en el laboratorio, así como cepas procedentes de librerías.

Resultados:

En 46 de las 54 cepas testadas no se encontró un porcentaje de acuerdo de más del 95% con otro paciente formando patrones individuales. Por lo tanto encontramos sólo 4 clusters, todos ellos de dos cepas que Diversilab mostraba como indistinguibles. Utilizando los patrones de resistencias estos cuatro cluster resultaban con idénticos antibióticos resistentes.

Conclusiones:

Diversilab parece una técnica adecuada para el estudio genotípico de cepas, al menos como herramienta inicial por su rapidez y sencillez. Aunque se necesitan estudios mas amplios para estudiar su validez.



AYUNTAMIENTO DE CORDOBA



UNIVERSIDAD DE CORDOBA



Diputación de Córdoba