



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Estudi de la transmissió de la tuberculosi en el context nosocomial i poblacional: caracterització fenotípica i genotípica de soques de *Mycobacterium tuberculosis*

Griselda Tudó i Vilanova

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries

Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

# **ESTUDI DE LA TRANSMISSIÓ DE LA TUBERCULOSI EN EL CONTEXT NOSOCOMIAL I POBLACIONAL**

CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA I GENOTÍPICA DE SOQUES DE  
*Mycobacterium tuberculosis*

Griselda Tudó i Vilanova

Barcelona, 2004

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701215644

Als meus estimats Pares  
Ester i Artur

A tota la meva família....  
La Passada... les arrels,  
La Present... el tronc i les branques,  
i... la Futura... les fulles i els fruits



---

# Índex

---

<b>RESUM / RESUMEN / SUMMARY</b>	<b>vi</b>
<b>GLOSSARI</b>	<b>xi</b>
<b>INTRODUCCIÓ</b>	
<b>1 Aspectes generals de la tuberculosi</b>	<b>1</b>
1.1 El gènere <i>Mycobacterium</i> i l'espècie <i>tuberculosis</i>	2
1.2 Situació actual de la tuberculosi arreu del món	4
1.3 Factors socials, sanitaris i econòmics associats a la tuberculosi	6
1.3.1 La pobresa i el creixement poblacional	6
1.3.2 La pandèmia del virus de la immunodeficiència humana	6
1.3.3 Els corrents migratoris	8
1.4 Programes de control i lluita contra la tuberculosi. L'estratègia DOTS	8
<b>2 La transmissió de la tuberculosi</b>	<b>11</b>
2.1 Bases físiques de la transmissió	12

2.2 Mecanisme de transmissió de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	13
2.3 Immunopatogènia de la tuberculosi	14
2.3.1 Patogènia	16
2.3.2 Mecanismes immunològics	16
2.3.2.1 El macròfag i <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
2.3.2.2 Citoquines i quimioquines	19
2.3.2.3 Interaccions entre el macròfag i els limfòcits T	20
2.3.2.4 Immunopatogènia en els malalts VIH positius	22
2.4 Factors associats a la transmissió de <i>M. tuberculosis</i> : infectar-se	24
2.4.1 Respecte al malalt: transmissor	24
2.4.1.1 Localització i extensió de la malaltia	25
2.4.1.2 Mecanismes generadors de partícules contagioses	25
2.4.1.3 Valor de la bacil·loscòpia	25
2.4.1.4 Efecte del tractament	26
2.4.2 Respecte l'entorn: l'ambient	27
2.4.3 Respecte al contacte: receptor	28
2.4.3.1 Duració i intensitat de l'exposició	28
2.4.3.2 La resposta immune	28
2.4.3.3 Protecció contra la reinfecció	29
2.4.3.3.1 La vacuna de la BCG	29
2.5 Detecció de la infecció per <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	30
2.6 Factors associats a desenvolupar tuberculosi: emmalaltir	32
2.6.1 Temps transcorregut des de la infecció	32
2.6.2 Infecció pel virus de la immunodeficiència humana	33
2.6.3 Tuberculosi residual inactiva no tractada prèviament	33
2.6.4 Edat	34
2.6.5 Factors genètics	34
2.6.5.1 Sexe	35
2.6.6 Factors mediambientals i costums socials	35
2.6.6.1 Tabac, alcohol i usuaris de drogues per via parenteral	35
2.6.6.2 Desnutrició	36
2.6.7 Altres factors: afeccions clíniques de base	36
2.6.8 Embaràs	37
2.6.9 Les característiques del bacil	37
2.7 Detecció de la malaltia per <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	38
2.7.1 Diagnòstic clínic	38
2.7.2 Diagnòstic microbiològic	39
2.7.2.1 Visualització microscòpica	39
2.7.2.2 Aïllament del bacil: cultiu	39
2.7.2.2.1 Medis sòlids	40
2.7.2.2.2 Medis líquids	40

2.7.2.3	Identificació de la soca	41
2.7.2.3.1	Bacteriològica	41
2.7.2.3.2	Bioquímica	41
2.7.2.3.3	Genètica	42
2.7.2.3.4	Cromatografia i altres mètodes	42
2.7.2.4	Detecció genètica	43
2.7.3	Serodiagnòstic	44
2.7.4	Diagnòstic anatomopatològic	44
2.8	Mesures de prevenció i control de la tuberculosi	44
2.9	Epidemiologia convencional de la tuberculosi: estudi convencional de contactes	46
2.10	Epidemiologia molecular de la tuberculosi	48
2.10.1	Tècnica de referència	49
2.10.2	Altres tècniques de tipificació i marcadors epidemiològics associats	52
2.10.3	Aplicacions	55
2.10.3.1	Transmissió en poblacions	55
2.10.3.1.1	Transmissió recent i reactivació de la infecció latent	55
2.10.3.1.2	Correlació entre epidemiologia convencional i molecular	56
2.10.3.1.3	La població immigrant en la transmissió de la tuberculosi	58
2.10.3.1.4	Impacte de determinats clons arreu del món	59
2.10.3.1.5	Factors de risc associats a la transmissió recent	59
2.10.3.1.6	Reinfecció exògena i infeccions mixtes	60
2.10.3.1.7	Vigilància epidemiològica	61
2.10.3.1.8	Avaluació dels programes de control de la tuberculosi	61
2.10.3.2	Transmissió en institucions tancades	61
2.10.3.2.1	Hospitals	61
2.10.3.2.2	Presons	62
2.10.3.2.3	Poblacions marginades i centres d'acollida	63
2.10.3.3	Transmissió de soques resistents	63
2.10.3.3.1	Brots amb soques multiresistents	65
2.10.3.4	Contaminacions en el laboratori	65
<b>3</b>	<b>El tractament de la tuberculosi</b>	<b>67</b>
3.1	Fonaments bacteriològics del tractament antituberculosos	68
3.2	Evolució de les pautes de tractament	69
3.3	Pautes actuals de tractament	70
3.3.1	Infecció tuberculosa latent	70
3.3.2	Malaltia	72
3.3.2.1	Retractament	73
3.4	Resistències	75
3.4.1	Concepte de resistència en <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	75

3.4.2	Classificació de les resistències	76
3.4.3	Distribució mundial de les resistències	76
3.4.3.1	Situació de les resistències a l'Estat Espanyol	79
3.4.4	Detecció de la resistència	80
3.4.4.1	Detecció fenotípica	80
3.4.4.2	Detecció genotípica	82
3.4.4.2.1	Alteracions genètiques associades amb la resistència	82
3.4.4.2.2	Mètodes d'estudi	85
3.4.5	Efecte de la resistència en el viabilitat metabòlica de <i>M. tuberculosis</i>	86
3.4.6	Variables relacionades amb la resistència	86
<b>OBJECTIUS I DISSENYIS DELS ESTUDIS</b>		<b>88</b>
<b>MÈTODES I RESULTATS</b>		
I.	Detection unsuspected cases of nosocomial transmission of tuberculosis using a molecular method.	90
II.	Study of resistance to anti-tuberculosis drugs in five district of Equatorial Guinea: rates, risk factors, genotyping of gene mutations and molecular epidemiology.	98
III.	Molecular epidemiology of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in the Bata and Malabo districts in Equatorial Guinea.	107
<b>DISCUSSIÓ</b>		
I.	Transmissió recent i reactivació d'una infecció prèvia	123
II.	Epidemiologia molecular i epidemiologia convencional	125
III.	Efecte del tractament en la contagiositat dels malalts	128
IV.	Transmissió de soques resistents respecte de les sensibles	131
<b>CONCLUSIONS</b>		<b>135</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>		<b>137</b>

## ESTUDI DE LA TRANSMISSIÓ DE LA TUBERCULOSI EN EL CONTEXT NOSOCOMIAL I POBLACIONAL

Caracterització fenotípica i genotípica de soques de *Mycobacterium tuberculosis*.

---

Actualment, l'OMS estima que un terç de la població està infectada per *Mycobacterium tuberculosis*. Cada any es produeixen quasi 9 milions de casos nous i moren al voltant de 2 milions de persones. Diàriament, més de 23.000 persones desenvolupen la tuberculosi (TB) i, al voltant d'unes 5.000 persones moren per la seva causa.

Quan un malalt amb TB pulmonar tos, parla, esternuda o canta produeix i expulsa petites gotes a l'aire, les quals poden contenir bacils tuberculosos. Aquestes gotetes poden evaporar-se i arribar a la mida de *nuclis de gotetes o partícules contagioses*, que contenen un o més bacils tuberculosos, i que romandran suspesos en l'aire per un temps variable, depenent de les característiques de l'ambient. Aquestes partícules constitueixen la font principal de transmissió de *Mycobacterium tuberculosis*.

**Objectiu Principal.** L'objectiu principal d'aquest treball va ser estudiar la transmissió de la TB en el context, nosocomial i poblacional. Amb aquesta finalitat es van fixar tres objectius concrets: *Objectiu 1.* Anàlisi de la transmissió nosocomial de TB en malalts ingressats en un hospital de tercer nivell, durant un període de quatre anys (1994-1997). *Objectiu 2.* Descriure les resistències i els factors de risc associats, entre casos nous i prèviament tractats, en el districte de Bata i a l'illa de Bioko, a Guinea Equatorial, a més de genotipificar les mutacions associades a les resistències a isoniàcida i rifampicina i estudiar la transmissió de les soques resistents. *Objectiu 3.* Caracteritzar genotípicament les soques de *Mycobacterium tuberculosis*, aïllades en malalts dels districtes de Bata i Malabo, a Guinea Equatorial: determinant la freqüència de transmissió recent, els factors de risc, i els lligams de transmissió.

**Resultats.** *Objectiu 1.* Es van estudiar les soques de *Mycobacterium tuberculosis* de 151 malalts. Les soques de 37 malalts (24.5%) van permetre definir 11 agrupacions diferents. Cap dels malalts infectats amb una d'aquestes soques agrupades havien coincidit uns amb els altres i el 5.4% d'aquests tenien un lligam epidemiològic clar establert fora de l'hospital. Les variables *història prèvia de TB* i *presó* van ser associada significativament amb pertànyer a una agrupació. A més, 109 malalts sense TB, –41 dels quals estaven coinfectats amb el VIH–, que havien compartit habitació amb alguns dels malalts tuberculosos estudiats, van ser seguits clínicament durant un mínim de 18 mesos i un màxim de 60. El 68.3% dels malalts VIH positius i el 26.4% dels malalts VIH negatius van morir durant el període de seguiment com a resultat d'altres malalties. Només un d'ells va desenvolupar TB al cap de 16 mesos del contacte. La tipificació de la soca va evidenciar que els contagi no havia estat arrel d'aquest contacte.

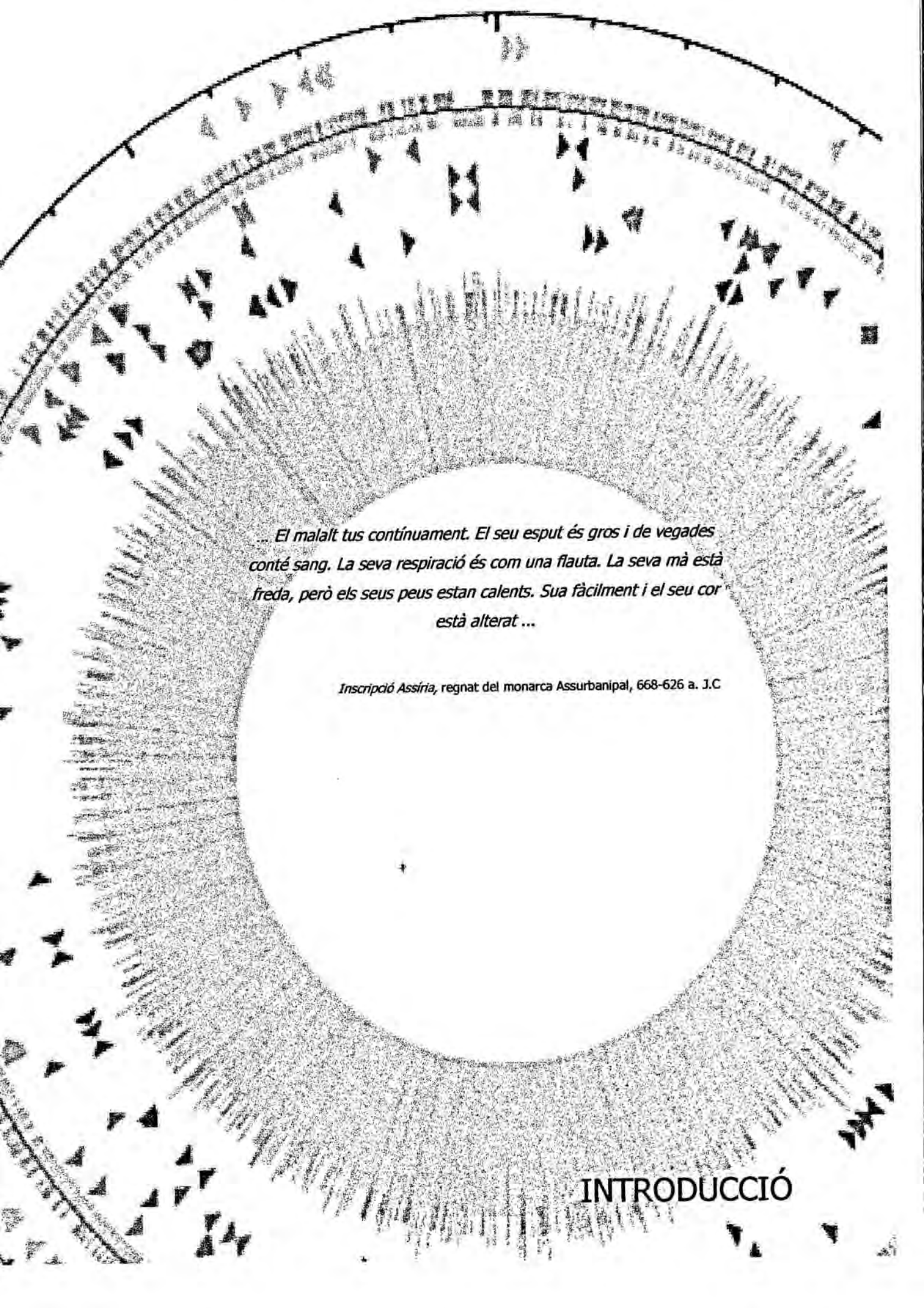
*Objectius 2 i 3.* Durant tot el període d'estudi es van estudiar 499 malalts. D'aquest 240 foren cultiu positiu i identificat com a complex *M. tuberculosis*. L'antibiograma va ser possible en 236 soques. La freqüència de resistència entre casos nous va ser del 16.9% (38/224), i entre els casos prèviament tractats va ser de 41.6% (4/5). La monoresistència a la INH va ser majoritària en els dos grups d'un 12.5 i 16.6%, respectivament. La MDR es va observar en el 1.7 i el 25 % en casos nous i prèviament tractats, respectivament. El sexe femení es va associar amb resistència en casos nous (OR 2.5; 95% CI 1.2-5.2 ). De les 41 soques resistents a la INH 33 (80.5%) tenien una mutació en el gen *inhA*, i totes les soques tenien resistències a la INH de baix nivell. No hi va haver cap soca amb mutació en el gen *katG*, i les vuit soques restants no tenien cap mutacions en cap dels dos gens estudiats. Vuit soques van ser resistents a la RMP i sis tenien el gen *rpoB* mutat. La tipificació de les soques per RFLP va ser possible en 185 (89.9%) dels cultius positius per *M. tuberculosis*, i es van identificar 92 patrons diferents. El 38.3% (71 soques) van presentar patrons únics i les 114 (61.6%) restants van determinar 21 agrupacions diferents, de 2 a 25 malalts. El 86% de les soques resistents van ser tipificades i 30 d'aquestes soques van determinar 7 agrupacions.

**Conclusions.** *Respecte a l'objectiu 1.* Entre els malalts-companys que van sobreviure no es va detectar cap cas secundari de TB que fos degut a una transmissió nosocomial. *Respecte a l'objectiu 2.* L'estudi va detectar una freqüència moderada de resistència entre casos nous, amb predomini de resistència de baix nivell a la INH associada a mutacions en el gen *inhA*, amb un alt percentatge de soques resistents agrupades. *Respecte a l'objectiu 3.* El nivell d'agrupació. 61.6%, observat suggereix un elevat grau de transmissió recent i un predomini de soques endèmiques característiques de la regió.

## Glossari

ADN:	<b>Àcid DesoxirriboNuclètic.</b>	PZA:	<b>PiraZinAmida.</b>
ARN:	<b>Àcid RiboNuclètic.</b>	RFLP:	<b>Restriction Fragment Length Polymorphism.</b> (polimorfisme en la longitud dels fragments de restricció).
ATS:	<b>American Thoracic Society.</b>	RIF:	<b>RIFampicina.</b>
BCG:	<b>Bacil Calmette-Guerin.</b>	SIDA:	<b>Síndrome de la ImmunoDeficiència Adquirida.</b>
CDC:	<b>Centers for Disease Control and Prevention.</b>	SM:	<b>eStreptoMicina.</b>
CMI:	<b>Concentració Mínima Inhibitòria.</b>	IS:	<b>Insertion Sequences</b> (seqüències d'inserció)
DOT:	<b>Directly Observed Treatment.</b> (tractament directament observat).	TB:	<b>TuBerculosis.</b>
DOTS:	<b>Directly Observed Treatment Short-course.</b> (tractament curt directament observat).	UDVP:	<b>Usuaris de Drogues per Via Parenteral.</b>
DTH:	<b>Delayed Type Hypersensitivity.</b> (hipersensibilitat tipus IV o retardada).	UICTMR:	<b>Unió Internacional Contra la Tuberculosis i Malalties Respiratòries.</b>
ECC:	<b>Estudi Convencional de Contactes.</b>	VIH:	<b>Virus de la Immunodeficiència Humana.</b>
ETM:	<b>ETaMbutol.</b>		
HLA:	<b>Human Leukocyte Antigen</b> (complex major d'histocompatibilitat humana).		
ASP:	<b>Agència de Salut Pública de Barcelona</b>		
INH:	Isoniazida.		
ITL:	<b>Infecció Tuberculosa Latent.</b>		
KDa:	<b>KiloDaltons</b>		
MDR:	<b>MultiDrugResistant</b> (multiresistència).		
MHC:	<b>Major Histocompatibilitat Complex</b> (complex major d'histocompatibilitat).		
OMS:	<b>Organització Mundial de la Salut.</b>		
PAS:	<b>àcid P-AminoSalicílic.</b>		
pb:	<b>parell de bases</b>		
PCR:	<b>Polimerasa Chain Reaction.</b> (reacció en cadena de la polimerasa).		
PNT:	<b>Programa Nacional de control de la Tuberculosis.</b>		
PPD:	<b>Purified Protein Derivate.</b> (derivats purificats proteics).		





*... El malalt tus continuament. El seu esput és gros i de vegades  
conté sang. La seva respiració és com una flauta. La seva mà està  
freda, però els seus peus estan calents. Sua fàcilment i el seu cor  
està alterat ...*

*Inscripció Assíria, regnat del monarca Assurbanipal, 668-626 a. J.C*

INTRODUCCIÓ





## ASPECTES GENERALS DE LA TUBERCULOSI

El microorganisme responsable de la TB, *Mycobacterium tuberculosis*, és un exemple clar de la pressió selectiva a la que han estat sotmeses moltes espècies durant milions d'anys, així com de la seva capacitat d'adaptació a situacions adverses. Tot i que els experts han estimat que *Mycobacterium tuberculosis* té una antiguitat calculada entre 15.300 i 20.400 anys, – estimada segons la freqüència de pèrdua de nucleòtids i la capacitat de mutació (Kapur i cols.,1994)–. Cada vegada més s'accepta que aquesta espècie va evolucionar d'altres microorganismes més primitius dins del propi gènere. Probablement, en algun moment del procés d'evolució, alguna espècie micobacteriana, per pressió selectiva natural, va canviar el seu reservori de l'aigua i/o terra cap als animals. D'aquesta manera s'hauria originat una espècie primitiva de *Mycobacterium bovis*, –l'espècie més antiga que forma part del complex *M.tuberculosis* (apartat 1.1)–. L'evolució d'aquest cap a l'espècie patògena humana *Mycobacterium tuberculosis* s'hauria produït coincidint amb el procés de domesticació dels animals pels homes (Haas i Haas, 1996).

## 1.1 EL GÈNERE *Mycobacterium* I L'ESPÈCIE *tuberculosis*

El nom genèric de *Mycobacterium* va ser proposat per Lehmann i Neumann l'any 1896. Taxonòmicament, és l'únic gènere en la família *Mycobacteriaceae*, ordre dels *Actinomycetales*. Comprèn més de 100 espècies ([www.bacterio.cict.fr/m/Mycobacterium.html](http://www.bacterio.cict.fr/m/Mycobacterium.html)). La majoria d'elles són ambientals i no patògenes. D'altres, i en determinades circumstàncies, són oportunistes, –el cas de *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*, *M. xenopi* entre altres–, i una minoria són patògenes obligades *Mycobacterium leprae* i el complex *M. tuberculosis*. Microbiològicament, totes les espècies descrites es classifiquen segons la producció de pigment en presència/absència de llum, –fotocromògena o escotocromògena i no cromògena–, i de la velocitat de creixement, –ràpid o lent–, en sis grups diferents (Shinnick i Good, 1994).

Els micobacteris són bacils aerobis, immòbils, sense espores, ni flagells ni càpsula i amb un elevat contingut de G+C, –entre el 62 i el 70%–, en el seu genoma. La composició de la paret dels micobacteris els hi dóna la particularitat de ser àcid-alcohol resistents, és a dir, són capaços de resistir l'acció decolorant d'un àcid i d'un alcohol prèviament a l'exposició a un colorant. Aquesta característica és el fonament de la tècnica Ziehl-Neelsen que permet la visualització microscòpica dels bacils (apartat 2.6.2.1). Els micobacteris són més resistents a la dessecació i a la desinfecció amb productes químics que altres microorganismes sense espores. Són, d'altre banda, sensibles a la calor humida i poden ser destruïts amb temperatures de pasteurització.

La TB és una malaltia infecciosa produïda pel complex *Mycobacterium tuberculosis*, que inclou les espècies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti* (causa TB en rosegadors), i més recentment *M. canetti*. Fonamentalment, el reservori de *Mycobacterium tuberculosis* és l'home. La persona sana però infectada representa el reservori més important de la malaltia i el responsable de l'endèmia, ja que malgrat que no contagia, aquesta immensa població infectada portadora del bacil, pot emmalaltir i ser potencial transmissor del micobacteri en qualsevol moment de la seva vida (Capítol 2). En menor grau, *Mycobacterium bovis* pot també afectar a l'home mitjançant el consum o contacte amb animals infectats. La TB per *M. bovis* és més freqüent en països en vies de desenvolupament donat l'escàs control sanitari a què estan sotmesos els animals.

*Mycobacterium tuberculosis* és un bacil prim de forma recta o lleugerament corba, amb els extrems arrodonits, i d'entre 0.3-0.5 µm d'ample i entre 1-4 µm de llarg (fig.1.1). Normalment, s'observen aïllats però també en petits grumolls compactes. Creix de manera lenta, –només té un operó per la síntesi de l'ARNr (ribosòmic)(Cole,1998)–, i en condicions

adients, amb CO<sub>2</sub>, el temps de generació és de 15 a 18 hores i, són necessàries entre 2 a 3 setmanes d'incubació a 37°C per poder visualitzar colònies en un medi de cultiu sòlid. És niacina positiva, redueix els nitrats a nitrits i té una catalasa termolàbil (apartat 2.6.2.4).



**Figura 1.1** Aspecte característic de *Mycobacterium tuberculosis* en una tinció Ziehl-Neelsen.

La seqüència completa del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv té 4.411.529 pb de mida, i un contingut de G+C del 65.6% (<http://bioweb.pasteur.fr/GenoList/TuberList/>) (Cole i cols.,1998, Cole,2002). En tot el genoma hi ha aproximadament uns 4.000 gens classificats en 11 grups funcionals. Actualment, el 52% d'ells tenen assignats una funció precisa o aproximada mentre que la resta és encara desconeguda (Camus i cols.,2002). Entre el 3 i 4% del genoma està constituït per IS i pròfags, –tipus phiRv 1 i phiRv 2–. Hi ha 56 còpies d'elements IS que pertanyen a famílies conegudes com la IS3, IS5, IS21, IS30, IS110, IS256, ISL3 i la IS1535. A més, un 8% del genoma està ocupat per les famílies de gens PE i PPE que engloben 100 i 67 membres, respectivament. A la vegada, les proteïnes PE i PPE es divideixen en subfamílies en funció del seu domini C-terminal. La classe PGRS (**P**olymorphic **G**C-rich **R**epetitive **S**equence) de les proteïnes PE i la classe MPTR (**M**ajor **P**olymorphic **T**andem **R**epeat) de les proteïnes PPE són les més destacades (Cole,2002). A més, aquests elements han estat emprats com a marcadors molecular per la tipificació de les diferents soques de *Mycobacterium tuberculosis* (apartat 2.10).

L'estructura cel·lular dels micobacteris és una de les característiques d'aquest gènere. El contingut lipídic és el responsable del voltant del 60% del pes sec de la paret i li dona les propietats que permeten al bacil resistir condicions ambientals adverses. Constà d'una paret

amb quatre capes separada de la membrana per l'espai periplàsmic. La capa més interna està constituïda per glicopèptids amb molècules de N-acetilglucosamina i àcid-N-glucolilmuràmic amb cadenes curtes d'Alanina. Aquesta capa s'esdevé l'esquelet del bacteri i li dóna forma i rigidesa. Externament, es distingeixen tres capes més:

a) una de polímers d'arabinosa i galactosa,

b) un altre constituïda per àcids micòlics. Aquests són un element important per la taxonomia dels micobacteris. Els àcids micòlics són àcids grassos de pes molecular elevat i constituïts per cadenes llargues d'entre 70 i 90 àtoms de carboni (C) amb un grup OH en posició beta i una ramificació en posició alfa. A més, els àcids micòlics alliberen àcids grassos de C22 i C26 per piròlisi,

c) l'última capa és superficial i està formada per lípids, el *cord factor*, -trehalosa 6,6'-dimicolato-, i per mucòsids, -glicolípid-, units no covalentment. Els lípids i els glicolípid representen el 60% del seu pes i són els responsables de la propietat hidròfoba (Brenan, 2003).

---

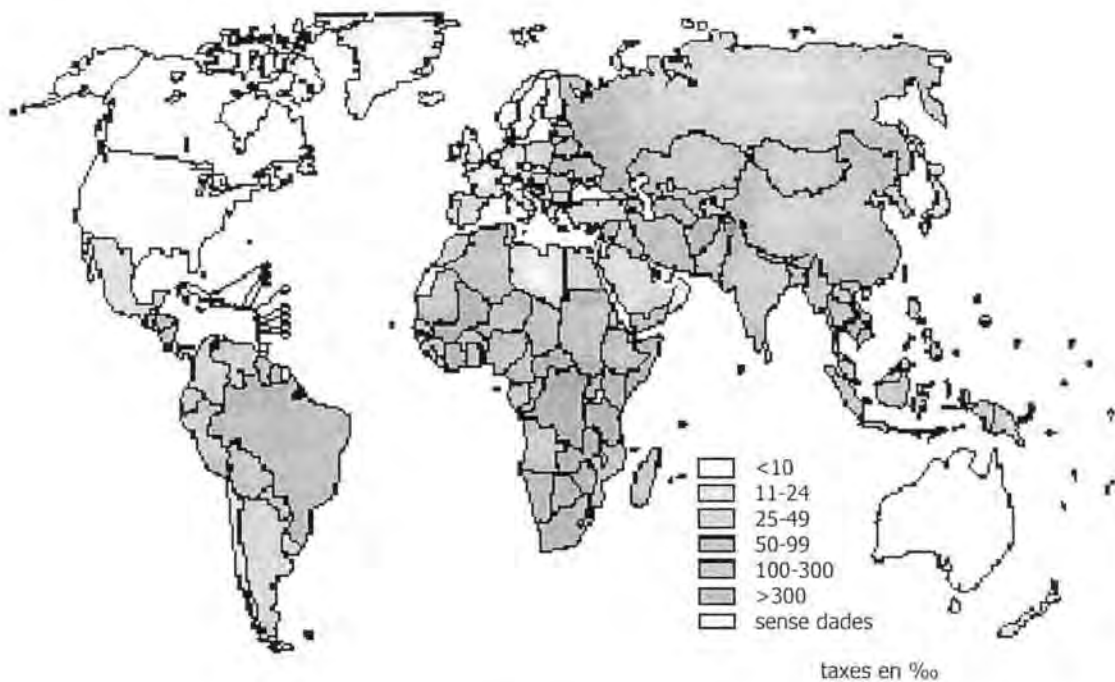
## 1.2 SITUACIÓ ACTUAL DE LA TUBERCULOSI ARREU DEL MÓN

Actualment, l'OMS estima que un terç de la població està infectada per *Mycobacterium tuberculosis*. Cada any es produeixen quasi 9 milions de nous casos i moren al voltant de 2 milions de persones. Diàriament, més de 23.000 persones desenvolupen la TB i, al voltant d'unes 5.000 persones moren per la seva causa. L'OMS ha estimat que, entre els anys 2002 i 2020, aproximadament s'infectaran 1000 milions de persones, emmalaltiran uns 150 milions i moriran uns 36 milions de persones sinó es reforcen les mesures de control i prevenció, especialment en les zones de més incidència. Aquesta elevada càrrega de morbimortalitat va motivar que l'OMS declarés, l'any 1994, la TB com una emergència global. La incidència mundial de TB, -taxa total de 138/100.000 hab., i 61/100.000 hab., amb bacil-loscòpia positiva-, augmenta aproximadament un 0,4% a l'any i ho fa de forma més ràpida a l'Àfrica sud-sahariana, i a països de l'antiga Unió Soviètica (OMS,2003b), en contraposició a la disminució que s'observa a l'oest i centre d'Europa, nord i sud Amèrica i el mig Est (fig.1.3). A més, un nombre elevat de casos, de 5 a 6 milions, es diagnostiquen en persones d'entre 15 a 49 anys. Les xifres d'incidència i prevalença varien d'un indret geogràfic a un altre i estan relacionades amb la presència de factors socials, econòmics, de salut i culturals que afavoreixen la disseminació de la malaltia i dificulten el seu tractament.

La distribució de casos de TB segons els països és desigual dins de la mateixa regió, i s'estima que el 80% de la càrrega de TB, -amb una incidència de 177/100.000 hab., i

78/100.000 hab., total de casos i amb bacil·loscòpia positiva, respectivament–, en el món es concentra en 22 països localitzats principalment a l'Àfrica sub-sahariana i el sud-est Asiàtic, – Índia, Xina, Indonèsia, Bangladesh, Nigèria, Pakistan, Sud-àfrica, Filipines, Rússia, Etiòpia, Kenya, RD Congo, Vietnam, Tanzània, Brasil, Tailàndia, Zimbabwe, Cambotja, Birmània, Uganda, Afganistan, Moçambic–, i declarats per l'OMS, àrees prioritàries (OMS,2003b).

A l'Estat espanyol, la situació de la TB és molt heterogènia entre les 17 autonomies. L'any 1996 es va dur a terme un projecte multicèntric d'investigació en TB que va estudiar el 67% de la població, –11 Comunitats Autònomes més Ceuta i Melilla–. Amb les dades generades es va poder estimar que la incidència de TB pulmonar, arreu de l'estat, era del 31.91/100.000 hab., malgrat que cal tenir present les diferències d'incidència entre Comunitats.



**Figura 1.3** Taxes mundials d'incidència de la tuberculosi, 2001 (OMS,2003b).

Des de la realització d'aquest projecte la TB ha disminuït de forma progressiva fins a l'actualitat. La davallada es situa al voltant del 40%, –disminució anual del 6.6%–, amb unes variacions entre les autonomies que oscil·len de l'augment d'un 20% a Aragó fins a la disminució d'un 54% a Catalunya (Balagué i cols.,2003). Segons un estudi darrerament publicat la disminució anual des de l'any 1991 fins 1999 seria lleugerament més petita del 3.3% (Caminero i cols.,2003). A Barcelona, la incidència actual es situa en el 32.7/100.000 hab. L'evolució que ha patit la TB a Barcelona en els darrers 12 anys ha estat clarament de descens



malgrat que no s'ha arribat a l'objectiu que es va fixar d'assolir una taxa del 12-13/100.000 hab., (ASP,2003. dada no publicada).

---

## **1.3 FACTORS SOCIALS, SANITARIS I ECONÒMICS ASSOCIATS A LA TUBERCULOSI**

### **1.3.1 La pobresa i el creixement de la població**

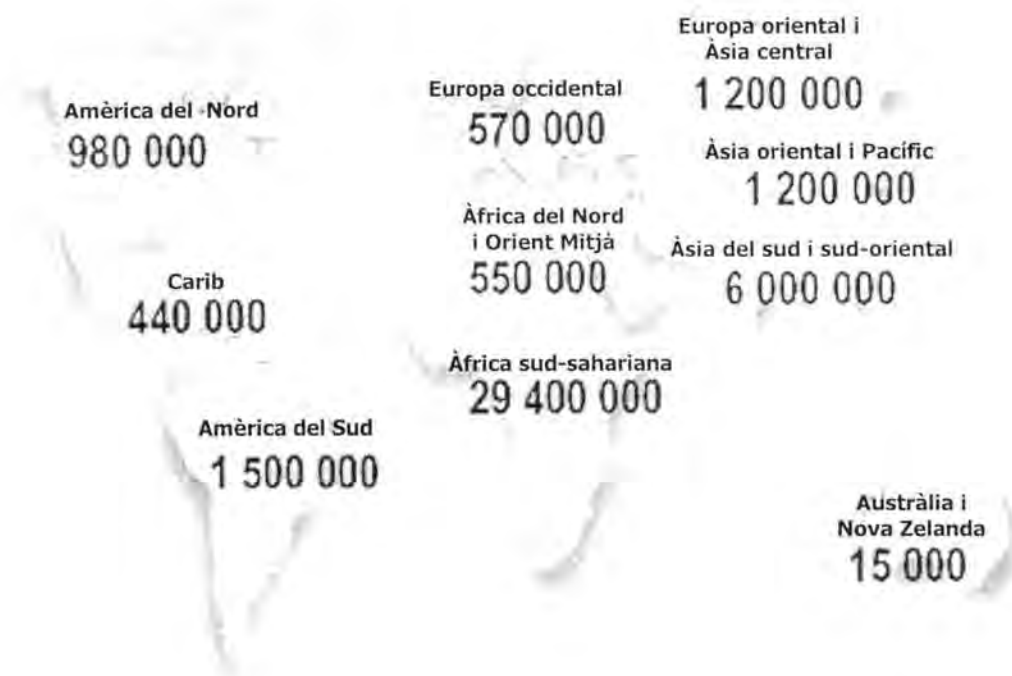
La relació entre la pobresa i la TB és històrica i directa. Si es superposen els mapes de la distribució de riqueses i de la incidència de la TB es pot observar que als llocs on aquesta última és més elevada encaixa amb les zones més pobres del planeta, és a dir, aquells països on la renda per càpita és més baixa presenten taxes de TB molt elevades, –l'exemple més clar és l'Àfrica sud-sahariana–. Cal tenir en compte, a més, que el condicionant econòmic no afecta solament als països més pobres sinó que també afecta a aquells segments de la població més empobrits dels països més rics. Així, a Europa occidental, als Estats Units i altres, les taxes de TB s'incrementen en aquella part de la població que presenta un nivell de recursos econòmics més baixos.

Un altre variable que cal considerar és el creixement demogràfic. Aquest comporta, en els països més pobres, un increment en les situacions de risc d'infecció, com l'amuntegament, i aguditza l'estat d'empobriment, factors que potencien la transmissió i, conseqüentment, augmenten el nombre de casos. Aquesta situació s'esdevé encara més important perquè és la característica comuna en els 22 països amb les taxes més elevades de TB.

### **1.3.2 La pandèmia del virus de la immunodeficiència humana**

L'augment de la incidència de la TB en aquests darrers anys està directament lligat a la pandèmia del VIH (apartats 2.3.2.4 i 2.7.2). Les últimes dades publicades indiquen que en tot el món hi ha 42 milions de persones, adults i nens, infectades amb el VIH/SIDA. Si tenim en compte el sexe, més de 19 milions d'infectats corresponen a dones i una mica més de 3 milions a nens menors de 15 anys. La mortalitat global en el darrer any va ser al voltant de tres milions de persones. A més, aproximadament poc més d'un terç de la població infectada pel VIH està coinfectada amb el bacil tuberculós i, al voltant del 70% d'ella viu a l'Àfrica sub-sahariana (TB/VIH,2002). La distribució del virus arreu del món és molt desigual (fig.1.4), però, pràcticament el 95% dels casos es localitzen en els països més pobres, fet que també succeeix amb la TB (fig.1.3). La situació més problemàtica, com passa també amb la TB, correspon a l'Àfrica sud-sahariana on el nombre estimat de casos és de quasi 30 milions de persones i on la

mortalitat assoleix la xifra de 2.5 milions. També és força preocupant el nombre d'infectats al sud-est asiàtic que ronda els sis milions amb una mortalitat de quasi 500.000 persones. La situació és totalment diferent en els països industrialitzats on les xifres disminueixen espectacularment (fig.1.4) (ONUSIDA/OMS,2002).



**Figura 1.4** Taxes mundials d'incidència del VIH/SIDA, 2002 (ONUSIDA/OMS,2002).

La introducció del tractament antiretroviral d'alta eficiència, el HAART (**H**ighly **A**ctive **A**ntiretroviral **T**herapy), l'any 1996 ha estat decisiu en el control de l'epidèmia en aquest països. Contràriament, aquesta teràpia resulta abusivament cara pels països en desenvolupament malgrat que són aquests els que presenten xifres de prevalença de la infecció més altes. Probablement, en aquests països la primera fita és controlar la transmissió establint i impulsant mesures concretes de prevenció (TB/HIV,2004).

El triangle que formen la TB, pobresa i VIH explica la situació sanitària catastròfica de grans zones del planeta. La recerca d'una solució a aquesta realitat implica afrontar el problema com una qüestió global no solament sanitària sinó també social, cultural i, essencialment, econòmica.

### **1.3.3 Els corrents migratoris**

L'increment de la diferència econòmica entre els països industrialitzats i en desenvolupament ha provocat que gran part de la població d'aquests últims hagi migrat cap a indrets més pròspers. El fenomen de la immigració és una de les variables responsable de què, en la majoria dels països industrialitzats, les taxes de TB no solament no hagin disminuït sinó que fins i tot hagin augmentat. El casos detectats de TB entre els immigrants supera en escreix el nombre de casos diagnosticats entre la població nativa (apartat 2.10.3.1.3). A més, les condicions en què viuen en el nou país, de més o menys marginació, dificulta l'accés al sistema sanitari establert i, conseqüentment, a la detecció i tractament dels casos. El que no està clar és si els immigrants porten la malaltia del seu país i, és en el nou on la desenvolupant, o es contagien aquí. Es possible que en proporció variable ambdues hipòtesis siguin certes. Actualment es realitzen estudis arreu per aclarir aquesta qüestió.

Un altre aspecte a destacar és el moviment massiu de població, dins del mateix país o països propers pobres o amb pocs recursos, per causes com la fam, sequera, i guerres entre altres. Les condicions en què aquestes grups de persones arriben i s'instal·len, –per exemple els camps de refugiats–, no garanteixen les mínimes mesures d'higiene, el que afavoreix encara més tant el desenvolupament de la malaltia entre els infectats com també la transmissió de la TB.

---

## **1.4 PROGRAMES DE CONTROL I LLUITA CONTRA LA TB. L'ESTRATÈGIA DOTS**

L'objectiu primordial de qualsevol PNT és establir les mesures oportunes per evitar la transmissió de la malaltia identificant i tractant la font de contagi, és a dir, la persona malalta. Essencialment, l'estratègia d'un PNT es recolza en dos punts fonamentals:

- a) el diagnòstic precoç i el tractament i curació dels casos (apartats 2.6 i 3.3), –detecció passiva–, especialment d'aquells que presenten bacil·loscòpia positiva,
- b) recerca entre els seus contactes per identificar els infectats o, també, els malalts, –detecció activa–, i tractar-los si està indicat (apartats 2.9 i 3.3).

La UICTMR, a finals de la dècada dels setanta, va considerar una prioritat potenciar la instauració d'uns PNT adequats amb la clara intenció de curar el màxim nombre de casos en les condicions més desfavorables. Amb aquesta finalitat va dissenyar un model pràctic d'intervenció fonamentat en una bona connexió entre els serveis clínics i els laboratoris, la utilització rutinària de la bacil·loscòpia com a prova de diagnòstic, un sistema pràctic d'informació i l'administració del tractament de forma supervisada. La dramàtica situació epidemiològica de la TB en el món



va provocar, com ja s'ha esmentat abans, que l'OMS declarés la TB com una emergència mundial a l'hora que es va potenciar la implantació de la anomenada estratègia DOTS arreu del món. Aquesta estratègia, fonamentada en els treballs de la UICTMR, presenta cinc punts essencials (OMS,1994,1999b). Breument:

a) recolzament i voluntat dels Governos dels diferents països per comprometre's en la lluita contra la TB, assegurant els recursos necessaris per a mantenir un mínim de persones encarregades de dur a terme el PNT i subministrar els fàrmacs pel tractament,

b) establir una xarxa mínima de laboratoris amb capacitat per fer bacil·loscòpies. Aquesta és l'eina bàsica de diagnòstic (apartat 2.6.2.1). A més, es considera important que no s'introdueixi cap altre mètode de diagnòstic fins que tota la població tingui accés a la bacil·loscòpia a l'hora que s'assegura la seva qualitat. Tot això amb l'objectiu final d'establir una xarxa de laboratoris dins del país a tres nivells: Nivell 1: amb capacitat de fer bacil·loscòpia, Nivell 2: amb capacitat de fer: bacil·loscòpia, –control de qualitat dels laboratoris del nivell 1–, cultiu i identificació, Nivell 3: laboratoris amb totes les possibilitats de diagnòstic que podrà ser diferent segons el país i, finalment, una extensa xarxa de centres perifèrics per recollir les mostres,

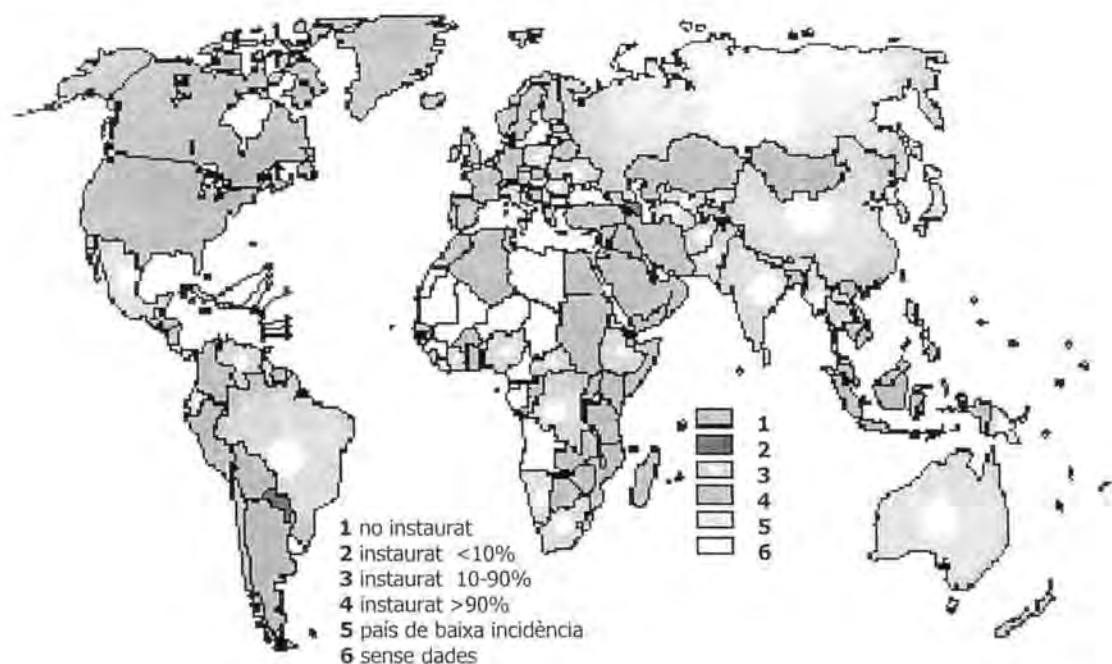
c) tractament estàndard amb DOT com a mínim durant els dos primers mesos (apartat 3.3). És l'eix i el punt més important en tota l'estratègia,

d) garantir el subministrament dels fàrmacs. Aquest és un dels problemes més importants en què es troben els països més pobres. La inestabilitat en el subministrament és una de les causes de fracàs del PNT,

e) elaboració i implantació d'un sistema de registre i informació. Això permet avaluar el PNT i controlar la despesa i la demanda de material i fàrmacs. És important que en el full de dades hi consti el tipus de tractament rebut i el resultat d'aquest.

Actualment, els objectius mundials fixats per l'OMS pel 2005 són: a) arribar a detectar el 70% dels casos i, b) tractar correctament el 85% d'ells. El nombre de països que apliquen l'estratègia DOTS s'ha estès de 10 l'any 1990, a 102 l'any 1997 fins els 155 l'any 2001. A finals d'aquest mateix any, el 61% de la població mundial vivia en països que aplicaven l'estratègia DOTS (fig.1.6). Els programes DOTS van notificar 2.4 milions de casos nous de TB dels quals 1.2 milions presentaven bacil·loscòpia positiva. El balanç actual és de 10 milions de malalts diagnosticats i tractats amb els programes DOTS des de l'any 1995. Tot i aquestes dades, el més d'un milió de malalts amb bacil·loscòpia positiva notificats representen només el 32% de la incidència estimada, i el ritme de progressió en la detecció de casos entre el 2000 i el 2001 no va ser molt més gran que la mitjana observada des de l'any 1995, amb un increment anual de 137.000 casos. En l'àmbit mundial els programes DOTS haurien de tractar a 360.000 malalts amb bacil·loscòpia positiva addicionals a l'any per poder aconseguir una detecció del 70% dels

casos a finals del 2005. En aquest sentit, a mida que els programes DOTS s'han estès geogràficament, la proporció de casos estimats detectats en les àrees DOTS s'ha mantingut constant entre el 40-50%. Respecte als 22 països que presenten la càrrega més elevada, la detecció de casos no s'acosta a l'esmentada fita del 70%.



**Figura 1.6** Distribució del DOTS a nivell mundial, 2001 (OMS,2003b).

El percentatge de tractaments satisfactoris sota l'estratègia DOTS en la cohort del 2000 va ser de mitjana del 82% i, a mesura que la població de malalts ha anat augmentant la xifra s'ha acostat a l'objectiu del 85%. En la regió d'Àfrica l'eficàcia terapèutica d'un 72% va ser força inferior a la mitjana. A finals del 2001 només 16 països havien assolit les fites de detecció i tractament dels casos i entre aquests l'únic amb càrrega elevada era el Vietnam.

D'aquestes dades es desprèn que si el ritme actual d'expansió de l'estratègia DOTS segueix així, l'any 2005 no s'haurà aconseguit assolir la fita de detectar el 70% dels casos. Cal doncs, millorar la localització dels casos en les àrees on hi ha programes DOTS i ampliar-ho a noves zones. Paral·lelament, per aconseguir el segon objectiu és necessari que alguns països, especialment de l'Àfrica sub-sahariana, millorin les taxes de curació actuals (OMS,2003b).

En els darrers anys, l'OMS ha introduït un nou concepte el DOTS-Plus com una estratègia complementària a l'estratègia DOTS. El DOTS-Plus té en compte aspectes concrets com ara l'ús de fàrmacs de segona línia en llocs on la prevalença de la TB MDR és elevada (OMS,2003c).



## LA TRANSMISSIÓ DE LA TUBERCULOSI

Si bé, ara és universalment acceptada la naturalesa infecciosa i contagiosa de la TB, aquesta evidència no ha estat tan clara al llarg de la història. Hipòcrates (460-370 a.C.) pensava que la TB era una malaltia hereditària mentre que Aristòtil (384-322 a.C.) la considerava de naturalesa contagiosa, opinió compartida, també, per un altre il·lustre metge Galè (129-200). Uns segles més tard, Heironymus Frascatorius (1478-1553) va exposar la contagiositat de la tisi i d'altres malalties en la seva obra *De contagione et contagiosis morbis* (1546), fonamentada en la teoria de la *seminaria contagiosum*. Durant el segle XVIII, la controvèrsia entre la teoria hereditària i la teoria que proclamava la naturalesa infecciosa i contagiosa de la TB era una qüestió geogràfica, doncs, en els països del nord i centre Europa s'inclinaven per la primera opció mentre que en els països mediterranis intuïen, cada vegada amb més força, que la TB era una malaltia transmissible de persona a persona. Les mesures de prevenció i control implantades, en aquests països, ho demostren. No va ser, però, fins l'última meitat del segle XIX que es va començar a acceptar la naturalesa infecciosa i transmissible de la

TB, gràcies als treballs de Villemin (1827-1892) i, sobretot, del microbiòleg alemany Robert Koch (1843-1910), el descobridor del bacil causant de la malaltia tuberculosa (Haas i Haas,1996).

---

## **2.1 BASES FÍSQUES DE LA TRANSMISSIÓ**

El concepte actual de la transmissió aèria de la TB es va desenvolupar durant els anys 1930-40 per Wells i cols., (1934, 1941, 1948). En general, per a què un agent infeccios sigui transmissible per via aèria és necessari que estigui suspès en l'aire. Segons les lleis físiques una goteta cau al terra amb una velocitat que és proporcional a la seva superfície o el quadrat del seu diàmetre. En un aire saturat d'humitat totes les gotetes, tret de les més petites, cauen a terra en menys de 10 segons des d'una altura de dos metres. Així doncs, els temps que les gotes més grans estan en l'aire és massa curt per a què puguin ser inhalades per una persona.

La característica més important de les gotetes és la seva tendència a evaporar-se. Aquest fenomen provoca la disminució de la seva mida, fet que és més ràpid com més petites són. El temps que les gotetes estan a l'aire insaturat és inversament proporcional al quadrat del seu diàmetre. Conseqüentment, aquest període és llarg per les gotes més petites, molt més del que seria necessari per a caure dos metres sense evaporació. Així, les gotes petites cauen lentament i s'evaporen quasi instantàniament mentre que les més grans cauen més ràpidament i arriben a terra sense haver perdut aigua de forma apreciable. Les corbes d'evaporació i el temps de caiguda, d'una alçada de dos metres en aire insaturat, són molt similars en forma però oposades en la direcció. La mida de les gotetes que arriben al terra es troba entre 0.1 i 0.2 mm, mentre que les més petites s'evaporen abans de tocar terra. Ara bé, l'evaporació fa disminuir la mida de les gotetes convertint-les en nuclis de gotetes, *-droplet nucleus-*. Wells (1934) va demostrar que la distància recorreguda per una goteta que cau abans de deixar de ser una goteta és proporcional al quadrat de la seva superfície o al seu diàmetre elevat a la quarta potència.

Hi ha altres factors com ara la temperatura i la humitat que també intervenen en aquesta situació. Davant d'un alt grau d'humitat, l'evaporació és menys important que amb un grau menor. Tot això comporta que les gotetes més petites tenen més probabilitat de caure en un aire humit que en un de sec. Ara bé, la velocitat de caiguda depèn dels factors humitat i temperatura en unes proporcions que fan que els petits canvis en la mida de les gotetes siguin més importants que els grans canvis de les condicions atmosfèriques.

## 2.2 MECANISME DE TRANSMISSIÓ DE *Mycobacterium tuberculosis*

Quan un malalt amb TB pulmonar tus, parla, esternuda o canta produeix i expulsa gotetes a l'aire, les quals poden contenir bacils tuberculosos (Loudon i Roberts, 1968). Aquests poden estar dins de gotes de mida inferior a la mida crítica de caiguda abans de l'evaporació. Així, les gotetes poden evaporar-se i arribar a la mida de nuclis de gotetes o partícules contagioses, que contenen un o més bacils tuberculosos, i que romandran suspesos en l'aire per un temps variable, depenent de les característiques de l'ambient. Aquestes partícules constitueixen la font principal de transmissió de *Mycobacterium tuberculosis*.

A més, per a què existeixi transmissió és necessari que les partícules contagioses tinguin un mida justa com per a què arribin als alvèols, a la perifèria dels pulmons. Les partícules més grans, generalment, o cauen ràpidament al terra o si són inhalades queden atrapades pel sistema mucociliar de l'arbre traqueobronquial, on són escombrades i eliminades. Sonkin (1951) va observar dues situacions, per una banda que la gran majoria de les partícules de mida superior a 5 µm de diàmetre quedaven atrapades en el nas, contràriament a les que eren inferiors a 0.1 µm que romanien suspeses en l'aire i eren capaces d'arribar fins als alvèols. A més, va observar que la retenció mucociliar d'aquestes partícules disminuïa al mateix temps que la seva mida. Així es pot parlar de diàmetres crítics que optimitzen la probabilitat d'inhalació i retenció de les partícules contagioses que provoquen la infecció. Aquest diàmetre s'ha mesurat entre 1 i 5 µm. Estudis experimentals successius van mostrar que en mamífers petits la quasi totalitat dels bacils tuberculosos inhalats com partícules aïllades arriben als alvèols i produeixen la resposta histològica anomenada granuloma (apartat 2.3.1) (Ratcliffe i Palladino, 1953).

Posteriorment, Riley i cols., (1957, 1959) van dissenyar una sèrie d'experiments amb la finalitat d'estudiar aquest fenomen. Les habitacions aïllades de malalts tuberculosos van ser connectades de forma acurada, controlada i calibrada a un altre habitació, on hi havia conills d'Índies sans, mitjançant un circuit tancat de ventilació. Així, els animals rebien l'aire contaminat dels malalts tuberculosos. El seguiment dels animals i la posterior anàlisi dels seus pulmons va confirmar el contagi, i va permetre a Riley calcular la dosi d'infecció –allò que ell va anomenar "*quantum* d'infecció"–, necessària per infectar un conill d'Índies, deduïent que, com a mitjana, hi havia un nucli de goteta contagiosa per cada 340 m<sup>3</sup> d'aire.



## **2.3 IMMUNOPATOGÈNIA DE LA TUBERCULOSI**

### **2.3.1 Patogènia**

El nombre de bacils tuberculosos necessaris per iniciar una infecció és desconegut, s'estima que de 5 a 200, però el fet de què hi hagi o no infecció i malaltia està directament relacionat amb la virulència dels bacils inhalats i l'activitat dels macròfags alveolars, la primera línia de defensa de l'hoste (Dannenberg, 1989). Així, el bacil tuberculós podrà:

- a) ésser immediatament eliminat: no infecció,
- b) restar adormit indefinidament dins de l'hoste: ITL,
- c) causar malaltia de seguida: TB primària, o
- d) activar-se i causar malaltia anys després de la infecció: TB secundària.

Els primers treballs sobre la patogènia de la TB van ser desenvolupats, fa més de trenta anys, per Lurie (1964). Aquest observà les alteracions tissulars i les reaccions immunològiques que la infecció provocava en els conills d'Índies que feia servir en els seus models experimentals. Donat que la TB en aquests animals és molt semblant a la humana, les seves observacions van permetre conèixer la seqüència d'esdeveniments que tenen lloc des de la inhalació de les partícules contagioses fins el desenvolupament de la malaltia.

S'han descrit quatre etapes per explicar tots aquests esdeveniments que comencen quan l'aire, que es mou per l'arbre traqueobronquial, diposita els bacils tuberculosos inhalats en els segments bassals del lòbul inferior, del lòbul mitjà o al segment anterior dels lòbuls superiors (Dannenberg, 1989):

*Etapa I.* Després de la seva inhalació els bacils tuberculosos són fagocitats pels macròfags alveolars, com fan amb altres partícules properes als alvèols, i són traslladats cap als nòduls limfàtics (nòduls hilar i mediastínic). Els bacils, llavors, o es multipliquen intracel·lularment, –el bacil tuberculós es divideix aproximadament cada 25 o 32 hores (ATS, 2000b)–, o bé són fagocitats i destruïts (o inhibits) dependent de les característiques del propi bacil i de la capacitat destructora dels macròfags. Els macròfags infectats alliberen factors quimiotàctics que atreuen més macròfags i monòcits que circulen cap el lloc de la infecció. A més, els macròfags que contenen bacils en multiplicació poden morir, alliberant més bacils i deixalles cel·lulars que alhora també poden atreure als monòcits.

*Etapa II.* Els bacils tuberculosos es multipliquen dins dels macròfags, –encara no activats específicament–, i són alliberats al medi extracel·lular quan es destrueixen aquests. En aquesta fase inicial de la lesió hi ha una baixa proporció de mort cel·lular. Això passa entre el setè i el vint-i-unè dia. La multiplicació del bacil es produeix de forma logarítmica. Aquesta

etapa de la infecció és anomenada, també, de simbiosi, doncs els bacils i els macròfags semblen viure en equilibri (Lurie, 1964).

*Etapa III.* Cap a les tres setmanes, es produeix el desenvolupament de la DTH, – base de la prova que permet evidenciar la infecció pel bacil–, i de la immunitat cel·lular. Ara, els macròfags alveolars activats per citoquines i quimioquines produïdes pels limfòcits T, demostren un increment en la capacitat destructora intracel·lular del bacil (Lurie, 1964). Com a resultat d'aquest fet el nombre de micobacteris decreix alhora que es produeix un increment de macròfags morts, degut al propi bacil i/o els productes tuberculínics alliberats per ell (Lurie, 1964). El resultat de tot aquest procés és la formació del tubercle o granuloma, una de les característiques patològiques més important de la TB.

Els granulomes són estructures organitzades de macròfags transformats morfològicament en cèl·lules epitelioides i cèl·lules gegants de Langhans envoltades per limfòcits i capil·lars (Lurie, 1964). Els granulomes presenten una zona central necrosada, el *caseum*. Aquest té molt poca consistència, és avascular, i és un ambient extracel·lular àcid i anòxic que inhibeix el creixement bacil·lar i la funció macròfaga. Al voltant d'aquesta formació s'hi troben macròfags activats que destrueixen els bacils i fagociten les deixalles, així com d'inactius que moren i són afegits al centre caseós. Tant la mort cel·lular com el dany tissular són deguts a la DTH. Un centre caseós petit, 0.1-3.0 mm de diàmetre, pot ser eliminat pels macròfags propers. Centres més grans, 2-8 mm, són probablement dissolts pels enzims hidrolítics extra i intracel·lulars i són substituïts per teixit fibrós. Els centres més grans d'entre 5-20 mm són revestits per un encapsulat fibrós i d'aquesta manera aïllats dins de l'hoste (Dannenberg, 1989). Els granulomes que, posteriorment, es calcifiquen poden detectar-se en una radiografia quan tenen una mida suficient. Es parla de *focus de Ghon* davant d'una lesió única i petita situada en la perifèria del pulmó, típicament, en la part inferior dels lòbuls superiors o en la part superior dels lòbuls inferiors. Els bacils tuberculosos, lliures o bé sobrevivint dins dels macròfags, poden arribar als nòduls limfàtics traqueobronquials. Es parla de *complex primari de Ghon* quan es combina una lesió calcificada en el pulmó i un altre en el nòdul hilar. Aquest complex molt sovint és l'única evidència de la infecció. Tots aquests esdeveniments defineixen la TB primària, és a dir, la infecció en una persona que no ha tingut contacte previ amb el bacil *M. tuberculosis*. En nens, la TB primària pot progressar cap a malaltia però el més comú és que la infecció s'aturi aquí.

Malgrat que la infecció tuberculosa primària és controlada pel sistema immunitari, el bacteri no és eliminat, i roman en els granulomes en estat latent durant la vida de la persona. Les evidències suggereixen que la infecció tuberculosa latent és un procés dinàmic hoste-patogen en el que el granuloma serveix per immobilitzar el bacil que és viable i actiu metabòlicament, encara que a un ritme més lent (Wayne, 1994, Parrish i cols., 1998).

*Etapa IV.* En aquest punt, el material caseós es liqua transformant-se en un excel·lent medi de cultiu per els bacils que es multipliquen per primera vegada de forma extracel·lular. La liquació es deguda a la hidròlisi de les proteïnes, lípids i àcids nucleics que constitueixen el material caseós, mitjançant els enzims hidrolítics dels macròfags (Dannenberg i Sugimoto, 1976). Igual que la casificació, el fenomen de la liquació també està associat a la DTH (Yamamura, 1958). L'acció continuada de la DTH provoca la destrucció de les parets bronquials i, conseqüentment, la formació de cavitats. La infecció, ara, s'estén per altres zones dels pulmons, –disseminació–, a través dels vasos limfàtics, sanguinis i dels bronquis. El mecanisme pel qual s'inicia la líquefacció en cada cas és desconegut.

Tots aquests esdeveniments defineixen la TB secundària o reactivació. La reactivació pot passar en qualsevol moment després de la infecció primària i, generalment, comença en els segments apicals i posteriors d'un o dels dos lòbuls superiors, probablement, perquè és on hi ha una concentració d'oxigen més alta. La reactivació d'una infecció latent pot passar com una resposta a alteracions del sistema immune, com és el cas dels malalts immunodeprimits pel VIH (apartat 2.7.2).

A més, la TB és una malaltia local, on cadascuna de les lesions, es comporta com si les altres no hi fossin. Així, les lesions d'una àrea del pulmó poden progressar mentre que les lesions d'altres zones romanen estables (Dannenberg, 1989).

La immunitat cel·lular és una resposta beneficiosa, caracteritzada per la expansió d'una població específica de cèl·lules T que estimulades per antígens produeixen citoquines de forma local. Aquestes, aleshores, atreuen a monòcits del corrent sanguini cap dins de la lesió, activant-los. La DTH és un procés immunològic similar a l'esmentat on també intervenen cèl·lules T i citoquines. Malgrat tot, la DTH desencadena una resposta patològica que inclou la formació de granulomes, la calcificació, la casificació necròtica i la cavitació. La relació entre la immunitat cel·lular i la DTH és, doble, positiva/negativa, contribuint a l'eliminació de *M. tuberculosis* i, a la vegada, provocant la destrucció tissular.

## **2.3.2 Mecanismes immunològics**

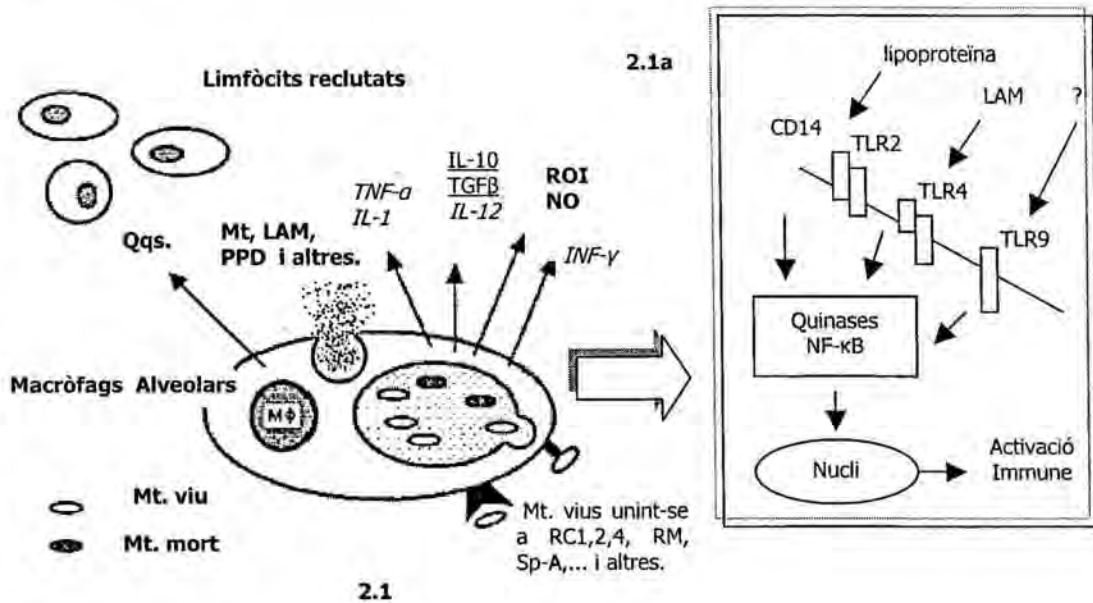
### **2.3.2.1 El macròfag alveolar i *Mycobacterium tuberculosis***

La defensa de l'hoste contra *M. tuberculosis* té com element principal el macròfag. Aquesta cèl·lula és capaç, per un costat, d'inhibir el creixement del bacil mitjançant la fagocitosi i, per l'altre, participar en el procés de presentació d'antigen i l'estimulació dels limfòcits T.

La unió bacil-macròfag pot tenir lloc per diversos sistemes i s'han identificat diferents receptors: CR (Complement Receptors)-1, CR3, i CR4 amb o sense opsonització prèvia; RM



(Receptor de Manosa); CD14; classe A del receptor *scavenger*; receptors Fc $\gamma$ ; Sp-A (*Surfactant protein-A*) (Ernst, 1998); i molècules de la superfície micobacteriana implicats/des en la endocitosi del bacil tuberculós pels macròfags i les cèl., dendrítiques (Ehlers i Daffe,1998). Les diferents vies d'entrada de *M. tuberculosis* poden conduir a diferències en els senyals de transducció, activitat immune i, fins i tot, supervivència intracel·lular del bacil (van Crevel i cols., 2002) (fig.2.1).



**Figures 2.1** Interaccions entre *M. tuberculosis* i els macròfags. **2.1a** Paper dels receptors *toll-like* en l'estimulació i activació de la resposta immune. (Citoquines desactivadores, Citoquines activadores, Qqs: Quimioquines) (Adaptat de: Fenton i Vermeulen, 1996, van Crevel i cols., 2002).

El procés de la fagocitosi genera unes vesícules endosomals. Alguns antigens micobacterians queden retinguts en aquestes vesícules, altres com el LAM (**LipoArabinoManano**), –un glicolípid de la paret micobacteriana (apartat 1.1)–, i els PPD secretats pels bacils són alliberats pels macròfags infectats. Aquests interaccionaran amb altres macròfags i/o receptors activant-los (fig.2.1) (Fenton i Vermeulen, 1996). Un cop fagocitats i fusionats amb els lisosomes, –formació dels fagolisosomes–, els bacils són degradats pels enzims intralisosomals i les hidrolases, i/o directa o indirectament per l'efecte àcid d'aquestes (Flynn i Chan, 2001). *Mycobacterium tuberculosis* és capaç d'evitar la mort intracel·lular alcalinitzant el fagosoma (Gordon i cols.,1980), inhibint la fusió fagosoma-lisosoma (Goren i cols.,1976) o escapant del fagosoma (McDonough i cols.,1993). D'aquesta manera els bacils poden romandre viables dintre dels fagosomes, situació que defineix la ITL.

És clar que els macròfags són els elements principals implicats en la mort de *M. tuberculosis*, però, per fer-ho, necessiten ser activats. En aquesta activació sembla que hi estan implicats les citoquines IFN- $\gamma$  (**I**nter**F**ero**N**- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$  (**T**umor **N**ecrosis **F**actor- $\alpha$ ) (apartat 2.3.2.2), i probablement, el metabolit actiu de la vitamina D, la hidroxivitamina D<sub>3</sub>-1,25 (apartat 2.7.6.3). Els mecanismes per destruir els bacils després de la fusió fagosoma-lisosoma inclouen la generació de ROI (**R**eactives **O**xxygen **I**ntermediaries), –com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>–, i de RNI (**R**eactives **N**itrogen **I**ntermediaries), –especialment NO, NO<sub>2</sub>, i HNO<sub>2</sub> (Schluger i Rom, 1998, Flynn i Chan, 2001)–. Malgrat que no es disposen de moltes dades, és probable que els micobacteris produeixin substàncies que inactivarien els reactius oxigen o bé n'elaborarien d'altres que induirien la transcripció d'alguns gens com el iNOS (inducible **N**itric **O**xide **S**ynthase) que els permetria escapar de la defensa inicial de l'hoste (Wayne, 1994).

Paral·lelament a la fagocitosi, el reconeixement de *M. tuberculosis* o dels seus productes és un punt molt important per una resposta immunitària efectiva. Els receptors TLR (**T**oll-**L**ike **R**eceptors) són filogenèticament mediadors conservats de la immunitat innata, i són indispensables pels macròfags i cèl·lules dendrítiques en el reconeixement dels microorganismes (Visitin i cols., 2001). Els TLR són proteïnes transmembranals amb un domini extracel·lular i un altre citoplasmàtic. Aquest últim és homòleg al domini activador del receptor de la IL-1 (**I**nter**L**euquina)-R, el que fa pensar que ambdós comparteixen una ruta comuna de transmissió de senyal que comporta l'activació de quinases MAP (**M**itogen-**A**ctivated **P**rotein)-kinases i del factor de transcripció nuclear NF- $\kappa$ B, que induirà una resposta inflamatòria en els macròfags (fig.2.1a) (Heldwein i Fenton, 2002). Els TLR s'expressen tant en els macròfags com en la superfície dels fagosomes, d'aquesta manera la resposta immunitària s'activa amb o sense fagocitosi (van Crevel i cols.,2002). Es poden trobar diferents tipus de TLR relacionats amb el reconeixement de *M. tuberculosis* o de fragments d'ell (taula 2.2).

**Taula 2.2** Principals receptors *toll-like* implicats amb la TB

Receptor <i>toll-like</i>	Interacció	Acció que provoca
<b>TLR-2</b>	Lipoproteïna 19kDa, STF	$\Delta$ producció de TNF- $\alpha$ Indueix IL-8
<b>TLR-4</b>	<i>M. tuberculosis</i> , LAM	Indueix INF- $\beta$ , RANTES
<b>TLR-9</b>	genoma micobacterià (?)	-

(Adaptat de: Schluger i Rom,2001, Heldwein i Fenton,2002) ( $\Delta$ : augment, STF: **S**oluble **T**uberculosis **F**actor).

Els treballs desenvolupats sobre aquestes tipus de receptors demostrant que diferents TLR poden induir respostes diferents en el mateix tipus cel·lular, com també, el mateix tipus de TLR pot induir respostes diferents segons el tipus de cèl·lula estimulada (Heldwein i Fenton, 2002).

### 2.3.2.2 Citoquines i quimioquines

La resposta immunitària de tots els patògens és, en part, depenent de les citoquines, les quals regulen totes les cèl·lules del sistema immunitari. El reconeixement de *M. tuberculosis* pels macròfags condueix a l'activació de la cèl·lula i a la producció de citoquines (taula 2.3).

**Taula 2.3** Principals citoquines implicades en la resposta immunitària a la TB

Citoquina	Funció amb què se la relaciona	Què indueix la seva síntesi / tipus cel·lular que la produeix
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	$\Delta$ la producció de ROI i RNI (NO) Cq., proinflamatòria	<i>M.tuberculosis</i> , PPD / Produït pels limfòcits CD4+ (Th1)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Formació del granuloma Indueix la NOS Cq., proinflamatòria Indueix l'apoptosi	PPD (20,44,58,64kDa), Ag30kDa, LAM, <i>M.tuberculosis</i> / Produït pels mfgs, cèl., dendrítiques, monòcits
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Desactivació de mfgs. Suprimeix la resposta de les cèl., T Inhibeix la producció de IFN- $\gamma$ Produeix dany tissular i fibrosi	<i>M.tuberculosis</i> , LAM, PPD, 30kDa / Produïda pels monòcits, cèl., dendrítiques
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Activació de mfgs.	PPD (de 20 a 46kDa), LAM / Produïda pels mfgs, cèl., dendrítiques, monòcits
<b>IL-2</b>	Activació de cèl., T Activació de mfgs.	Produïda pels limfòcits CD4+
<b>IL-4</b>	Desactivació de mfgs. Inhibeix la producció de IFN- $\gamma$	Produïda pels Th2
<b>IL-6</b>	Cq., pro i antiinflamatòria	Produïda pels mfgs, cèl., dendrítiques
<b>IL-10</b>	Desactivació dels mfgs. Cq., antiinflamatòria Inhibeix la resposta dels CD4+	30kDa, LAM / Produïda pels mfgs, cèl., T
<b>IL-12</b>	Diferencia subtipus CD4+, Th1/2 Indueix IFN- $\gamma$	<i>M.tuberculosis</i> / Produïda pels mfgs.
<b>IL-18</b>	Estimulació d'altres Cqs., Qqs., i Factors de transcripció	Produïda pels mfgs, cèl., dendrítiques

(Adaptat de: Toossi i Ellner,1998, Flynn i Chan,2001, van Crevel i cols.,2002) ( $\Delta$ : augment, Cq: Citoquina, mfg: macròfags, TGF $\beta$ : Transforming Growth Factor  $\beta$ , Qq: Quimioquina).

El paper d'aquestes en la infecció tuberculosa és molt important i complexa. La seva acció pot potenciar, inhibir o cooperar amb altres citoquines. Els mecanismes per induir i

amplificar els circuits de les citoquines durant la infecció tuberculosa semblen inherents al propi *M. tuberculosis*, els seus components i el seu estat metabòlic (Flynn i Chan, 2001). Fins i tot, en un moment concret del procés, dins dels granulomes, l'efecte acumulatiu de *M. tuberculosis* i els seus metabolits en resposta a les cèl·lules de l'hoste i, en particular, a les citoquines determina l'èxit del sistema immunitari per controlar el creixement micobacterià. En aquest sentit, el balanç *in situ* de citoquines activadores-desactivadores dels macròfags és crític (Toossi i Ellner, 1998).

Les citoquines quimiotàctiques, les quimioquines, són responsables de l'atracció de cèl·lules inflamatòries cap al lloc de la infecció. La inhibició de la producció de les quimioquines pot significar una resposta tissular local insuficient, encara que, degut a què els efectes de les quimioquines es solapen amb les altres, la contribució de les quimioquines individuals és difícil d'avaluar (van Crevel i cols., 2002).

La taula 2.4 resumeix les principals quimioquines implicades en la resposta a la TB.

**Taula 2.4** Principals Quimioquines implicades en la resposta a la TB

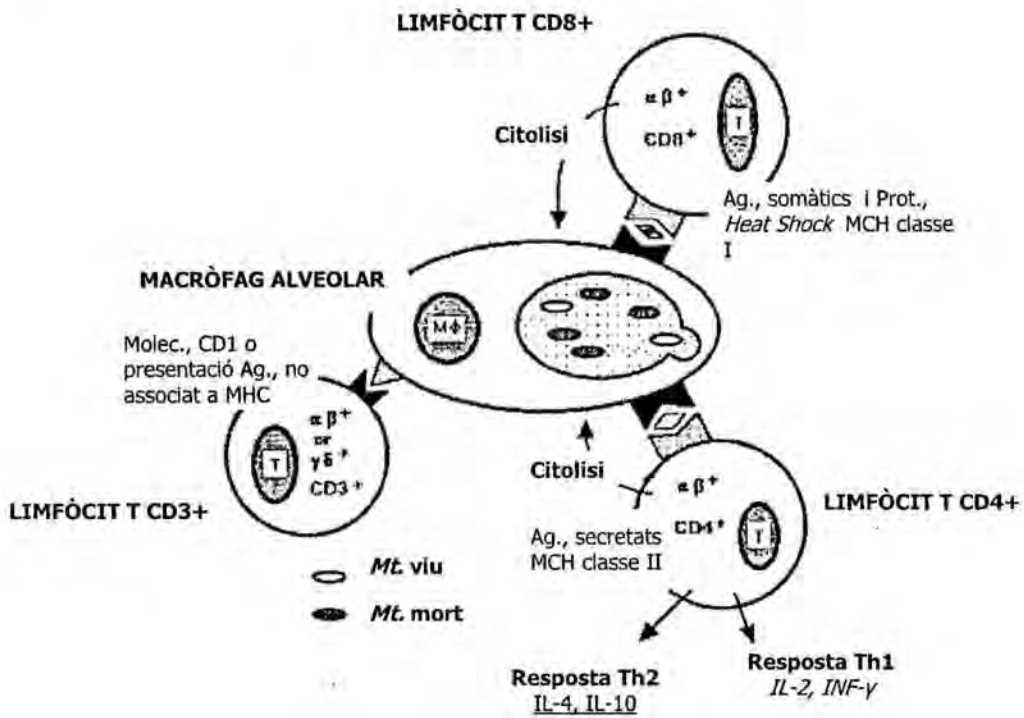
Quimioquina	Funció amb què se la relaciona	Què indueix la seva síntesi / tipus cel·lular que la produeix
<b>IL-8</b>	Atrau neutròfils, limfòcits T	<i>M. tuberculosis</i> / mfg
<b>IP-10</b>	-	<i>M. tuberculosis</i>
<b>MCP-1</b>	-	<i>M. tuberculosis</i> / Produïda pels mfgs, Th2
<b>MIP-1 <math>\alpha</math> i <math>\beta</math></b>	Activació i proliferació de cèl., T i mfgs. Inhibeix el creixement intracel·lular	<i>M. tuberculosis</i> , fragments de la membrana / Produïda pels mfgs
<b>RANTES</b>	Activació i proliferació de cèl., T i mfgs. Inhibeix el creixement intracel·lular Formació del granuloma	<i>M. tuberculosis</i> / Produïda pels Th1

(Adaptat de: van Crevel i cols.,2002, Saukkonen i cols.,2002) (mfg: macròfag, IP-10: Induce Protein, MCP-1: Monocyte Chemotactic Protein, MIP-1: Macrophage Inflammatory Protein).

### 2.3.2.3 Interacció entre el macròfag i els limfòcits T

L'altre punt important en la resposta immunològica són les interaccions entre els limfòcits T i els macròfags infectats per *M. tuberculosis*. Com un procés més de la infecció els antígens micobacterians són processats i presentats pels macròfags. Els pèptids derivats de la secreció de proteïnes dels bacils viables processats en el fagosoma són reconeguts pels limfòcits T CD4+ associats a MHC de classe II, mentre que els antígens derivats de proteïnes *heat shock* i proteïnes somàtiques, processades en el citosol, són reconegudes pels limfòcits T CD8+

associats a MHC de classe II (fig.2.5) (Fenton i Vermeulen, 1996). Ambdós tipus cel·lulars poden arribar a ser citotòxics pels macròfags que presenten els antígens (Tan i cols., 2000). En aquest context, estudis recents semblant indicar que les cèl·lules T podrien també actuar en la eliminació de *M. tuberculosis*, especialment en el granuloma, on les cèl·lules T citotòxiques i les cèl·lules *Natural Killer* contenen una molècula, granulysin, que pot alterar directament la integritat de la membrana micobacteriana i, conseqüentment, eliminar el bacil (Stenger i cols., 1998).



**Figura 2.5** Interaccions entre els macròfags infectats amb *M. tuberculosis* i els limfòcits T. (Citoquines desactivadores; Citoquines activadores). (Adaptat de: Fenton i Vermeulen,1996).

El procés de presentació d'antigen només provoca estimulació en les cèl·lules T en presència de senyals coestimuladors (van Crevel i cols., 2002). Els més estudiats són el B-7.1 (CD80) i el B-7.2 (CD86). Aquestes molècules s'expressen a macròfags i cèl·lules dendrítiques i s'uneixen a les limfòcits T mitjançant les molècules CD28 i CTLA (CytoToxic Lymphocyte Antigen)-4, respectivament.

Les cèl·lules T CD4+ poden presentar-se en dos subtipus Th (T helper)-1 i el Th2. La diferència entre ambdues és la secreció de diferents citoquines, IL-2 i IFN- $\gamma$  per les cèl·lules Th1, i IL-4, IL-5 i IL-10 per les cèl·lules Th2 (Schluger i Rom.,1998). La principal funció de les cèl·lules CD4+ Th1, a part de la presentació d'antigen, és produir IFN- $\gamma$  i d'altres citoquines



suficients per activar macròfags i poder controlar i/o eliminar els micobacteris intracel·lulars. Sembla que els CD4+ podrien controlar la infecció mitjançant processos d'apoptosi i/o lisi de les cèl·lules infectades pels bacils (Balcewicz-Sablinska i cols.,1998). L'apoptosi d'aquestes cèl·lules redueix la viabilitat del micobacteri intracel·lularment mentre que el procés de necrosi no ho aconsegueix (Molloy i cols.,1994). Paral·lelament, *M. tuberculosis* pot inhibir l'acció dels limfòcits CD4+ per un d'aquest mètodes (Flynn i Chan, 2001): a) disminuint l'habilitat dels macròfags infectats de presentar antígens, b) infraexpressant en la superfície cel·lular molècules de MHC de classe II, c) produint certes citokines TGF $\beta$  i IL-10, que afectarien directa o indirectament la proliferació i la funció de les cèl·lules T.

El paper que tenen les cèl·lules CD8+ resta encara poc clar, però sembla que el fet de què s'hagi detectat bacils en el citoplasma dels macròfags i que la presentació d'antigen a les cèl·lules CD8+ sigui en el context MHC classe I, –que és molt eficient amb antígens del citoplasma–, fa pensar en la participació dels limfòcits CD8+ en la resposta a la infecció per *M. tuberculosis*. Les funcions que durién a terme són la lisi directa de les cèl·lules infectades i la producció de citokines principalment IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  (Flynn i Chan, 2001).

Un altre tipus cel·lular implicat en la resposta a la infecció tuberculosa són les cèl·lules T restringides a CD1, sovint són CD4<sup>-</sup> i CD8<sup>-</sup> o CD8+, o no presentadores d'antigen en el context del MHC. Aquests tipus cel·lulars reconeixen antígens micobacterians no peptídics, –tipus LAM, àcids micòlics i altres–, amb les molècules no polimòrfiques MHC classe I com el tipus I CD1 (-a, -b, i -c) (Porcelli i Modlin,1999). Aquest mecanisme de presentació d'antigen potencia l'activació d'una fracció molt important de cèl·lules T abans que la presentació d'antigen específic s'hagi desenvolupat (van Crevel i cols., 2002).

L'expressió de molècules presentadores d'antigen és un procés dinàmic i està regulat per citokines (van Crevel i cols.,2002). Mentre que les citokines proinflamàtores (per ex: INF- $\gamma$ ) estimulen l'expressió de molècules MHC, les citokines antiinflamàtores les inhibeixen. En aquest sentit, els micobacteris poden influir sobre l'expressió de les molècules MHC modulant la producció de citokines pro o antiinflamàtores evitant així l'efecte que aquestes provoquen sobre elles.

#### **2.3.2.4 Immunopatogènia en els malalts VIH positius**

El VIH infecta específicament els limfòcits CD4+ i els macròfags, provocant una reducció i disfunció progressiva d'aquestes cèl·lules. Aquestes condicions faciliten el desenvolupament de la TB pulmonar primària, la disseminació hematogènica del bacil a lloc extrapulmonars, i un augment de la freqüència de reactivació de la malaltia prèvia (Lawn i cols., 2002). A més, els efectes adversos que causa la infecció pel VIH són més importants en els llocs infectats pels

bacils tuberculosos així com en els granulomes perquè creen un microambient on és fàcil que el virus es propagui.

Les alteracions histològiques observades en els teixits procedents de malalts TB coinfectats amb el VIH varien en funció del grau d'immunosupressió que pateixen (Lucas i Nelson,1994). A mida que s'avança en l'estat d'immunodepressió les alteracions que s'observen són: disminució de les cèl·lules gegants de Langhans; disminució en la diferenciació dels macròfags en cèl·lules epitelioides; disminució en l'activació dels CD4+; desestructuració i disminució de la formació del granuloma, i limfocitopènia dels CD4+.

La infecció pel VIH redueix la resposta cel·lular a la infecció tuberculosa principalment interferint en l'activació i el funcionament de les cèl·lules claus en la TB, els macròfags i els limfòcits CD4+ (Lawn i cols.,2002). No hi ha evidències epidemiològiques de què el VIH augmenti les taxes d'infecció tuberculosa després de l'exposició i, aquest fet fa pensar que el virus no causa una deterioració dels macròfags. És molt probable, però, que alguna disfunció macròfaga pugui contribuir en les alteracions en la relació macròfags-limfòcits T.

L'activació immune associada amb la TB indueix la replicació del VIH tant a nivell *in vitro* (Zhang i cols.,1995) com *in vivo* (Goletti i cols.,1996), provocant un augment de la càrrega viral en els malalts coinfectats, pèrdua de cèl·lules CD4+, –la infecció pel VIH causa, per ella mateixa, una limfocitopènia progressiva–, i supressió de la regeneració i maduració dels limfòcits (Lawn i cols., 2002).

La taula 2.6 resumeix alguns dels efectes i conseqüències que provoca la coinfecció VIH/TB.

**Taula 2.6** Impacte de la infecció VIH en la resposta immunitària a la TB

Efecte	Conseqüència
(hipotètic) ↓ RM	↓ la unió <i>M.tuberculosis</i> -macròfags
(hipotètic) ↓ fagocitosi	↓ processar Ag., ↓ presentació Ag., ↓ eliminació <i>M. tuberculosis</i>
↓ receptors CD4, i inhibició expressió IL-2 i IL-2R	bloqueig de la resposta proliferativa de limfòcits T
Δ TNF-α	Δ apoptosi
↓ síntesi IL-2, IL-12, INF-γ, i Δ IL-4, IL-10	↓ funció macròfaga
Δ TNF-α, ↓ IL-12	Inhibició INF-γ
↓ lligam CD40, ↓ activitat CD40R	↓ IL-12
↓ IFN-γ, Δ TNF-α, i TGFβ	Δ disseminació

(Adaptat de: Lawn i cols.,2002) (↓: disminució, Δ: augment, Ag: Antigen).

La infecció VIH causa disfuncions en els mecanismes per constituir i establir els granulomes provocant la progressió o la reactivació de la infecció. Durant el procés de formació, els efectes són la disminució de/s: la quimiotaxis, les funcions bactericides dels macròfags i les cèl·lules Th1 productores INF- $\gamma$ .

Respecte a l'estabilitat del granuloma els efectes de la infecció pel VIH són: la disminució sistemàtica de les cèl·lules mononucleades utilitzades pel manteniment de l'estructura i la funcionalitat del propi granuloma i les mateixes cèl·lules infectades pel virus. Conseqüentment és produeix una disfunció cel·lular, un incrementa de l'apoptosi i del reclam cel·lular (Lawn i cols.,2002).

---

## **2.4 FACTORS ASSOCIATS A LA TRANSMISSIÓ DE *M. tuberculosis*: INFECTAR-SE**

Comparada amb altres malalties transmeses per partícules infectives inhalatòries, el procés de transmissió de la TB és normalment poc eficaç (Enarson, 1994). La probabilitat de transmissió varia segons diferents factors, com ara el nombre de microorganismes expulsats a l'aire, la seva virulència, estar o no en tractament, la ventilació i circulació de l'aire, la mida de l'estança, el nombre de persones susceptibles que estan en contacte amb el malalt, el tipus de contacte que tenen, la duració de l'exposició als bacteris entre altres. Quants més factors es donin junts més probabilitat existeix de contagi i per tant més probabilitat d'infectar-se. L'estudi dels factors es pot fer des de tres punts:

- a) Respecte al *malalt*: transmissor de la malaltia,
- b) Respecte a l'*entorn*: l'ambient que envolta al malalt i el seu contacte,
- c) Respecte al *contacte*: la persona susceptible i receptora de la malaltia.

### **2.4.1 Respecte al malalt: transmissor**

S'estima que per a mantenir el cicle epidemiològic, cadascun dels malalts tuberculosos contagiosos hauria d'infectar com a mínim a 20 persones, per a què un d'ells desenvolupés, en qualsevol moment de la seva vida, una TB pulmonar bacil·lífera i es mantingués així l'endèmia (Rieder i cols.,1989). En la valoració de la infectivitat del malalt tuberculós cal tenir en compte els següents paràmetres:



### **2.4.1.1 Localització i extensió de la malaltia**

Tot i que s'han descrit múltiples fonts possibles de contagi com ara: cutània (Frampton, 1992), genitourinària (Gokce i cols.,2002), congènita (Cantwell i cols.,1994), per trasplantament d'òrgans infectats (Gottesdiener,1989), en autòpsies (Lundgren i cols.,1987), entre altres, la principal font de contagi és la via aèria a partir de malalts capaços de produir partícules contagioses. Aquest fet, delimita el potencial de transmissió als malalts amb TB localitzada en el tracte respiratori: TB pulmonar o de laringe (Braden i cols.,1995).

La infectivitat del malalt tuberculós també està correlacionada amb l'extensió radiològica de la TB, –unilateral o bilateral–, la presència de cavitacions i la presència de lesions en els vies aèries superiors (Loudon i Spohn,1969a).

### **2.4.1.2 Mecanismes generadors de partícules contagioses**

Existeix una gran varietat de factors que contribueixen al grau d'infectivitat d'un malalt: la freqüència de tos (Loudon i Spohn,1969a); si la persona es tapa la boca quan estossega; la quantitat de temps que el malalt contagiós està parlant o estossegant o, fins i tot, cantant (Loudon i Roberts, 1968). Aquestes són activitats que incrementen considerablement la producció de partícules infectives. S'ha calculat que tossir un sola vegada genera la mateixa quantitat de partícules contagioses, –entre 0 i 3500 partícules–, que cinc minuts de conversa en veu alta (Loudon i Spohn,1969a, Riley i O'Grady,1961) i, a més, la meitat d'aquestes resten suspeses en l'aire 30 minuts després d'haver-se produït l'estossec (Loudon i Roberts, 1967).

### **2.4.1.3 Valor de la bacil·loscòpia**

El nombre de bacils presents en les mostres d'esput està relacionat amb el potencial de contagiositat que té el malalt. Les persones que tenen bacil·loscòpia positiva expectoren entre  $10^5$ - $10^7$  bacils/ml d'esput mentre que les que són bacil·loscòpia negativa expulsen  $< 10^4$  bacils/ml d'esput (Yeager i cols.,1967) (apartat 2.6.2.1). Entre tots els treballs que han estudiat el tema s'han destaquen tres: Shaw i Wynn-Williams,1954, van Geuns i cols.,1975, Grzybowski i cols.,1975. En aquests s'avalua la contagiositat dels malalts tuberculosos en tres situacions diferents: a) bacil·loscòpia i cultiu positiu, b) bacil·loscòpia negativa i cultiu positiu, i c) bacil·loscòpia i cultiu negatiu. Globalment, tots ells observen el mateix fet, que els malalts amb bacil·loscòpia positiva són els més contagiosos, molt més que els casos amb bacil·loscòpia negativa i cultiu positiu. Per tant, la font d'infecció més important per la comunitat és el malalt tuberculós que té una bacil·loscòpia positiva. Aquesta evidència, però, no implica que els

malalts amb bacil·loscòpia negativa no siguin contagiosos, i de fet estudis epidemiològics clàssics (Vidal i cols.,1997) i, darrerament, moleculars (Behr i cols.,1999) han demostrat la transmissió entre casos amb bacil·loscòpia negativa, en el moment del diagnòstic, i els seus contactes.

#### **2.4.1.4 Efecte del tractament**

El tractament de la TB disminueix el grau de contagiositat (apartat 3.2). Tradicionalment, en la pràctica clínica, s'ha considerat que amb dues setmanes de tractament n'hi ha prou per a què un malalt tuberculós deixi de ser contagiós. La base d'aquesta doctrina neix d'uns estudis realitzats a Madràs, Índia, en la dècada dels seixanta (Ramakrishnan i cols.,1961, Kamat i cols.,1966). L'objectiu d'aquests va ser estudiar la proporció d'infectats de TB entre els contactes més propers de casos índexs tractats durant un any amb INH i PAS. Als malalts tuberculosos se'ls hi va assignar aleatòriament, o rebre el tractament a casa o bé a l'hospital i, els seus contactes, –uns 260 per cadascuna de les dues opcions–, van ser seguits durant 5 anys. El control dels contactes consistia en una radiografia de tòrax i el PPD cada tres mesos durant el primer any i cada sis durant la resta del període de seguiment. No hi va haver cap diferència entre els contactes inicialment PPD negatius segons si els seus casos índexs havien estat tractats a casa o bé a l'hospital. Aquests resultats van suggerir que la transmissió té lloc abans de començar la teràpia i que, per tant, es pot assumir que és segur que el malalt torni a casa quan rep tractament. Aquesta mateixa qüestió va ser estudiada posteriorment per altres autors (Brooks i cols.,1973, Abeles,1973, Gunnels i cols.,1974, Riley i Moodie,1974). Els resultats de tots aquests treballs semblen orientar, que no confirmar, que després d'unes setmanes de tractament el malalt esdevé no contagiós. El principal inconvenient que presenten aquests estudis és que un mínim del 29% (Gunnels i cols.,1974) i un màxim del 65% (Kamat i cols.,1966) dels contactes avaluats estaven ja infectats en el moment del diagnòstic i d'inici del tractament dels seus casos índexs (apartat 2.5.3.3). A més, alguns d'ells van ser desenvolupats en un indret on la prevalença de la infecció i la incidència de la malaltia és molt elevada (Ramakrishnan i cols.,1961, Kamat i cols.,1966).

Per un altre costat, les evidències *in vitro* recolzen, d'alguna manera, les conclusions dels treballs anteriors. El nombre de bacils viables disminueix, *in vitro*, més d'un 90% en dues setmanes, quan són exposats a l'acció de la INH o de la RIF. La exposició a l'acció combinada de tres o quatre fàrmacs antituberculosos provoca la reducció de 1000 vegades el nombre de bacils (Jindani i cols.,1980). Aquesta reducció en un malalt amb una bacil·loscòpia molt positiva serà important però no suficient i es podrà detectar el bacil en la bacil·loscòpia i en el cultiu. Ara bé, si el malalt té una bacil·loscòpia negativa l'acció dels fàrmacs podrà ser suficientment

significativa com per a què no hi hagi creixement en el cultiu i pugui ser considerat definitivament no contagiós. Diferents autors suggereixen que la negativització en un mes, del cultiu en malalts bacil·loscòpia positiva i amb soca sensible que inicien tractament amb tres o quatre fàrmacs inclosos la INH i la RIF, oscil·la entre el 30% i el 50%, i que aproximadament un 10% del esputs són encara positius després de tres mesos de tractament sense que això impliqui manca de resposta al tractament (EA/BMRC,1972, Tousek i Votruba,1974, TRC, 1983). Ara bé, aquestes dades es contradueixen amb altres evidències experimentals i *in vitro*. Clancy i cols., (1990) inoculant a conills d'Índies esputs de malalts, que després d'un mes de teràpia antituberculosa encara tenien bacil·loscòpia i cultiu positiu, van confirmar que tots els animals desenvolupaven lesions tuberculosos. A més, uns anys abans, Riley i cols., (1962) havien demostrat que els malalts amb tractament eren capaços de contagiar a conills d'Índies en ser exposats a l'aire contaminat dels primers en menor proporció que altres animals exposats a l'aire de malalts no tractats. En aquest mateix context, també s'ha especulat amb la possibilitat de què els malalts en tractament generin partícules infectives amb bacils i antibiòtics, fet que els faria no contagiosos. La comprovació experimental d'aquesta hipòtesi va confirmar que els bacils eren igual de viables després de 12 hores d'haver estat exposats a l'antibiòtic dins de les partícules infectives (Loudon i cols.,1969b).

#### **2.4.2 Respecte l'entorn: l'ambient**

El volum d'aire en el que són expulsats un nombre concret de bacils tuberculosos, determina la probabilitat d'infecció per una persona susceptible que respiri aquest aire. Les partícules infectives tenen una tendència mínima a caure, a la vegada que es dispersen ràpidament en l'habitació i es desplacen segons les corrents d'aire (Riley i Nardell,1989). En els espais tancats o incorrectament ventilats és on existeix el major risc de contagi. La ventilació dilueix i remou les partícules reduint la probabilitat d'infectar-se. La importància de la ventilació i la circulació de l'aire ha estat extensament demostrada en l'estudi de diferents brots succeïts en llocs com: escoles (Sacks i cols.,1985), bars (Kline i cols.,1995), avions (Kenyon i cols.,1996), entre altres. L'exemple més notable es pot trobar en el brot de TB a bord d'un submarí de la marina nord-americana (Houk i cols.,1968). Més d'un centenar de contactes van ser infectats, –conversió del PPD–, a partir d'un sol cas índex. El mecanisme de transmissió va ser degut a la recirculació de l'aire contaminat a través del sistema tancat de ventilació. La freqüència més alta de conversió es va donar entre els contactes que compartien el mateix compartiment que el cas índex, ara bé, també hi va haver un alt nombre d'infectats entre la tripulació que ocupava altres compartiments i que ni treballaven ni tenien tracte social amb el cas índex, però els compartiments del quals estaven connectats pel circuit tancat de ventilació.

A més, les conversions van continuar un temps després de què fos detectat i aïllat el cas índex, el que va permetre comprovar que l'aire dels circuits tancats pot retenir partícules contagioses viables durant un temps prolongat.

### **2.4.3 Respecte al contacte: receptor**

S'estima que entre el 50% i el 75% dels contactes íntims de malalts tuberculosos no s'infecten després d'haver estat exposats a l'agent infecció (Shaw i Wynn-Williams, 1954, Grzybowski i cols., 1975). Diferents variables relacionades amb el contacte poden influir en el procés de la transmissió. Entre aquestes es destaquen les següents:

#### **2.4.3.1 Duració i intensitat de l'exposició**

La probabilitat d'infectar-se és directament proporcional a la concentració de partícules infeccioses en l'aire i el volum d'aire inhalat, si assumim igual susceptibilitat de les persones a la TB, fet que no és del tot cert. A la vegada, la concentració de les partícules és una funció de la intensitat en què els bacils són afegits a l'aire per una o més fonts i del grau en què són diluïts, moguts, morts o inactivats (Nardell i cols.,1991). Així doncs, es necessita un contacte íntim i prolongat, respirant un volum molt gran d'aire contaminat, per a què hi hagi infecció. Aquesta situació es troba entre els contactes que conviuen amb el malalt, que són les primeres persones en ser avaluades en detectar-se el cas índex. Ara bé, cal tenir en compte que el nombre absolut de persones que un cas contagiós pot infectar fora del context definit com contacte íntim o proper, pot ser considerable i, en ocasions, pot excedir al nombre de contactes pròxims contagiats (van Geuns i cols.,1975, Veen,1992). En aquest sentit, s'han descrit brots d'infecció en llocs i situacions on el tipus de contacte és més casual (Kenyon i cols.,1996, Golub i cols.,2001, Solsona i cols.,2001).

#### **2.4.3.2 La resposta immune**

El risc d'infectar-se no depèn en la seva totalitat de factors externs a l'hoste. Si fos així, només que un sol bacil s'adherís a la paret alveolar seria suficient per a què es produís una infecció tuberculosa. L'estat i el funcionament del sistema immune pot variar d'una persona a un altre i, també, al llarg del temps. Això representa un factor de modificació del risc associat a la implantació dels bacils i a la seva capacitat per establir una infecció tuberculosa (apartat 2.3).



### 2.4.3.3 Protecció contra la reinfecció

Des de sempre s'ha considerat que en les persones immunocompetents, la resposta a la infecció pel bacil *M. tuberculosis* dona certa protecció contra la reinfecció. La probabilitat de reinfectar-se ve determinada pel risc de reexposició, per la intensitat d'aquesta i per l'estat del sistema immunitari de l'hoste (ATS, 2000b). Ara bé, la reinfecció exògena, amb soques sensibles o multiresistents, després d'un episodi previ de TB curada, s'ha demostrat mitjançant eines moleculars tant en persones immunocompetents (Caminero i cols.,2001) com en immunodeprimides (Small i cols.,1993) (apartat 2.10.3.1). De forma similar, s'han demostrat, molecularment, casos d'infecció mixta per dues soques de *M. tuberculosis* (Pfyffer i cols.,1998, Chaves i cols.,1999). Darrerament, alguns estudis semblen indicar que la reinfecció juga un paper molt important en les TB recurrents dins de la població general sense cap factor clínic i epidemiològic atenuant que ho afavoreixi (García de Viedma i cols.,2002a).

#### 2.4.3.3.1 La vacuna de la BCG

La vacunació amb la BCG és un fet corrent en una gran part del món. Malgrat aquest fet, l'eficàcia de la vacuna roman incerta i els diferents estudis, –essencialment de tipus clínic i cas-control–, presenten forces discrepàncies en el grau de protecció que oscil·la del 0% a un 80%. Els estudis estadístics de tipus meta-anàlisi d'aquests treballs demostren una elevada eficàcia de la BCG respecte a la meningitis tuberculosa i la TB miliar o disseminada, d'un 75 a un 86%, però només d'un 50% si es considera la eficàcia global (Colditz i cols.,1994,1995). La vacuna, per tant, no evita la infecció per *M. tuberculosis* ni protegeix de la reinfecció però si protegeix de la TB disseminada i de les formes greus de la malaltia després de la infecció primària, especialment en nens (apartat 2.3.1). En la variabilitat de l'eficàcia hi contribueixen molts factors com: la tècnica de la vacunació; les característiques de la vacuna; les interaccions entre la persona vacunada i la vacuna, entre altres. En base a tot això, la vacuna amb BCG es recomana en tots els països amb elevada o moderada endèmia de TB, com una estratègia d'intervenció, amb l'única finalitat d'evitar la elevada mortalitat infantil que hi ha en aquests indrets (Watson,1995).



## 2.5 DETECCIÓ DE LA INFECCIÓ PER *Mycobacterium tuberculosis*

La prova de la tuberculina és l'únic mètode establert per detectar la ITL i és el procediment recomanat (UITB, 1999). Aquesta prova està basada en el fet que la infecció amb *M. tuberculosis* produeix una reacció de hipersensibilitat de tipus retardada a determinats components antigènics del bacil anomenats tuberculines. La tuberculina PPD estàndard s'aconsegueix en filtrar un cultiu de *Mycobacterium tuberculosis* per precipitació de proteïnes.

L'administració de la tuberculina es fa per injecció intradèrmica en la superfície interna de l'avantbraç. La dosi estàndard és de 5UT (Unitats de Tuberculina) de PPD-S als Estats Units (ATS, 2000a), i de 2UT de PPD-RT 23 amb Tween 80 en el nostre entorn (UITB,1999).

La reacció immunològica que es produeix com a resposta a la injecció intradèrmica de la tuberculina és producte de la DTH. Les cèl·lules T sensibilitzades prèviament s'acumulen en el lloc de la punxada on alliberen citoquines. Aquestes provoquen una induració per una vasodilatació local, edema, dipòsit de fibrina i acumulació d'altres cèl·lules inflamatòries en la zona. Normalment, la reacció a la tuberculina comença entre les 5 i 6 hores després de la injecció i té la màxima induració entre les 48 i 72 hores, desapareixent al cap d'uns dies (ATS, 2000a).

El test es llegeix entre les 48 o 72 hores després de la injecció i es valora la presència o l'absència d'induració per inspecció i palpació, alhora que es mesura el diàmetre transversal d'aquesta. En base a la sensibilitat i l'especificitat de la prova del PPD així com a la prevalença de la TB en els diferents grups de risc, la ATS recomana tres valors per definir la reacció tuberculínica positiva:

a)  $\geq 5$  mm en persones VIH positives i immunodeprimides, contactes de malalts amb TB,

b)  $\geq 10$  mm en immigrants, usuaris de drogues per via parenteral, residents i treballadors en llocs de risc i persones amb algun factor clínic de risc,

c)  $\geq 15$  mm en persones sense cap factor de risc per TB (ATS, 2000a). En el nostre entorn es recomana que el resultat de la prova s'interpreti segons els criteris descrits a la taula 2.7.

En moltes persones la sensibilitat a la prova tuberculínica és per tota la vida. Tot i això, amb el pas del temps pot disminuir i, fins i tot, desaparèixer. Si el PPD s'administra en aquestes persones la reacció inicial pot ser petita o no ser-hi, encara que si es repetís el test podrien patir una resposta exagerada. Això és el que s'anomena efecte *Booster* i, en certes ocasions, pot provocar interpretacions errònies. Aquest tipus de reacció és comuna entre les persones

exposades a altres micobacteris o que han estat vacunades. La repetició de la prova mai serà positiva si la persona no ho és als antígens del PPD (Menzies, 1991).

**Taula 2.7** Criteris de PPD positiu segons diferents situacions

Situació clínica/epidemiològica	PPD positiu
no vacunats	≥ 5 mm
vacunats contactes íntims de casos BK+	≥ 5 mm
vacunats contactes esporàdics de casos BK+ o contactes íntims i freqüents de casos BK-	≥ 15 mm
Infectats pel VIH	Qualsevol induració
Viratge tuberculínic	≥ 5 mm

(UITB,1999) (BK+/-: bacil·loscòpia positiva/negativa)

En el cas de la immunització prèvia amb la vacuna BCG no hi ha cap mètode per distingir una reacció tuberculínica causada per aquesta o bé per una infecció natural micobacteriana, encara que, reaccions de ≥ 15 mm d'induració molt probablement no són causa de la BCG (apartat 2.5.3.3.1) (UITB,1999).

En persones infectades pel VIH, qualsevol induració es considera positiva, tot i que de vegades la prova pot ser dubtosa, –falsos negatius–, degut al fenomen de l'anèrgia. Aquesta és la manca total de capacitat de reacció dels teixits davant una substància antigènica com a conseqüència d'una disminució en el nombre de cèl·lules CD4+. L'anèrgia es pot descartar amb proves de sensibilitat cutània amb altres antígens ambientals emprats habitualment en el diagnòstic de malalties cutànies de base al·lèrgica, o bé comptabilitzant el nombre de limfòcits T CD4+ (CDC,1997a). La resposta a alguns d'aquests antígens o un nombre correcte de cèl·lules comporta considerar que el sistema immune està intacte i es confirma que el resultat de la prova és negativa. Contràriament, la no resposta és indicadora d'anèrgia i, per tant, no es té en compte el resultat negatiu del PPD.

Darrerament, s'està desenvolupant altres sistemes de detecció de la ITL més sensibles i específics que la prova de la tuberculina. En aquest sentit, i fa poc temps, s'ha comercialitzat un test anomenat Quanti-FERON®-TB (Cellestis Limit Carnegie) ([www.cellestis.com](http://www.cellestis.com)) (CDC,2002) basat en la mesura *in vitro* de la producció d'IFN-γ a partir de cèl·lules de la sang prèviament estimulades amb antígens específics. En aquest test la detecció de la citoquina és fa amb una ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). A més, darrerament s'han dissenyat altres mètodes que simplifiquen i augmenten la sensibilitat. Aquest és el cas del test l'ELISpot

(**Enzyme-Linked Immunospot**), que mesura també la producció de d'IFN- $\gamma$  però emprats dos anticossos (Lalvani i cols.,1998). Paral·lelament al desenvolupament de nous sistemes de detecció de la ITL, s'han identificat altres antigens de *M. tuberculosis*, com ara l'ESAT-6 (6-KDa **Early Secreted Antigenic Target**) i el cfp-10 (**culture filtrate protein 10-KDa**) que podrien ser més sensibles i específics com a eines de diagnòstic de la infecció, així com podria ajudar a distingir infecció de vacunació (Berthet i cols.,1998).

---

## **2.6 FACTORS ASSOCIATS A DESENVOLUPAR LA TUBERCULOSI: EMMALALTIR**

El risc de desenvolupar TB, un cop hi hagut infecció, és d'origen endogen, determinat per la integritat del sistema immunitari cel·lular de la persona infectada i de la agressivitat del bacil. En la majoria dels casos resulta molt difícil determinar el per què una persona en particular desenvolupa TB després de la infecció i un altre no. Clàssicament, s'han descrit molts factors que augmenten el risc de progressió d'una ITL cap a la malaltia (Rieder i cols.,1989), però la TB és clarament una malaltia multifactorial en la que es produeixen multitud d'interaccions entre l'ambient, els factors intrínsecs a la persona infectada i les característiques del bacil.

### **2.6.1 Temps transcorregut des de la infecció**

El temps transcorregut des del moment en què es produeix la infecció fins que aquesta s'activa cap a malaltia és un dels factors de risc més importants per desenvolupar la TB en persones immunocompetents. Clàssicament, s'ha estimat que aproximadament un 10% de les persones en contacte amb un malalt tuberculós s'infectaran i desenvoluparan TB activa, –TB primària–, durant els primers cinc anys després de la infecció sinó reben cap tipus de tractament preventiu (apartats 2.3.1 i 3.3.1). A més, el risc d'emmalaltir és més elevat en els dos primers anys immediatament després de la infecció i disminueix a la meitat passats els primers cinc anys (Comstock i cols.,1974, Styblo,1991).

La informació sobre el risc de presentar una TB després de la infecció s'extreu dels estudis de tractament preventiu desenvolupats en contactes íntims dels casos índexs. Aquests indiquen, com ja s'ha esmentat abans, que el risc és més elevat en els primers anys que segueixen a la infecció i cau ràpidament, tot i que roman mesurable durant un període llarg temps (Ferebee,1969). En un estudi posterior, l'observació de grups amb reacció tuberculínica positiva tractats amb placebo, –en estudis sobre l'efecte de la vacunació amb BCG (apartat

2.5.3.3.1)–, indica també que la incidència més alta de TB té lloc en els primers anys després de la infecció i que decau ràpidament (D'Arcy i Sutherland,1977).

A més, el risc d'emmalaltir ràpidament després de la infecció està relacionat amb la resposta immunològica que té el contacte, de manera que les persones amb menys defenses davant la progressió de la infecció subclínica tindrien una probabilitat més elevada de desenvolupar TB immediatament després de la infecció. Contràriament, no desenvolupar la malaltia podria indicar millors mecanismes de defensa.

## **2.6.2 Infecció pel virus de la immunodeficiència humana**

La infecció pel VIH és un clar factor potenciador de la TB que incrementa considerablement la susceptibilitat a emmalaltir de TB (apartat 1.3.2). El risc de desenvolupar TB immediatament després de la infecció, –d'un 1 a 4 mesos després del contacte–, és més alt entre les persones VIH positives, amb taxes d'incidència que ronden del 30 al 40 % (di Perri i cols.,1989, Daley i cols.,1992, Coronado i cols.,1993). A més, la presentació tan ràpida es troba, associada a limfopènia de CD4+ i a l'anèrgia cutània (di Perri i cols.,1989) (apartat 1.3.6). D'altre banda, diferents estudis deixen constància de la predisposició dels malalts VIH positius a patir TB per reinfecció exògena (Small i cols.,1993) i, en alguns casos, amb soques MDR (Edlin i cols.,1992).

El risc de desenvolupar TB temps després de la infecció en qualsevol moment de la vida, –TB secundària o reactivació–, és també molt més alt en malalts VIH positius que en persones immunocompetents, s'estima que al voltant del 50%, mentre que sense coinfecció el risc és del 5-10% (OMS,1996). La infecció pel VIH altera el mecanisme de control, –granulomes–, del bacil tuberculosos i, conseqüentment, s'incrementa la reactivació de la infecció latent (apartat 2.3.2.4). La contribució de la reactivació endògena i la reinfecció exògena de la TB no està clara però, probablement, depèn de la prevalença de la malaltia i de la infecció que hi hagi en una població en concret.

## **2.6.3 Tuberculosi residual inactiva no tractada prèviament**

La TB pot curar-se de forma natural sense rebre cap tractament. Tot i això, si no es tracta la reactivació de la malaltia és molt probable en la majoria dels casos. Aquelles persones que han patit una TB curada de manera espontània, amb fibrosi residual, tenen un risc calculat de 2.4-13.6 ‰ anual (Edwards i cols.,1972) de desenvolupar de nou la malaltia i, s'ha estimat que la incidència natural de curació és del 2.9 ‰ anual (IUAT,1982). A més, la mida i l'extensió de les lesions, observades en la radiologia i conseqüència de la TB curada, és un determinant



del risc per la reactivació. Les persones amb lesions fibròtiques d'un diàmetre  $\geq 2$  cm tenen una probabilitat dues vegades més gran de desenvolupar TB, comparades amb aquelles que tenen mides inferiors (IUAT,1982).

#### **2.6.4 Edat**

Existeixen diferències importants en la incidència de la TB segons l'edat. Aquestes disparitats poden ser atribuïdes a les diferències en el risc o la prevalença de la infecció de la població estudiada, –la incidència de la TB segons l'edat varia força dins de cada país i entre diferents països–, en el risc de malaltia una vegada s'ha adquirit la infecció o a ambdues (Rieder i cols.,1989). La tendència general que s'observa és una major incidència de TB a mesura que augmenta l'edat de les persones, tot i que aquest fenomen pot ser degut a l'efecte que provoca l'augment acumulatiu de la prevalença de la infecció tuberculosa. La distribució de la TB per edats mostra una incidència significativa en nens < de 5 anys, en joves adults de 20 a 35 anys i en persones > de 60 anys. En les primeres edats la TB és conseqüència directa de la progressió d'una infecció recent. En la maduresa, la TB és deguda a la reactivació d'una infecció latent. La incidència en aquesta etapa de la vida reflecteix la prevalença de la TB en la joventut de la persona malalta.

#### **2.6.5 Factors genètics**

Diferents treballs amb bessons homo i heterozigots indiquen clarament la existència de factors hereditaris involucrats en el risc de desenvolupar TB (Comstock,1978). La resposta immunitària a aquesta malaltia és multifactorial i està controlada genèticament per diferents gens. Molts estudis han centrat el seu interès en els gens HLA, principalment els *loci* HLA-*DR2* (Bothamley i cols.,1989) i HLA-*DQB1* (Goldfeld i cols.,1998), que determinen quins antigens micobacterians seran presentats als limfòcits Th. Altres treballs relacionen certs gens, que no pertanyen al sistema HLA, amb un increment en la susceptibilitat a la TB. Entre aquests es destaquen, les variacions genètiques en el gen *NRAMP1* (**N**atural **R**esistance-**A**ssociated **M**acrophage **P**rotein) (Bellamy i cols.,1998) i els polimorfismes trobats en el gen *VDR* (**V**itamin **D**-**R**eceptor) (Wilkinson i cols.,2000). Estudis recents realitzats sobre tot el genoma humà han permès identificar dos *loci* 15q i Xq que també podrien estar implicats en la susceptibilitat a la TB (Bellamy i cols.,2000).



### **2.6.5.1 Sexe**

A nivell mundial, la prevalença d'infecció per *Mycobacterium tuberculosis* és similar entre homes i dones fins l'adolescència, després és més alta entre els homes. La progressió cap a la malaltia segueix una dinàmica diferent, les taxes són més altes entre les dones en l'edat reproductiva, mentre que entre els homes les taxes de progressió cap a la malaltia s'incrementen a partir dels 45 anys (Holmes i cols.,1998). Aquesta situació s'observa en qualsevol forma de TB, pulmonar o extrapulmonar. Les dades de què es disposa suggereixen que hi ha determinats factors de maduració i hormonal implicats en el desenvolupament de la TB. Altres autors han especulat que el fet que les dones tinguin unes taxes d'infecció més baixes durant i després de l'adolescència les fa més susceptibles d'infectar-se durant aquest període i és sabut que el risc d'emmalaltir és més alt en el primer i segon any després del contacte amb el bacil (Styblo,1991). Finalment, s'han de considerar actituds i comportaments socials diferents entre els homes i les dones que podrien explicar aquest fenomen (Holmes i cols.,1998).

### **2.6.6 Factors mediambientals i costums socials**

#### **2.6.6.1 Tabac, alcohol i usuaris de drogues per via parenteral**

Diferents treballs demostren que la incidència de TB és més elevada en persones fumadores que en aquelles que no ho són (Yu i cols.,1988). A més, estudis de casos-control posen en evidència que la probabilitat de presentar una TB augmenta amb el nombre de cigarrets fumats (Alcaide i cols.,1996).

Els clínics assenyalen amb freqüència una associació entre el consum d'alcohol i la incidència de la TB (Mellencamp i Jerrells,1996). En realitat, el consum d'alcohol pot augmentar el risc de TB degut a què els mecanismes immunitaris afectats per l'alcohol són també aquells que resulten essencials per la resistència a la malaltia.

Els UDVPs s'han considerat un grup de risc per la TB (Reichman i cols.,1979) i amb la pandèmia de la SIDA el risc d'emmalaltir, immediatament després de la infecció, s'ha incrementat considerablement (Selwyn i cols.,1992). A més, el risc de desenvolupar TB és també molt elevat en els UDVPs coinfectats amb el VIH (Selwyn i cols.,1989, Jansà i cols., 1998).

### **2.6.6.2 Desnutrició**

La relació directa entre la TB i la desnutrició es coneguda des de fa molt temps. La interacció entre ambdós conceptes és bidireccional. Per un costat, la desnutrició té un efecte advers sobre la funció immunitària, –els limfòcits T i la immunitat cel·lular–, alhora que incrementa la susceptibilitat cap a la TB incrementant també la morbiditat d'aquesta. Paral·lelament, la TB provoca l'activació de les citoquines, un metabolisme anòmal de les proteïnes i pèrdues en les reserves dels greixos i en el teixit no gras (Macallan,1999).

El tipus de dieta i/o la deficiència de certs compostos pot incrementar el risc de TB (Strachan i cols.,1995). Hi ha evidències que avalen el paper actiu de la Vitamina D en la malaltia associant-la amb un increment del risc de patir TB (Willkinson i cols.,2000). S'ha demostrat que el metabolit actiu de la vitamina D, la hidroxivitamina D<sub>3</sub>-1.25, promou la maduració i l'activació dels monòcits i macròfags humans, alhora que promou, també, la seva acció inhibidora sobre els bacils tuberculosos virulents en els macròfags (apartat 2.3.2.1) (Crowle i cols.,1987).

### **2.6.7 Altres factors: afeccions clíniques de base**

Hi ha certes afeccions clíniques de base, on el sistema immunitari de la persona hi està local o globalment implicat i que predisposen a la TB. Entre aquest trastorns s'inclouen:

*Silicosis.* La TB és una malaltia freqüent en miners i persones afectades de silicosis (Rosner i Markowitz,1991, Godfrey-Faussett i cols.,2000). En general, la TB es diagnostica entre el 20-25% del total de malalts silicòtics amb un risc de mortalitat entre 3 i 6 vegades superior al de la població general (de la Hoz,1996).

*Diabetis mellitus.* La idea d'una associació entre la diabetis *mellitus* i la TB és molt antiga. En general, les persones que pateixen diabetis presenten una incidència de TB de 2 a 4 vegades superior a les persones no diabètiques (ATS,2000a). La predisposició dels diabètics a les infeccions controlades per la immunitat cel·lular, com ara la TB, pot ser deguda a alteracions en la defensa pulmonar de l'hoste, incloent condicions que interfereixen amb els mecanismes d'eliminació o que debiliten les funcions de la immunitat cel·lular pulmonar (Koziel i Koziel,1995).

*Càncer.* La TB és comuna en malalts que presenten càncer de pulmó, limfomes i leucèmies (Kaplan i cols.,1974). També es troba associada a càncers de cap i coll. En aquests malalts el risc de patir TB és 16 vegades més gran que en la població general (Feld i cols., 1976).

*Malalties renals.* Els malalts en estat final d'insuficiència renal (Andrew i cols., 1980) i els que pateixen hemodiàlisi (Chia i cols.,1998) tenen un risc més alt de presentar TB. S'estima que en aquests malalts la incidència de la TB és de 10 a 25 vegades superior que la que presenta la població general. La TB també ha estat associada a malalts trasplantats de ronyó (Lichtenstein i MacGregor,1983).

*Corticoides.* Que la immunitat cel·lular estigui intacta és crucial per la prevenció de la progressió de la TB. L'ús de fàrmacs, com ara els corticoides, que immunodeprimeixen, predisposen als malalts a desenvolupar TB. Els esteroides, en les dosis farmacològiques, actuen disminuint la inflamació, provocant una limfopènia i monocitopènia. L'efecte directe sobre la funció limfocitària no és clara, contràriament als efectes adversos sobre la funció monocito-macròfaga que sí que s'han descrit (Fauci i cols.,1976).

*Gastrectomia i bypass jejunum-ilial.* La prevalença de la gastrectomia entre malalts tuberculosos varia del 1.7% al 2.5%, i la incidència de TB en malalts gastrectomitzats oscil·la del 0.4% al 5% (Snider,1985). Pel que fa al *bypass* jejunum-ilial, les dades són escasses però semblen apuntar cap a què aquesta operació podria ser un factor de risc per a la TB (Snider,1982).

### **2.6.8 Embaràs**

El paper de l'embaràs en la reactivació o progressió de la TB ha estat objecte d'un intens debat. Quan s'analitzen les dades s'arriba a la conclusió de què, tot i que no hi ha evidències sòlides per associar embaràs amb TB, n'hi ha suficients per suggerir que el risc de desenvolupar la malaltia pot augmentar en el període de postpart (Snider,1984). Els investigadors proposen que la TB podria progressar com a resultat d'un descens del diafragma, –fet que podria afectar a la pressió intratoràcica–, de fluctuacions hormonals, de pèrdua nutricional i d'alteracions immunitàries (Armstrong i Garay,1996).

### **2.6.9 Les característiques del bacil**

Les característiques específiques de les diferents soques de *M. tuberculosis* poden determinar la potència de l'acció d'aquestes en l'hoste. S'ha demostrat l'existència de soques més predominants en la població, el cas del genotipus Beijing (van Soolingen i cols.,1995, Glynn i cols.,2002) (apartat 2.10.3.1), o d'altres amb capacitat elevada de replicar-se dins als macrògafs humans (Zhang i cols.,1999), o de soques resistents, especialment letals, com la soca W (Frieden i cols.,1996, Agerton i cols.,1999) (apartats 2.10.3.1.4 i 2.10.3.3), exemples

clars de les diferències en els graus de virulència i/o transmissibilitat que presenten les soques de *Mycobacterium tuberculosis* i que determinen el grau d'afectació en l'hoste.

---

## **2.7 DETECCIÓ DE LA MALALTIA PER *Mycobacterium tuberculosis***

El diagnòstic de la TB està basat en l'observació i valoració de la simptomatologia clínica compatible, la radiologia i la confirmació o no de la presència del bacil en la mostra clínica i/o el diagnòstic anatomopatològic quan s'escau per la localització de les lesions. També s'han avaluat mètodes de diagnòstic serològic detectant anticossos específics en sèrum.

### **2.7.1 Diagnòstic clínic**

La TB pot lesionar qualsevol òrgan però el més comú és el pulmó. Per aquest fet, es diferencia entre TB pulmonar i extrapulmonar. El primer contacte amb *M. tuberculosis* provoca la TB pulmonar primària, la primoinfecció. Les manifestacions clíniques i radiològiques són variables (García San Miguel i Agustí, 1992). Normalment, sol passar desapercibuda i només es detecta per la positivitat de la prova tuberculínica (apartat 2.4). De vegades, però, es pot detectar o una discreta síndrome tòxica i febricular, que es resol espontàniament o, fins i tot, una tos persistent.

La TB postprimària comprèn totes les manifestacions que tenen lloc després d'haver patit una TB primària. El lloc d'inici sol ser una lesió localitzada en el lòbul superior del pulmó per sota la clavícula. Altres vegades pot començar en petits focus apicals procedents de disseminacions hematògenes postprimàries. La TB es pot estendre pels pulmons de diferents formes: limfògena, hematògena i broncògena. La simptomatologia típica és una síndrome tòxica més o menys accentuada, una síndrome febril, especialment vespertina i dolor toràcic localitzat amb expectoració. Solen ser freqüents els esputs hemoptòics provocats pel trencament d'algun vas sanguini proper a les lesions tuberculoses. Radiològicament, les lesions poden ser diverses però són freqüents els infiltrats localitzats a segments superiors i també les cavitacions.

Els aspectes clínics de la TB associada a la infecció pel VIH on el nombre de limfòcits T es manté estable són similars als que presenten els malalts tuberculoses sense coinfecció pel virus. Ara bé, amb la progressió de la immunodeficiència ( $CD4^+ < 200$  cèl./mm<sup>3</sup>) les manifestacions clíniques s'alteren i s'observa un augment en la freqüència de l'anèrgia cutània i una deterioració dels teixits que controlen els micobacteris, fet que provoca un increment de les formes disseminades i extrapulmonars, sobretot ganglionars. Les imatges radiològiques que



presenten els malalts amb TB pulmonar i VIH positius, reflecteixen la deterioració de la resposta inflamatòria tissular a la infecció i solen ser difuses i inespecífiques (Lawn i cols.,2002).

## **2.7.2 Diagnòstic microbiològic**

Pel diagnòstic microbiològic es disposa de tres mètodes:

- a) Observació directe del bacil *M. tuberculosis* després de ser tenyit,
- b) Aïllament de la soca: cultiu de la mostra clínica i identificació de la soca, i
- c) Detecció del material genètic.

### **2.7.2.1 Visualització microscòpica**

L'observació microscòpica directa de la mostra clínica és un procediment fàcil, ràpid i econòmic. La presència de bacils en la tinció confirma el diagnòstic de la malaltia i determina si són casos contagiosos (apartat 2.5.1.3). Són necessaris de 5.000 a 10.000 bacils/ml per a què sigui positiva (Hobby i cols.,1973). Contràriament, no es pot descartar una TB quan no s'observen bacils en la preparació. En aquest darrer cas caldrà valorar la clínica i confirmar la malaltia amb el resultat del cultiu. En països amb pocs recursos econòmics i amb alta prevalença de TB, l'examen microscòpic de la mostra clínica és l'única eina, amb bona relació cost-eficàcia, disponible no solament pel diagnòstic sinó també pel seguiment del tractament dels malalts amb TB. La visualització microscòpica es pot fer amb diferents mètodes de tinció específica. El procediment clàssic i més emprat, especialment en països en desenvolupament, és el de Ziehl-Neelsen, on els bacteris es tenyeixen de color vermell (apartat 1.1). Actualment, també s'utilitzen tincions amb fluorocroms, -colorants que donen fluorescència-, com és el cas de l'auramina-rodamina on els micobacteris apareixen tenyits d'un color groc-taronja.

La informació sobre el nombre de bacils observats té relació amb el grau de contagiositat del malalt i amb la gravetat de la malaltia. Conseqüentment, el resultat de la bacil·loscòpia s'informa qualitativament i semi-quantitativament (UICTMR,2000). La sensibilitat de la bacil·loscòpia oscil·la de 22% (Boyd i Marr,1975) al 78% (Strumpf i cols.,1979) i depèn de la qualitat de la mostra de què procedeix, així com d'una bona preparació de la tinció i d'una bona lectura (ATS,2000b). En general, la rendibilitat de la bacil·loscòpia d'esput augmenta si es processen diferents mostres i si l'extensió de les lesions és major.

### **2.7.2.2 Aïllament del bacil: cultiu**

El cultiu és un procediment molt més sensible que la microscopia ja que pot detectar una quantitat tan petita com 10 bacteris/ml de mostra digerida i concentrada (Yeager i cols., 1967).



És la tècnica de referència, amb una sensibilitat del 50% (Krasnow i Wayne, 1969) al 81% (Levy i cols.,1989) depenent de la localització, del nombre de mostres cultivades i la seva qualitat. Per l'aïllament del bacil s'utilitzen medis sòlids i líquids.

### **2.7.2.2.1 Medis sòlids**

Engloben els mètodes tradicionals de cultiu pels micobacteris en general. El més emprats són els medis amb base d'ou, com ara el Löwenstein-Jensen i els agars semisintètics *Middlebrook 7H10* i *7H11*. La incubació dels medis sembrats en una atmosfera enriquida amb un 5-10% de CO<sub>2</sub> afavoreix el creixement del bacil. En aquest medis, el creixement es detecta visualment, observant les colònies. Normalment, es pot veure creixement entre la segona i la quarta setmana d'incubació.

### **2.7.2.2.2 Medis líquids**

En general, els medis líquids afavoreixen millor el creixement que els sòlids. L'inconvenient és que es contaminen més i que és difícil de valorar si hi ha creixement. Per aquesta raó s'han desenvolupat mètodes de detecció del creixement en aquests medis. En aquest context, a més del medi tradicional agar líquid *Middlebrook 7H9*, se'n poden diferenciar altres tipus classificats segons la manera de detectar el creixement:

a) lectura manual: *Septi-Check MB* (Becton Dickinson) ([www.bd.com](http://www.bd.com)), que consisteix en un medi bifàsic de 20 ml de caldo de cultiu *Middlebrook 7H9*, enriquit amb CO<sub>2</sub>, amb suplement de factors de creixement i antibiòtics. El sistema es revisa visualment i el creixement es detecta tant en el medi líquid, –grumolls–, com en la fase sòlida, –colònies–.

b) lectura semiautomàtica: *BACTEC 460TB* (Becton Dickinson) ([www.bd.com](http://www.bd.com)), que utilitza el medi líquid *Middlebrook 7H12* i com a substrat àcid palmític marcat amb C<sub>14</sub>. Durant el creixement és produeix CO<sub>2</sub> radioactiu que és detectat pel sistema i traduït a un índex de creixement (0-999). Les principals avantatges són la rapidesa en la detecció respecte als medis sòlids, de 2-7 dies i de 10 a 30 dies en bacil-loscòpies positives i negatives, respectivament, i la possibilitat d'estandarditzar l'antibiograma (apartat 3.4.4.1). Té com a principal inconvenient la utilització i manipulació d'isòtops radioactius.

c) lectura automàtica: són mètodes que han aparegut en els darrers anys com a substituïts del sistema radiomètric. En general el rendiment és equivalent a aquest últim tot i que l'estandardització per fer antibiogrames encara no està complerta (apartat 3.4.4.1). Es destaquen els següents: *MGIT 960* (Becton Dickinson) ([www.bd.com](http://www.bd.com)), utilitza un caldo de cultiu *Middlebrook 7H9* al que s'incorpora un sensor fluorescent sensible al O<sub>2</sub>. Quan hi ha creixement

es consumeix aquest oxigen i es detecta/mesura la fluorescència emesa; *ESP Myco II* (Trek Diagnostic) ([www.trekds.com](http://www.trekds.com)), utilitza el medi líquid *Middlebrook 7H9* més amb suplement enriquidor, OADC, i es basa en la mesura monomètrica del consum d'oxigen; i *MB/Bact* (Organon Teknika) ([www.organonteknika.com](http://www.organonteknika.com)), utilitza el medi líquid *Middlebrook 7H9* modificat. El creixement es detecta amb un canvi de color quan es detecta presència de CO<sub>2</sub>.

### 2.7.2.3 Identificació de la soca

Les tècniques disponibles per la identificació dels micobacteris estan fonamentades en les característiques fenotípiques, –bacteriològiques–, bioquímiques i tècniques de biologia molecular o genètiques.

#### 2.7.2.3.1 Bacteriològica

Engloba proves que permeten assignar als micobacteris a un subgrup. Les més emprades són:

*Morfologia de las colònies.* Orienta cap a quina espècie o grup d'espècies es tracta (González i cols.,1998).

*Pigmentació i fotoreactivitat.* La primera és deguda a la producció de pigments carotens i segons aquesta es poden distingir tres grups:

- a) *fotocromògenes*: que pigmenten amb presència de llum,
- b) *escotocromògenes*: produeixen colònies pigmentades independentment de la presència de llum. La pigmentació ronda les diferents tonalitats que hi ha del groc al vermell i pot ser uniforme o irregular,
- c) *no cromògenes*: les colònies són de color blanc o cremós i no es pigmenten mai.

*Velocitat de creixement.* En funció d'aquest paràmetre els micobacteris poden ser de creixement: ràpid (< 7 dies); intermedi (7-10 dies); o lent (> 10 dies).

#### 2.7.2.3.2 Bioquímica

Existeixen múltiples proves que permeten diferenciar les espècies del gènere *Mycobacterium*, tot i això, emprant-ne només unes quantes s'hi identifiquen la majoria de les espècies clínicament més importants. La prova de la *niacina*, la *reducció de nitrats* i la prova de la *catalasa* permeten la identificació de *M. tuberculosis*. Altres proves utilitzades són la hidròlisi de Tween 80, la arilsulfatasa, tolerància a la sal, entre altres. L'inconvenient més important és

què per aquest tipus de proves es necessita que la soca estigui ben crescuda, conseqüentment, la identificació s'allarga de 2 a 8 setmanes.

### **2.7.2.3.3 Genètica**

Són mètodes ràpids, doncs, la majoria de les vegades es fan amb poc inòcul. Les tècniques, casolanes i comercials, d'ús més difós són:

*Les sondes d'hibridació d'àcids nucleics.* Són fragments de l'ADN marcats amb quimioluminiscència i complementaris d'altres fragments de l'ARNr específic d'espècie (AccuProbe) ([www.gen-probe.com](http://www.gen-probe.com)). Actualment, es disposa d'aquest tipus de sonda pels complexos *M. tuberculosis* i *M. avium*, i les espècies *M. intracellulare*, *M. goodii*, *M. kansasii* i *M. avium*.

*Polimorfisme dels fragments de restricció (PRA).* Està basat en l'amplificació d'un fragment del gen que codifica la *heat shock protein* 65 kDa dels micobacteris i que, posteriorment, és digerit amb dos enzims de restricció, *Hae* (*Haemophilus aegyptius*) III i el *BstE* (*Bacillus stearothermophilus*) II. Els patrons obtinguts són específics de les diferents espècies (Telenti i cols.,1993a). Actualment, existeix una pàgina web on es poden consultar els patrons obtinguts ([www.hospvd.ch/prasite/](http://www.hospvd.ch/prasite/)).

En els darrers anys han aparegut altres tests comercials:

*INNO-lipA Mycobacteria* (Innogenetics) ([www.innogenetics.es](http://www.innogenetics.es)) i *Genotype Mycobacterium* (Hain Lifescience GmbH) ([www.hain-Lifescience.de/pdf/dnaisol\\_myco.pdf](http://www.hain-Lifescience.de/pdf/dnaisol_myco.pdf)), basats en l'amplificació d'un fragment de l'ADN micobacterià, el producte del qual és hibridat en una tira de niló o nitrocel·lulosa on hi han immobilitzats oligonucleòtids marcats, sondes específiques per cadascuna de les zones del gen. Es tracta d'una tècnica d'hibridació inversa. Així es pot identificar el complex *M. tuberculosis* i altres espècies. També s'utilitza per la detecció de resistència, en concret, a la RIF (Rossau i cols.,1997)(apartat 3.4.4.2.2)

*Seqüenciació d'àcids nucleics.* Es fonamenta en l'amplificació per PCR i posterior seqüenciació d'un fragment del gen ARNr *16S* de seqüència coneguda en les diferents espècies de micobacteris (Kirscher i cols., 1993). Malgrat que aquest gen està força conservat presenta zones variables, amb seqüències de nucleòtids específiques de gènere i espècie, que són les que s'amplifiquen.

### **2.7.2.3.4 Cromatografia i altres mètodes**

La cromatografia és una tècnica basada en l'estudi de la composició diferencial de lípids de la paret cel·lular que presenten els micobacteris. Existeixen tres tipus de cromatografies que s'han aplicat a l'estudi dels micobacteris: a) de capa fina, b) la de gasos, que permet la

identificació segons el perfil dels diferents àcids grassos (Tisdall i cols.,1979), c) la líquida d'alta resolució segons el perfil dels diferents àcids micòlids (apartat 1.1) (Butler i cols.,1991). Actualment, són mètodes poc utilitzats en la rutina.

En els últims anys, s'han descrit noves tècniques d'identificació fonamentats en l'afinitat específica de determinats bacteriòfags pels micobacteris: *LRP* (**L**uciferase **R**eporter **P**hage), *FASTPlaque TB*<sup>®</sup> (Biotech laboratories) ([www.biotechlab.com](http://www.biotechlab.com)), i *PhageTek MB*<sup>®</sup> (BioMérieux) ([www.biomerieux.com](http://www.biomerieux.com)). Són tècniques senzilles, ràpides i relativament barates malgrat els problemes en la sensibilitat i especificitat observats en els pocs estudis desenvolupats (Mole i Maskell,2001, Alcaide i cols.,2003).

#### 2.7.2.4 Detecció genètica

En els darrers deu anys s'han desenvolupat tot un seguit de tècniques de biologia molecular que han permès l'amplificació de seqüències d'ADN i d'ARN, específiques de *M. tuberculosis*, amb la finalitat de detectar i/o identificar aquest últim, directament de mostra clínica. La tècnica més emprada és la PCR però se'n troben altres com ara: la reacció en cadena de la lligasa (LCR) o l'amplificació per transcripció (TMA). Són tècniques sensibles, específiques i ràpides, tot i que, cal tenir en compte certes mesures en la manipulació de les mostres per evitar contaminacions. Altres inconvenients són els falsos negatius, que resulten de la presència de substàncies inhibidores, i la interpretació clínica que es pot fer davant d'un resultat positiu, –per ex: el cas d'un resultat positiu en un malalt amb TB prèvia–. La sensibilitat d'aquestes tècniques varia en funció del valor de la bacil·loscòpia. En mostres on aquesta última és positiva la sensibilitat ronda el 95% malgrat que el diagnòstic ja s'ha fet amb la tinció. Els problemes sorgeixen en mostres bacil·loscòpia negativa on un resultat positiu no sempre confirma el diagnòstic de TB i on un resultat negatiu no el descarta, –sensibilitat del 55-65%–.

D'aquestes tècniques se'n poden trobar de desenvolupament casolà (Almeda i cols.,2000, García-Quintanilla i cols.,2000, García-Quintanilla i cols.,2002), i de comercialitzades com: *COBAS AmpliCor*<sup>TM</sup> *MTB test* (Roche) ([www.roche-diagnostic.com](http://www.roche-diagnostic.com)) basat en la tècnica de la PCR; *Mycobacterium tuberculosis Direct test* (MTDT)(Gen-Probe) ([www.gen-probe.com](http://www.gen-probe.com)) amb el sistema TMA i *LCX Mycobacterium tuberculosis assay* (Abbot) ([abbottlabs.com](http://abbottlabs.com)) que utilitza com a sistema d'amplificació la LCR. I, darrerament, ja existeixen sistemes de segona generació: *Qβ replicase* (Galileo-Probe Amplification<sup>®</sup>, Gene-Trak); *Nasba*<sup>®</sup> *Amplification System* (Organon Teknika) ([www.organonteknika.com](http://www.organonteknika.com)) amb amplificació tipus TMA i *Strand Displacement Amplification*<sup>®</sup> (Becton Dickinson) ([www.bd.com](http://www.bd.com)) amb sistema LCR.

Finalment, i en els darrers anys, cal destacar l'aplicació de la tècnica d'amplificació i detecció a temps real per PCR com a eina de diagnòstic. Aquesta metodologia es fonamenta en



la realització simultània de l'amplificació, d'una zona concreta així com la detecció i quantificació del material produït utilitzant diferents fluorocroms, –partícules lligades a fragments de l'ADN que són capaces d'emetre fluorescència en ser excitées–, incorporats en els *primers* i/o sondes. L'avantatge més important de la tècnica és la seva rapidesa, –resultat en 3 hores–, i la possibilitat de poder treballar directament en mostra clínica (Espasa i cols.,2002).

### **2.7.3 Serodiagnòstic**

Tot i que, en els últims temps, s'ha avançat molt en aquest camp encara no és d'ús freqüent en la pràctica clínica detectar la malaltia tuberculosa amb eines immunològiques. Des del punt de vista de la tècnica, la ELISA és la més difosa degut a la seva rapidesa i possible automatització que proporciona resultats reproduïbles amb sensibilitats òptimes. Respecte als antígens, predominen els de naturalesa proteica i lipídica: A5, A60, 45/47 kDa, Kp90, 30 kDa, P32, i *cord factor* o LAM (Chan i cols., 2000). Tot i això, les dificultats respecte a la sensibilitat i especificitat fan que no es pugui emprar com a mètode de diagnòstic.

### **2.7.4 Diagnòstic anatomopatològic**

De vegades la TB es diagnostica per l'existència de granulomes tuberculosos en mostres obtingudes de biòpsies d'òrgans afectats. Generalment les mostres són de naturalesa bronquial, pulmonar, glanglionar, de medul·la òssia, entre altres. Solen ser casos difícils d'interpretar i d'avaluar. El diagnòstic està basat en l'observació de granulomes amb o sense necrosi caseificant. Malgrat que altres malalties poden presentar granulomes, la necrosi és molt específica de la TB. Per això, l'observació d'aquest comporta sempre la realització d'un examen microscòpic de la mostra per identificar els bacils. A més, és recomanable el cultiu de la mostra per confirmar el diagnòstic microbiològicament.

---

## **2.8 MESURES DE PREVENCIÓ I CONTROL DE LA TUBERCULOSI**

Les mesures recomanades pels organismes oficials per a la prevenció i el control de la TB es situen bàsicament en l'ambient hospitalari i cal establir-les des del moment en què hi ha la sospita que una persona pot patir TB. El conjunt de mesures proposades s'apliquen a tres nivells: al malalt, a l'ambient que l'envolta, –que essencialment serà nosocomial–, i als seus contactes (OMS,1999a):



*Control del malalt contagiós.* La mesura més important per prevenir el contagi de la TB és diagnosticar i tractar al malalt de forma correcta (apartats 3.2.2 i 2.6). Quan el malalt té una bacil·loscòpia positiva és obligatori el seu aïllament i, en cas de sospita és preferible també aïllar-lo fins que es confirmi que no ho és. Aquesta mesura és especialment interessant en zones com urgències on convé accelerar la confirmació del diagnòstic. En la *praxis* clínica es considera que després de dues setmanes de tractament el malalt pot ser considerat no contagiós i normalment és donat d'alta (apartat 2.5.1.4). A més, es recomana ensenyar al malalt a què en el moment de tossir o esternudar es tapi la boca amb un mocador de paper no reciclable i que després cal dipositar en un contenidor especial. Si el malalt ha de sortir de l'habitació haurà de dur protector respiratori del tipus FFP2S (Fennelly,1998) o bé mascaretes quirúrgiques amb una eficàcia de filtració de partícules de 3-5 µm de diàmetre.

*Protecció ambiental.* El sistema de ventilació ha d'assegurar la pressió negativa en el interior de les habitacions respecte del passadís i àrees pròximes, així com assegurar recanvis d'aire periòdicament. S'estima que entre 6-10 recanvis d'aire/hora la concentració de les partícules infectives es reduiria en 1% del nivell inicial en 45 minuts (Riley i O'Grady,1961). El flux d'aire ha d'estar correctament dirigit en el interior de l'estança i l'evacuació d'aquest s'ha de fer el 100% a l'exterior. Si es fa necessària la recirculació de l'aire convé utilitzar filtres HEPA (**H**igh **E**fficiency **P**articulate **A**ir) que eliminen el 99.97% de partícules amb un diàmetre inferior a 0.3 µm (OMS,1999a).

El nombre de bacils viables, també, es pot reduir amb la radiació ultraviolada (Riley i O'Grady,1961). Malgrat que l'ús d'aquesta només es recomana en habitacions d'urgències i sala d'espera d'hospitals segons el nombre de malalts amb TB no sospitada que s'hi atenen (OMS,1999a).

*Protecció dels contactes, personal sanitari i familiars.* Normalment, s'utilitzen les mascaretes quirúrgiques que protegeixen de la inspiració i l'aspiració de gotetes amb bacils. Es recomana que siguin utilitzades de forma simultània pel malalt i per les persones que tenen contacte temporal amb ell. En circumstàncies concretes, com ara realització de broncoscòpies i tècniques que indueixin tos, necròpsies, assistència en urgències, UCIS (**U**nitats de **C**ures **I**ntensives), quiròfans, radiodiagnòstic i processament de les mostres en el laboratori de microbiologia és important l'ús de respiradors personals del tipus FFP2 i 3, –eficàcia de filtrat de partícules de 0.6µ diluïdes en medi aquós superior al 92 i 98%, respectivament–, amb o sense vàlvula inspiratòria (Fennelly,1998).

Una zona d'alt risc a nivell hospitalari és l'àrea del laboratori de microbiologia on es processen les mostres dels malalts. En aquest cas, les possibles infeccions són degudes a la creació de partícules contagioses durant la rutina diària de manipulació de mostres i cultius en

el laboratori. Les mesures de prevenció més destacades són: a) laboratori aïllat de la resta de departaments i amb nivell de bioseguretat tipus 3, b) equipament de protecció pel personal: guants, mascaretes, protecció ocular i altres, c) circulació de l'aire unidireccional cap a dins del laboratori, és a dir, pressió negativa. L'aire extret ha d'anar directament a l'exterior de l'edifici sense recirculació interior. Es recomana entre 10-12 recanvis d'aire/ hora, d) totes les mostres i cultius s'han de manipular dins d'una cabina de seguretat biològica de nivell A o superior amb flux laminar vertical i filtre HEPA, i e) les deixalles han de ser esterilitzades abans de sortir del laboratori (OMS,1998,1999a).

---

## **2.9 EPIDEMIOLOGIA CONVENCIONAL DE LA TUBERCULOSI: ESTUDI DE CONTACTES**

L'epidemiologia convencional o l'ECC és l'eina que permet detectar les persones, – contactes–, que s'han pogut infectar i/o emmalaltir a partir d'un cas actiu de TB. L'ECC està indicat en tots el malalts tuberculosos i cal que comenci immediatament després del diagnòstic d'aquests. La finalitat de l'estudi és:

- a) diagnosticar malalts o infectats,
- b) establir el més ràpid possible el tractament tant a uns com els altres, i
- c) reconstruir, a posteriori, la cadena de transmissió per identificar, sempre que sigui possible, el cas índex inicial.

Es defineix un *contacte* com a aquella persona que ha mantingut alguna relació amb un malalt tuberculós, independent del tipus de contacte, que alhora pot ser: íntim: diari i > 6 hores; freqüent: diari i < 6 hores; i esporàdic: no diari (Vidal i cols.,1997).

En l'ECC s'aplica el sistema de cercles concèntrics o el de la pedra a l'aigua (van Geuns,1975, Veen,1992) prenent com a centre el cas índex. L'estudi s'inicia en el primer cercle on s'investiguen les persones que tenen un risc més elevat, és a dir, els que conviuen amb un contacte de tipus íntim amb el cas índex. En el segon cercle s'estudien els contactes freqüents i, finalment, l'estudi arribarà al tercer cercle on es localitzant els contactes definits com esporàdics. Si en algú dels cercles es detecta un nou cas, cal començar de nou l'ECC prenent com a punt d'inici aquest nou cas.

L'ECC està subdividit en cinc etapes (UITB,1999):

*Fase I.* Conèixer les característiques dels malalts i dels contactes que cal estudiar. És important definir i identificar els potencials contactes estimant el risc d'infecció que han patit i s'ha de disposar de la següent informació:

a) del malalt: valor de la bacil·loscòpia, radiologia, tipus de simptomatologia, –especialment presència de tos–, temps transcorregut des de l'inici d'aquesta, tipus de relació amb els contactes: íntima, freqüent o esporàdica, antecedents de quimioprofilaxis o de TB prèvia i factors de risc: edat, UDVP, VIH, entre altres,

b) del contacte: lloc del contacte: casa particular: lloc de treball, escola, presó, centres d'acollida, entre altres; característiques d'aquest: volum, tipus de ventilació i altres; duració, intensitat i proximitat amb el malalt i factors de risc: edat, UDVP, situació immunològica, vacunació BCG, PPD, TB prèvia, quimioprofilaxis, entre altres.

*Fase II.* Cribatge tuberculínic dels contactes. S'ha de fer a tots els contactes que no demostrin una prova positiva prèvia. La metodologia i la valoració de la prova s'explica a l'apartat 2.4.

*Fase III.* Diagnòstic, tractament i seguiment dels contactes (apartat 3.2). Segons el resultat obtingut en la fase dos els contactes es classifiquen en:

a) no infectats: pels contactes de malalts amb bacil·loscòpia positiva cal repetir la prova del PPD a les 8-12 setmanes per descartar el període finestra i, realitzar una radiografia de tòrax en els contactes valorats com a íntims per descartar alguna lesió. Inici de quimioprofilaxis primària: administració d'INH durant 2-3 mesos, si passat aquest temps hi ha viratge tuberculínic i es descarta una TB activa, es considera que el contacte està infectat i es manté el tractament preventiu, –tractament d'ITL–.

b) infectats:

b.1) pels contactes amb PPD previ positiu cal fer-los una radiografia de tòrax per descartar malaltia activa,

b.2) pels contactes amb viratge tuberculínic també cal fer una radiografia per descartar la malaltia i valorar l'inici de quimioprofilaxis o tractament de la ITL en funció dels criteris clínics.

c) malalts: inici de tractament i de l'ECC entre els seus contactes.

*Fase IV.* Control dels contactes i recuperació dels que no han aconplit. Amb el full de registre de dades és important controlar a tots els contactes identificats, comprovar que segueixen el tractament indicat i intentar recuperar aquests que s'hagin perdut.

*Fase V.* Finalització de l'estudi i avaluació. L'ECC conclou quan s'han examinat a tots els contactes identificats, analitzat la necessitat de quimioprofilaxis o tractament de cadascun dels contactes i establert una conclusió final, –per ex: curat, perdut, entre altres–, a més, d'haver iniciat i acabat l'ECC dels casos secundaris descoberts durant l'estudi.

En països amb recursos sanitaris adequats és convenient que l'ECC es faci a tots els contactes de tots els malalts tuberculosos, amb TB pulmonar i extrapulmonar, i s'estudiïn els

contactes del joves, menors de 15 anys, PPD positius i els que han virat darrerament. Contràriament, en els països amb recursos limitats la prioritat és fer l'ECC a tots els malalts amb bacil·loscòpia positiva (UITB,1999).

---

## 2.10 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE LA TUBERCULOSI

L'habilitat per determinar les vies de transmissió de la TB i, així, poder definir els factors humans i ambientals associats amb el risc d'infectar-se amb *Mycobacterium tuberculosis*, s'ha trobat limitat per la tecnologia durant molt de temps. Fins fa, relativament pocs anys, només la fagotipificació i els patrons de susceptibilitat antibiòtica eren útils per a aquesta finalitat (Gruft i cols.,1984). L'aplicació de les tècniques de biologia molecular en la dècada dels noranta ha permès diferenciar les soques que circulen per la població amb un grau de fiabilitat major.

La primera aplicació de la biologia molecular en la identificació de les soques de *M.tuberculosis* es descriu en el treball de Collins i de Lisle (1984). Aquests van digerir l'ADN micobacterià amb enzims de restricció específics analitzant els fragments generats després de separar-los per electroforesi en un gel d'agarosa. Encara que van poder detectar diferències entre les soques clíniques, la necessitat d'utilitzar múltiples enzims de restricció, la complexitat dels patrons i la limitació de comparar els resultats dels diferents experiments va dificultar molt la seva aplicació. Però, van ser aquestes limitacions les que van estimular l'estudi i la recerca de variacions en la tècnica inicial. La principal innovació va ser la clonació de fragments concrets de l'ADN micobacterià que van ser emprats, després, com a sonda per a detectar fragments selectius de *Mycobacterium tuberculosis* aconseguits per l'acció dels enzims de restricció (Eisenach i cols.,1986).

L'anàlisi de seqüències de l'ADN repetides presents en el genoma en nombre i localització variable, va conduir a la identificació de distints elements d'inserció (Dale, 1995), en concret, la seqüència anomenada IS6110 de 1.355 bp (Thierry i cols., 1990, Cole i cols.,1998, 2002) ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) (apartat 1.1), element que pertany a la família de les IS3 dels enterobacteris (McAdam i cols.,1990). Posteriorment, es va comprovar que aquesta seqüència era específica de tots els membres del complex *M. tuberculosis* (Cave i cols.,1991). En el genoma micobacterià la presència de la IS6110 varia de 1 a 20 còpies (Cole i cols.,1998, 2002), malgrat que s'han trobat soques que presenten un nombre menor (< 5 còpies) o, fins i tot, sense cap còpia (van Soolingen i cols.,1991, Yuen i cols.,1993). Malgrat que existeixen altres elements genètics, la seqüència IS6110 s'ha esdevingut el principal marcador epidemiològic emprat per la tipificació molecular de les distintes soques de *M. tuberculosis*.



### 2.10.1 Tècnica de referència

El mètode de tipificació per *M. tuberculosis* més emprat i estandarditzat és la tècnica coneguda com RFLP associada, fonamentalment, a la seqüència IS6110 (van Embden i cols.,1993). Aquest mètode està basat en les variacions en el nombre de còpies de la seqüència abans esmentada i en la distribució d'aquest element dins del cromosoma micobacterià, així com en les variacions en els punts de restricció, –de tall–, que hi ha repartides per tot el genoma (Cole i cols.,1998).

Breument, la tècnica inclou cinc etapes (fig. 2.8):

**Extracció de l'ADN.** Es parteix d'una resembra de la soca crescuda en qualsevol dels medis habituals de creixement. L'extracció consisteix en una primera fase d'inactivació del micobacteri mitjançant calor i després es sotmet al microorganisme a l'acció de la lisozima durant tota la nit. La lisi es realitza en dos fases: s'afegeix SDS (**Sodi Dodecil Sulfat**) més proteïnasa K i, després d'una incubació de 15 minuts a 37º, s'afegeix CTAB (**hexadeCilTrimetil-Amonium Bromid**) i NaCl i es torna a incubar a les mateixes condicions. L'extracció del material genètic es fa amb cloroform/isoamílic (24:1) i es precipita l'ADN amb isopropanol.

**Digestió.** L'ADN, tant de la soca problema com de la soca de referència Mt14323 (van Embden i cols.1993), són digerits amb l'enzim de restricció *Pvu* (*Proteus vulgaris*) II a 37º durant tota la nit.

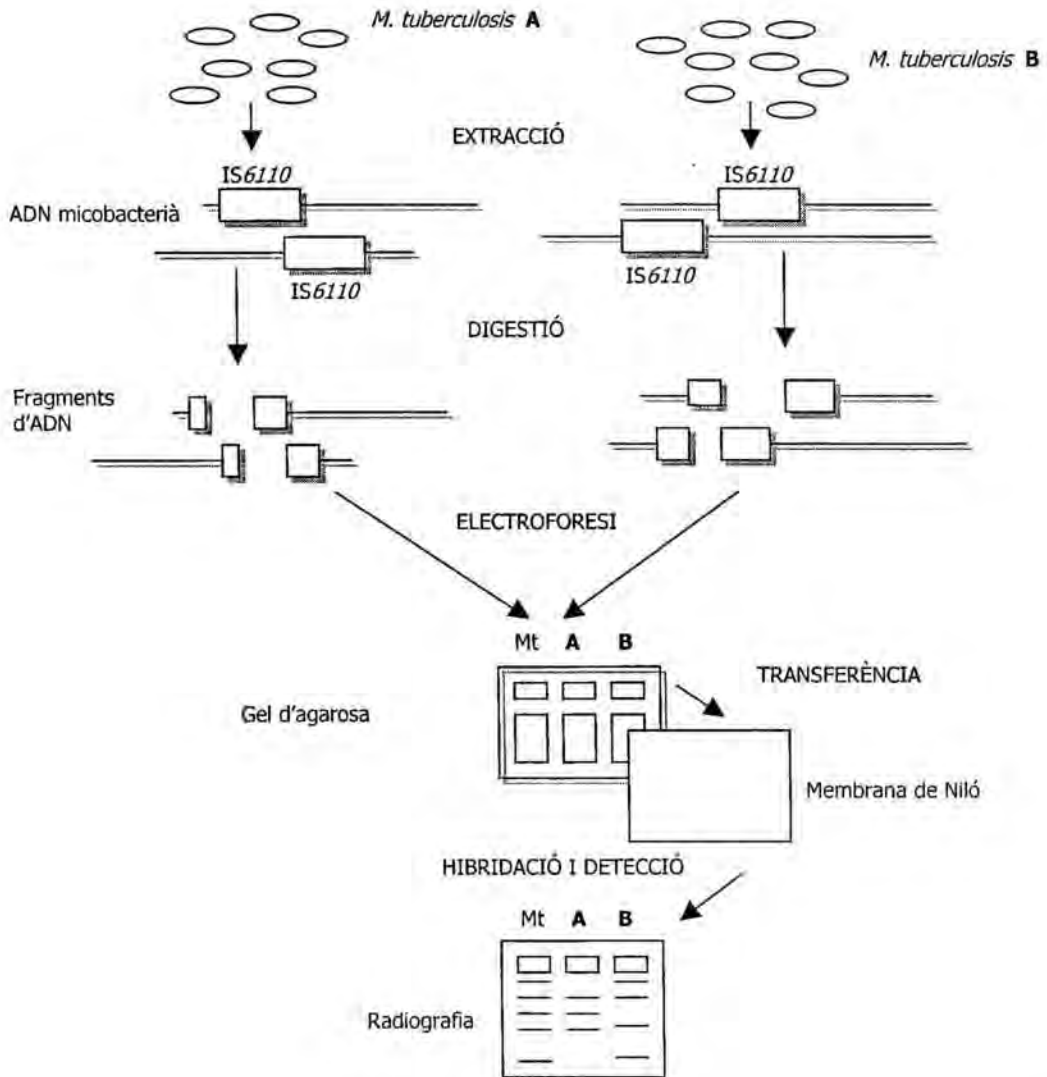
**Electroforesi.** Posteriorment, els fragments resultants més els marcadors interns, –DNA *supercoiled ladder* i  $\Phi$ X174 digerit amb *Hae* III–, són separats per una electroforesi molt lenta que durant tota la nit.

**Transferència.** Els fragments de l'ADN digerit i separats en el gel d'agarosa són transferits per *Southern Blot* a una membrana de niló.

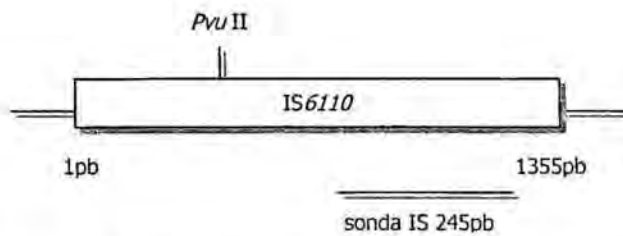
**Hibridació i detecció.** La hibridació consisteix en posar en contacte la membrana de niló i la sonda de 245 pb fragment de la IS6110 amplificat per PCR, –*primers* INS-1 i INS-2 (van Embden i cols.,1993)–, i posteriorment, purificat. Finalment, els fragments units específicament a la sonda són visualitzats amb un revelat per quimioluminiscència.

En el procés d'estandardització va ser essencial considerar tres elements: a) l'especificitat de l'enzim utilitzat, b) la sonda de l'ADN per la hibridació, i c) l'ús apropiat dels marcadors interns (van Embden i cols.,1993). Els grups de recerca que van desenvolupar la tècnica van aconsellar l'ús de l'enzim *Pvu* II perquè talla la IS6110 una sola vegada (fig. 2.9). També van recomanar emprar com a sonda d'hibridació la regió situada a la dreta del punt de tall de la seqüència IS6110 (fig. 2.9), i van aconsellar a més utilitzar marcadors interns que abracin mides de 0,9-10 Kb. Així, s'aconsegueix controlar les distorsions que puguin patir les bandes de l'ADN com a resultat de l'electroforesi i ajustar millor el pes molecular d'aquestes.





**Figura 2.8** Esquematzació de les etapes de la tècnica RFLP. (A/B: diferents soques de *M. tuberculosis*; Mt: soca de referència Mt14323 utilitzada com a marcador) (Adaptat de: van Embden i cols.,1993).



**Figura 2.9** Posició del punt de tall de l'enzim de restricció i de la sonda 245 pb en la seqüència d'inserció IS6110 (van Embden i cols.,1993)

La validesa i la utilitat dels marcadors genètics, en general, i en concret de la IS6110, depèn de la seva estabilitat en el genoma al llarg del temps. La situació és força contradictòria, doncs, marcadors que canvien massa ràpid poden provocar interpretacions errònies en els resultats obtinguts i associar lligams epidemiològics incorrectes, ara bé si els marcadors genètics són massa estables poden, també, associar lligams directes entre soques quan aquests no existeixen. Per tant, determinar la freqüència de canvi de la IS6110 és important per interpretar de forma òptima els patrons obtinguts. Diferents treballs han avaluat aquest fenomen des dels inicis de la tècnica (van Soolingen i cols.,1991) i, també, darrerament (Yeh i cols.,1998, de Boer i cols.,1999). Malgrat que els resultats a què arriben són lleugerament diferents, d'aquest treballs es pot extrapolar que la IS6110 té una estabilitat al voltant dels 3-4 anys, de manera que passat aquest període les soques tipificades podrien presentar diferències en els seus patrons de restricció.

La tècnica RFLP ha estat també aplicada en la tipificació de *M. tuberculosis* associada a altres marcadors epidemiològics diferents a la IS6110. Aquest és el cas de la PGRS i de les seqüències DR (**D**irect **R**epeat) (apartat 2.10.2) (March i cols.,1996).

La PGRS és un seqüència curta rica amb guanines i citosines present en múltiples còpies en el genoma de *Mycobacterium tuberculosis* (Cole i cols.,2002) (apartat 1.1) i altres espècies de micobacteris (Ross i cols.,1992). Malgrat aquest fet, la regió PGRS s'ha utilitzat com a sonda per la caracterització de soques de *M. tuberculosis*. En aquest cas, l'enzim utilitzat és l'*Alu* (*Arthrobacter luteus*) I que talla més sovint que el *Pvu* II. La correlació de resultats comparant els marcadors IS6110 i PGRS ha estat bona, si excloent les soques amb poques còpies de la primera, en aquestes la seqüència PGRS té un major poder de discriminació (Burman i cols.,1997, March i cols.,1996). El punt limitant d'aquest marcador està en què no és específic de *M. tuberculosis* i en el fet que té un polimorfisme menor respecte la IS6110.

En tot el cromosoma de *Mycobacterium tuberculosis* hi ha múltiples còpies de seqüències curtes, DR, organitzades en un *locus* cromosòmic únic, un *hot spot* d'integració per la IS6110 (Cole i cols.,1998). Aquestes seqüències DR repetides, entre 10 i 50 vegades (Hermans i cols.,1991) i de 36 pb es troben separades alhora per altres seqüències separadores diferents i no repetides de 34 a 41 pb (fig.2.10). Aquesta regió representa un polimorfisme en les diferents soques, probablement, degut a una recombinació homòloga entre DR properes o distants provocats per canvis en la localització de la IS6110 en aquesta zona. Aquest fenomen crea variacions en el nombre i en la posició de les DR i de les seqüències separadores de les distintes soques de *M. tuberculosis*. Això ha fet que aquest element genètic s'hagi utilitzat com a marcador epidemiològic associat a la tècnica RFLP (van Soolingen i cols.,1993, Sahadevan i cols.,1995) i, essencialment, a la tècnica *spoligotyping* (apartat 2.10.2).

### **2.10.2 Altres tècniques de tipificació i marcadors epidemiològics associats**

Malgrat que la tècnica RFLP és la més difosa i la que té un poder de discriminació més elevat (Kremer i cols.,1999), és clar, que presenta certes limitacions: la quantitat de l'ADN que es necessita per la tipificació; l'escàs nombre de còpies de la IS6110 (< 6) en algunes soques o, fins i tot, l'absència total d'ella; la relativa complexitat de la tècnica i la lentitud en l'obtenció dels resultats. Tot això ha fet que diferents autors s'hagin proposat la utilització de múltiples tècniques ràpides, basades en la tècnica d'amplificació PCR i, associades tant a la IS6110 com a altres elements genètics específics de *M. tuberculosis*, com són PGRS, DR, IS1081, entre altres.

Tot seguit es descriuen, breument, aquests mètodes:

*IS6110-Ampliprinting* (Plikaytis i cols.,1993). Aquest mètode detecta les diferències en la distància entre els marcadors IS6110 i MPTR, emprant una *nested* PCR unilateral i analitza el resultat amb una hibridació. Té un poder de discriminació limitat.

*Mixed-linker* PCR (Haas i cols.,1993). Es tracta d'un mètode desenvolupat immediatament després de l'estandardització de la RFLP-IS6110 i basat en el polimorfisme d'aquest mateix element genètic. La tècnica inclou a més d'una amplificació una lligació. La detecció dels fragments generats és fa amb un gel d'agarosa. El seu poder de discriminació és força elevat (Kremer i cols.,1999).

*DVR (Direct Variable Repeat)-PCR* (Groenen i cols.,1993). Mètode basat en el polimorfisme de la regió DR. Es fa una amplificació d'aquesta regió, –específica de la soca– generant un amplicó que serà hibridat amb una sonda de la mateixa regió DR. Té un bon poder de discriminació però l'estabilitat de la regió DR és elevada.

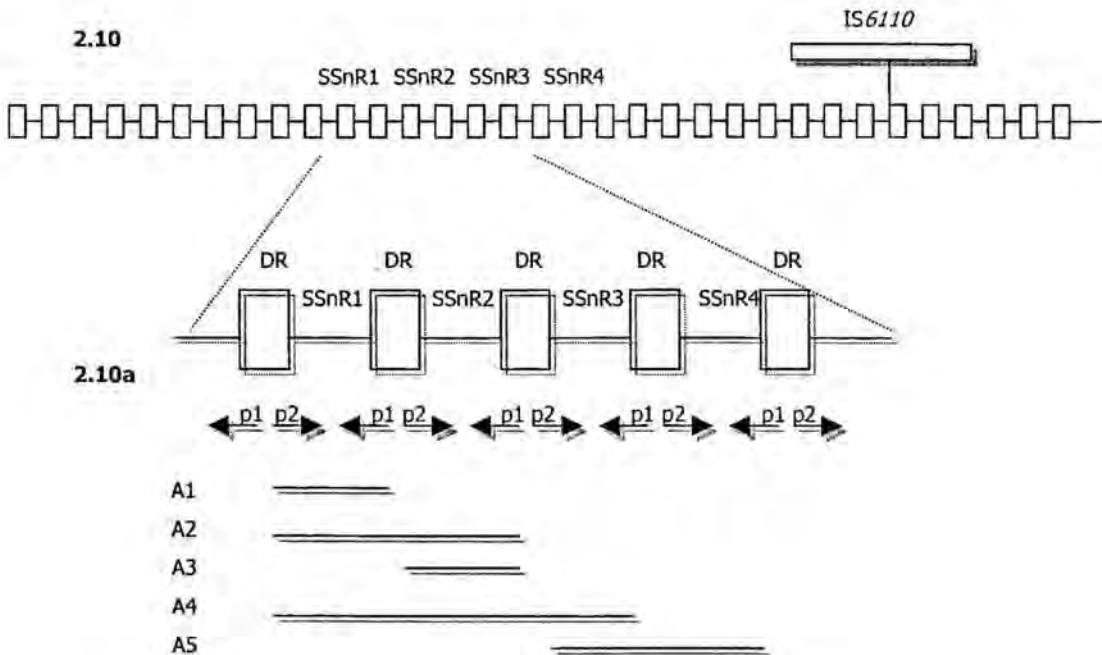
*DRE (Double-Repetitive Elements)-PCR* (Friedman i cols.,1995). És un mètode ràpid, on s'amplifica els fragments de l'ADN localitzats entre els elements IS6110 i PGRS. La detecció és fa en un gel d'agarosa o si és vol guanyar resolució en un gel de poliacrilamida. Té un poder de discriminació alt (Kremer i cols., 1999), i pot ser utilitzat per verificar els patrons d'una agrupació (García de Viedma i cols.,2002a).

*Ampli-typing* (Yuen i cols.,1995). Amplificació per PCR amb *primers* situats entre la seqüència IS6110. El patró de bandes generat es confirma amb una hibridació.

*RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)* (Abed i cols.,1995). Es tracta d'una amplificació a l'atzar emprant com a marcador molecular la regió que hi ha entre els gens 16S i 23S de l'ARNr. Això genera patrons que poden ser fàcilment analitzats. Té un poder de discriminació limitat.

*Hemi-nested inverse* PCR (Patel i cols.,1996). És un mètode senzill basat en una PCR que amplifica una part de la seqüència IS6110 conjuntament amb el seu lloc d'integració en el genoma. La tècnica ha demostrat tenir un bon poder de discriminació.

*Spoligotyping (Spacer oligo typing)* (Kamerbeek i cols.,1997). Aquesta tècnica està basada en la presència/absència de les seqüències separadores conegudes (apartat 2.10.1) (fig. 2.10). La primera part de la tècnica consisteix en una amplificació per PCR d'aquestes seqüències amb dos primers de 18 pb. D'aquesta manera s'obtenen productes de PCR, amplicons, de diferents mides (fig. 2.10a). En la segona fase, els amplicons generats abans són hibridats a sobre d'una membrana on s'hi han fixats, prèviament, 43 oligonucleòtics diferents, –37 corresponent a seqüències separadores no repetides de la soca de referència *M. tuberculosis* H37Rv i sis són seqüències procedents de la soca *M. bovis* BCG–. La detecció dels fragments es fa per quimioluminiscència. Amb el temps, aquesta tècnica s'ha esdevingut l'eina epidemiològica alternativa a la RFLP més utilitzada, especialment per la tipificació del genotipus Beijing.



**Figures 2.10** Esquema de la regió cromosòmica *hot spot* d'integració per la IS6110. **2.10a** Esquematització de la primera part de la tècnica *spoligotyping*. (SSnR: Seqüències Separadores no Repetides; p1/p2: oligonucleòtics de seqüència coneguda utilitzats com a primers; A1/2/3/4/5: amplicons de mides diferents produïts per la PCR) (Adaptat de: Kamerbeek i cols.,1997).

IS6110-PCR i IS6110-inverse-PCR (Otal i cols.,1997). La metodologia emprada inclou una amplificació directa per PCR en el primer cas i una amplificació, digestió i lligació en el segon. El marcador epidemiològic és la IS6110.

**VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) typing** (Frothingham i Meeker-O'Connell,1998). El mètode es fonamenta en la detecció del nombre de seqüències repetides en tàndem. En aquest cas, els *loci* ETR (**Exact Tandem Repeat**) de l'A fins l'E (Frothingham i Meeker-O'Connell,1998), un tipus de seqüències repetides, d'entre 53 pb i 79 pb de mida, que es pot trobar en tot el genoma del micobacteri. La presència i la mida dels amplicons generats es determina amb un gel d'agarosa, mentre que el nombre de repeticions es calcula en funció del coneixement previ que es té de la mida de les diferents seqüències repetides. Els resultats obtinguts són expressats com un codi de cinc dígits on cadascun d'ells representa el número de còpies del *locus* estudiat.

**FAFLP (Fluorescent Amplified-Fragment Length Polymorphism)** (Goulding i cols., 2000). Amb aquesta tècnica s'examina aproximadament el 0.1% de tot el genoma. No està associada al polimorfisme de cap element genètic. El polimorfisme està basat en el lloc on els enzims de restricció tallen el genoma. En aquest mètode, els *primers* de la PCR estan marcats amb una molècula fluorescent i, la visualització dels fragments produïts es realitza automàticament amb un seqüenciador de l'ADN.

**Ligation-Mediated-PCR** (Prod'hom i cols.,1997). Mètode d'amplificació on s'utilitzen *primers* de la IS6110 i *linkers*, -construïts per dos oligonucleòtids dissenyats per unir-se a fragments d'ADN roms produïts amb l'enzim *SaI* (**Streptomyces albus** G)I-, que s'uneixen a fragments de l'ADN micobacterià digerit amb l'enzim esmentat.

**MIRUs (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units)** (Supply i cols.,2001). Aquesta tècnica és similar a la descrita prèviament com VNTR *typing*. En tot el genoma de *M. tuberculosis* s'han identificat 41 seqüències repetides en tàndem diferents, els MIRUs (Supply i cols.,1997, Cole i cols.,1998), d'aquestes 12 són suficientment variables per a què puguin ser utilitzades com a marcador epidemiològic. L'amplificació per PCR de cada MIRU genera fragments de diferents mides. Llavors, aquests són mesurats determinant-se el nombre de cadascun dels *loci* repetits. D'aquesta manera cada tipus de soca té assignat un número de 12 dígits corresponent al nombre de repeticions de cada *locus* MIRU (Mazars i cols.,2001).

**RAPET (RAPid PCR Epidemiological Typing)** (Yates i cols.,2002). Mètode basat en una PCR realitzada amb un sol *primer* que amplifica les seqüències invertides i repetides de la IS6110.



### 2.10.3 Aplicacions

L'ús de les tècniques de tipificació molecular per a identificar les cadenes de transmissió de la TB dins d'una població, més o menys nombrosa, està fonamentat en la següent premissa: " els malalts epidemiològicament no relacionats desenvolupen TB com a resultat d'una reactivació d'una infecció latent, adquirida en el passat (apartat 2.3.1). Les soques de *M. tuberculosis* d'aquests malalts tenen un patró molecular únic, és a dir, un patró polimòrfic. Els malalts relacionats epidemiològicament desenvolupen TB com a conseqüència d'una infecció adquirida darrerament d'un altre persona malalta. Les soques aïllades d'aquests tenen un patró molecular idèntic, és a dir, patró no polimòrfic ". Així, es defineixen les *agrupacions* com aquells grups de malalts que pateixen TB causada per soques de *M. tuberculosis* que presenten un patró molecular de bandes idèntic i que, per tant, representen transmissió recent del bacil tuberculosos progressant ràpidament cap a la malaltia. Malgrat que moltes vegades no es pot determinar amb certesa, s'assumeix que un dels membres de l'agrupació és el cas índex, –el primer a manifestar l'afecció tuberculosa–, i els altres són casos secundaris, –infectats o malalts com a resultat d'un contagi del cas índex definit anteriorment–.

La combinació de mètodes moleculars de tipificació amb l'epidemiologia convencional és emprada per establir els possibles lligams en les cadenes de transmissió i, també, per identificar els grups de risc més susceptibles a emmalaltir, alhora que permet definir els factors de risc associats. D'altra banda, l'aplicació de les tècniques esmentades abans permet millorar el coneixement de la patogènia de la TB, així com la identificació de soques de *M. tuberculosis* amb característiques específiques, –per ex; virulència–.

#### 2.10.3.1 Transmissió en poblacions

Els estudis de poblacions evidencien la diversitat genètica de les soques de *M. tuberculosis* en diverses poblacions de diferents àrees geogràfiques i, en combinació amb l'epidemiologia convencional, permeten establir les cadenes de transmissió i els lligams entre els malalts que les constitueixen. En general, els estudis de poblacions són utilitzats com una mesura per diferenciar entre transmissió recent i reactivació de la infecció latent, segons la premissa prèviament esmentada.

##### 2.10.3.1.1 Transmissió recent i reactivació de la infecció latent

En l'última dècada han proliferat el nombre de treballs que estudien la dinàmica de transmissió de la TB en poblacions (taula 2.11). Tots ells mostren una gran heterogeneïtat en el

seu origen geogràfic, – pràcticament hi ha exemples de tots els continents–, en el nombre de soques/malalts tipificats, així com en el període d'estudi. Abans de l'aplicació de les tècniques moleculars s'estimava que un 10% dels malalts desenvolupaven TB com a resultat d'una transmissió recent (Small i cols.,1994). Aquesta idea, però, s'ha qüestionat en avaluar-se els resultats observats en els estudis de poblacions desenvolupats fins ara. En aquests, el grau de soques que es troben formant part d'un agrupació, indicant transmissió recent, presenta valors més grans que el citat anteriorment. La proporció de soques agrupades trobat en treballs desenvolupats a Europa oscil·la d'un 27.6% a 46%, a Amèrica la xifra ronda entre el 33% i al 48%, en el continent africà els valors comprenen d'entre el 33.5% al 45%, i a Àsia la proporció és menor, d'un 8% a un 38%, probablement degut a què el nombre de soques estudiades és també menor, fet que també s'observa a Oceania (4.7%).

Els estudis de poblacions i, especialment, l'ús de programes informatitzats d'anàlisi d'imatges han permès generar bases de dades que han possibilitat la comparació de les diferents empremtes genètiques de les soques de *M. tuberculosis*, amb les tècniques RFLP-IS6110 i *spoligotyping*, i aportar una visió global de la dinàmica de la transmissió de la TB, – el cas de *International Database. National Institute of Public Health and Environment (RIVM)*, Bilthoven, Països Baixos, o *National Tuberculosis Genotyping and Surveillance Network database*, Estats Units–. Així, per exemple, en un estudi amb soques aïllades a Etiòpia, Tunísia, i Països Baixos es va trobar que dues de les soques etiòpies presentaven el mateix patró molecular que dues soques aïllades als Països Baixos i, reciprocament, una soca holandesa compartia patró amb una soca originària de Tunísia (Hermans i cols.,1995).

#### **2.10.3.1.2 Correlació entre la epidemiologia convencional i la molecular**

La combinació de l'ECC i l'epidemiologia molecular és força complexa. La relació no és tan directa com d'un bon principi s'havia pensat. Quan s'investiga la connexió clínica, una vegada s'han establert les agrupacions, la proporció de lligams confirmats per la investigació de contactes en els diferents estudis varia molt, d'un 10% (Small i cols.,1994) a un 83% (van Soolingen i cols.,1999), passant per valors intermedis que ronden el 30%, 40% i 60% (taula 2.11). Sembla, doncs, que compartir el mateix patró molecular no significa necessàriament que hi hagi un lligam clar i, sobretot, directe entre els malalts. Moltes vegades l'estudi convencional no pot determinar el grau de transmissió que hi ha hagut amb contactes esporàdics, casuals o curts en el temps i fora dels cercles més propers. Sebek (2000) va estudiar la relació entre 784 malalts després de tipificar les seves soques, emprant el sistema dels cercles concèntrics (Veen,1992) (apartat 2.5.3.1).

**Taula 2.11** Estudis de poblacions representatius d'arreu del món

Ciutat/Regió/ País	Població estudiada	Període d'estudi	% Soques agrupades	% Lligams confirmats
<b>Berna, Suïssa</b> (Genewein i cols.,1993)	165	1 any	27.6 %	-
<b>Melbourne, Austràlia</b> (Dwyer i cols.,1993)	511	7 anys	4.7 %	-
<b>San Francisco, USA</b> (Small i cols.,1994)	473	1 any	40.2 %	10 %
<b>Nova York, USA</b> (Alland i cols.,1994)	104	3 anys	37.5 %	-
<b>Tanzània</b> (Yang i cols.,1995a)	134	7 mesos	33.5 %	-
<b>Dinamarca</b> (Yang i cols.,1995b)	245	1 any	31%	-
<b>Arkansas, USA</b> (Braden i cols.,1997)	235	1 any	33%	42%
<b>Sevilla</b> (Safi i cols.,1997)	175	3 anys	38 %	59.7 %
<b>Sud-àfrica</b> (Willkinson i cols.,1997)	246	1 any	45 %	15 %
<b>Zaragoza</b> (Samper i cols.,1997)	226	1 any	39.4 %	-
<b>Praga, Xèquia</b> (Kubin i cols.,1998)	75	4 mesos	29.3%	-
<b>París, França</b> (Guitérrez i cols.,1998)	272	1 any	34.9 %	-
<b>Cuba</b> (Diaz i cols.,1998)	160	1 any	48 %	-
<b>Windhoek, Namíbia</b> (Haas i cols.,1999)	263	1 any	47%	-
<b>Malàisia</b> (Dale i cols.,1999)	439	1 any	26.7 %	-
<b>Països Baixos</b> (van Soelingen i cols.,1999)	4266	5 anys	46 %	83 %
<b>Henan, Xina</b> (Park i cols.,2000)	64	-	12.5 %	-
<b>Mongòlia</b> (Park i cols.,2000)	25	-	36 %	-
<b>Hong Kong</b> (Park i cols.,2000)	14	-	14.2 %	-
<b>Corea</b> (Park i cols.,2000)	138	-	10.8 %	-
<b>Filipines</b> (Park i cols.,2000)	34	-	5.8 %	-
<b>Tailàndia</b> (Park i cols.,2000)	49	-	16.3 %	-
<b>Hanoi, Vietnam</b> (Park i cols.,2000)	50	-	28 %	-
<b>Barcelona, Ciutat Vella</b> (Solsona i cols.,2001)	165	1 any	46 %	27.2 %
<b>Israel</b> (Ravins i cols.,2001)	52	-	8 %	-
<b>Botswana</b> (Lockman i cols.,2001)	373	1 any	42 %	25 %
<b>Noruega</b> (Dahle i cols.,2001)	698	4 anys	22.3 %	-
<b>Hamburg, Alemanya</b> (Diel i cols.,2002)	398	2 anys	33.9 %	64.4 %
<b>Milà, Itàlia</b> (Moro i cols.,2002)	581	2 anys	41.1 %	16.1 %
<b>Etiòpia</b> (Bruchfeld i cols.,2002)	121	1 any	42.1 %	-
<b>Sud de l' Índia</b> (Narayanan i cols.,2002)	378	-	38 %	-

El resultat va indicar que per la majoria dels malalts la relació determinada pels patrons moleculars obtinguts no era ni directa ni clara amb els casos índexs, i la cadena de transmissió era difícil de completar. Aquesta mateixa observació es compartida per altres autors (van Soolingen i cols.,1999, Braden i cols.,1997, Solsona i cols., 2001). A més, altres treballs, desenvolupats en àrees rurals, observen patrons compartits entre malalts geogràficament dispersos, i amb escassa probabilitat de contacte previ (Godfrey-Faussett i Stoker,1992, Braden i cols.,1997, Picard,2000). És lògic pensar que probablement algunes de les soques que circulant, en una zona geogràfica determinada o en un país petit, siguin més prevalents i abundoses que altres. Aquest fet pot provocar interpretacions epidemiològiques errònies, en el sentit, que s'assignin lligams, –entre malalts amb soques amb empremtes genètiques iguals–, no reals.

### **2.10.3.1.3 La població immigrant en la transmissió de la tuberculosi**

L'impacte de la immigració en l'epidemiologia de la TB en la població d'una determinada zona s'ha rebut com una qüestió molt important pels sistemes de salut pública dels països receptors, majoritàriament països desenvolupats (apartat 1.3.3). Les estadístiques suggereixen que la població immigrant pot ser potencial transmissor de TB a la població nativa, doncs el nombre de TB diagnosticada entre el primer col·lectiu augmenta cada any, –a Barcelona de 1995 al 2001 va augmentar d'un 5% a un 32%, amb una taxa d'incidència superior al 100‰ (Balagué i cols.,2003, ASP,2003)–. Diversos autors descriuen, contràriament el que se sospitava, que la població nativa té una probabilitat més alta de ser transmissora de TB al col·lectiu d'immigrants que no pas a l'inrevés (Jasmer i cols.,1997) i, també, mostren que les empremtes genètiques de les soques entre ambdues poblacions són diferents (Yang i cols.,1995b, Borgdorff i cols.,1998). L'aplicació rutinària de l'epidemiologia molecular als Països Baixos durant un període de temps llarg va fer possible estudiar la transmissió entre persones de diferents nacionalitats. Es va definir un índex de transmissió, –nombre mig de casos de TB producte de una transmissió recent d'un potencial cas índex–, que es va utilitzar com una manera de quantificar la transmissió entre diferents subpoblacions (Borgdorff i cols., 1998). En un estudi similar a San Francisco l'índex de transmissió va ser més alt entre autòctons que entre immigrants (Borgdorff i cols., 2000). Aquest estudi mostren que definir les característiques de la transmissió entre diferents poblacions pot donar informació i reforçar o, fins i tot, modificar les mesures del control per la TB. Tot i aquestes dades, sembla lògic pensar que a mida que la població immigrant s'integri en el nou país, i amb el pas del temps, les soques d'aquests originàries del seu país s'incorporaran i començaran a circular entre la



població autòctona. Arribat aquest moment la població immigrant serà igual de contagiosa que la població nativa.

#### **2.10.3.1.4 Impacte de determinats clons arreu del món**

L'epidemiologia molecular ha demostrat que determinades soques aïllades en una determinada àrea geogràfica eren, també, detectades en països o zones més llunyanes (Hermans i cols.,1995) i, alhora, ha permès avaluar-ne l'impacte que aquestes tenen sobre el global de la població. L'any 1995, a l'àrea de Beijing, a la Xina, es va detectar un genotipus característic i d'ample difusió en la població nativa, on més del 85% de les soques tenien més d'un 66% de similitud en els seus patrons moleculars (van Soolingen i cols.,1995). Aquesta família de soques va ser definida com el genotipus *Beijing*. Amb l'ús del mètode *spoligotyping* aquest genotipus s'ha associat amb transmissió recent, a no solament la seva zona d'origen sinó també a la resta de països del món amb una prevalença força alta en la població: Àsia: d'un 92% a Beijing a un 34% a Jakarta, Indonèsia; Europa: d'un 71% a l'Azerbaidjan a un 3% als Països Baixos; Àfrica: un 12% al Senegal; i Amèrica: d'un 25% a Houston, Texas fins 1% a l'Illa Guadalupe, Carib (Glynn i cols.,2002, Bifani i cols.,2002, Filliol i cols.,2002). Posteriorment, a Nova York es va identificar una soca de *M. tuberculosis* MDR (apartat 2.10.3.3.1) (Bifani i cols.,1996). Aquesta soca va ser anomenada *W*, i és la responsable dels brots de TB MDR, detectats en altres zones dels USA (Agerton i cols.,1999). En la segona meitat dels noranta es va demostrar que la soca *W* representava una branca evolucionada del genotipus Beijing. Si aquesta família té una probabilitat més elevada d'adquirir resistència no se sap, però, sembla suggerir-ho el fet de trobar aquesta associació extensament distribuïda en diferents àrees geogràfiques (Glynn i cols.,2002). En el mateix sentit, les dades semblen suggerir que la família Beijing té un fort potencial d'expansió entre la població.

#### **2.10.3.1.5 Factors de risc associats a la transmissió recent**

L'aplicació de les tècniques de tipificació de *M. tuberculosis* a nivell de poblacions ha permès, també, identificar i caracteritzar epidemiològicament els diferents grups de persones amb alt grau de transmissió tuberculosa recent i els factors de risc –demogràfics, clínics i socials–, associats. L'estudi dels factors de risc és un qüestió que aporta molta informació, però, cal considerar-ne alguns aspectes, com el fet que aquests estan directament relacionats amb la població estudiada i el seu entorn. En els primers treballs desenvolupats a principi de la dècada dels noranta els factors associats van ser: homes, edat jove, persones sense sostre, alcohòlics, usuaris de drogues, origen hispà, nascut als USA, VIH positiu i nivell socioeconòmic baix



(Genewein i cols.,1993, Small i cols.,1994, Alland i cols.,1994). Estudis fets en altres àrees geogràfiques han confirmats alguns d'aquests factors, però, també, han trobat certes discrepàncies. Aquest és el cas del VIH que si bé en principi, i especialment pels brots de TB (apartats 2.10.3.2 i 2.10.3.3.1), estava fortament associat a transmissió recent, en els altres treballs no s'observa una correlació tan clara (van Soolingen i cols.,1999, Godfrey-Faussett i cols.,2000, Lockman i cols.,2001). El mateix passa amb altres factors com ara l'alcoholisme, la drogaaddicció o els sense sostre (March i cols.,2000). La resistència als fàrmacs antituberculosos, també, ha estat un factor molt important associat en molts treballs a la transmissió recent (Alland i cols.,1994, van Soolingen i cols.,1999, Moro i cols.,2002) (apartat 3.4.3), malgrat que en altres estudis no s'ha trobat la mateixa correlació (Small i cols.,1994). La revisió dels factors de risc en la literatura sembla indicar que les diferències trobades entre els diferents estudis es podrien explicar com a resultat de l'extensa variació en la fracció de casos avaluats, fet que, per sí mateix, ja comporta una certa desviació en les proporcions de transmissió recent. Conseqüentment, és molt possible que el conjunt de factors associats presentin, també, un grau de biaix que podria explicar aquestes diferències (Murray i Alland, 2002a).

#### **2.10.3.1.6 Reinfecció exògena i infeccions mixtes**

El fenomen de la reinfecció exògena ha estat una qüestió sospitada des de fa temps (apartat 2.5.3.3), tot i que no ha estat fins que s'ha disposat d'eines moleculars que s'ha confirmat (Small i cols.,1993, Das i cols.,1993, Shafer i cols.,1995, Sahadevan i cols.,1995, van Rie i cols.,1999a, Caminero i cols.,2001, García de Viedma i cols.,2002a). La reinfecció s'ha demostrat tant en malalts immunocompetents com immunodeprimits (Shafer i cols.,1995, Small i cols.,1993) i, també, s'han descrit casos de reinfecions amb soques resistents quan prèviament els malalts havien patit una TB amb soca sensible (Small i cols.,1993).

En zones d'alta incidència de TB, amb un elevat percentatge de coinfecció pel VIH, el fenomen de la reinfecció és un factor important. Aquest és el cas d'un estudi desenvolupat a Sud-àfrica on dels 16 casos amb segon episodi de TB, 12 (75%) presentaven patrons moleculars diferents (van Rie i cols.,1999a). Altres estudis a Hong-Kong i l'Índia observen valors de reinfecció que ronden del 12-31% (Das i cols.,1993, Sahadevan i cols.,1995), i a l'illa de Gran Canaries el 44% dels casos van ser atribuïbles al mateix fenomen (Caminero i cols.,2001). És possible que en el futur el coneixement del grau de reinfecció en diferents llocs pugui influir en les estratègies de control de la malaltia.

Les tècniques de biologia molecular també han demostrat l'existència d'infeccions mixtes per dues soques de *M. tuberculosis* amb patrons de susceptibilitat diferents (Pfyffer i cols., 1998, Chaves i cols., 1999).

#### **2.10.3.1.7 Vigilància epidemiològica**

Les tècniques d'epidemiologia molecular són una bona eina per la vigilància epidemiològica, en el sentit que poden ser útils per detectar casos de transmissió no sospitada, –microepidèmies–, tant en llocs delimitats, –un hospital, un centre d'acollida, entre altres–, com en determinats segments de la població (Lemaître i cols., 1998, French i cols., 1998). Aquest fet comporta la possibilitat d'inferir en les cadenes de transmissió, alhora que permet aplicar les mesures de prevenció i control corresponents.

#### **2.10.3.1.8 Avaluació dels programes de control**

La tipificació de soques a nivell de població general pot ser emprada com una eina per avaluar la eficàcia en les millores dels programes de control d'una ciutat o, fins i tot, d'un país. Com s'ha esmentat prèviament, la incidència de transmissió recent es pot mesurar pel nombre de soques agrupades, per tant, la constatació d'una disminució en el nombre d'aquestes en períodes successius d'estudi implica que les mesures establertes per reduir la transmissió de la TB són eficaces (Jasmer i cols., 1999)

#### **2.10.3.2 Transmissió en institucions tancades**

La transmissió de la TB es pot produir a qualsevol lloc, però, el conjunt de factors que es donen a la vegada en determinats llocs o en determinades poblacions, incrementen les possibilitats provocant un augment del risc de microepidèmies. Per aquest raó és important el seu estudi i l'aplicació de l'epidemiologia molecular conjuntament amb la convencional, amb la finalitat de millorar-ne les mesures de prevenció i de control.

##### **2.10.3.2.1 Hospitals**

Teòricament, la transmissió nosocomial pot presentar-se entre malalts, de malalt a personal sanitari i al revés (Edlin i cols., 1992, Pearson i cols., 1992). El principal risc són les exposicions al bacil a causa de la presència de malalts de TB encara no diagnosticats, però, sospitats o bé ingressats per altres causes i sense cap sospita de TB. En la literatura s'han descrit nombrosos brots de caràcter nosocomial, alguns d'ells sospitats i d'altres no, que les

eines d'epidemiologia molecular han permès de detectar i confirmar. Les àrees hospitalàries més afectades han estat les sales de malalties infeccions, unitats de trasplantament, de medicina interna, entre altres. Les taxes de transmissió recent trobades, en aquests estudis, superen el 60% i arriben a quasi un 90% (Edlin i cols.,1992, Pearson i cols.,1992, Jereb i cols.,1993, Coronado i cols.,1993, Frieden i cols.,1996). La gran majoria d'aquests brots estan associats a soques resistents (Edlin i cols.,1992) i MDR (Pearson i cols.,1992, Coronado i cols.,1993, Frieden i cols.,1996), així com a malalts VIH positius (Coronado i cols.,1993, Frieden i cols.,1996, Rullan i cols.,1996) (apartat 2.10.3.3.1). La correlació entre epidemiologia molecular i convencional observada ha estat força elevada, al voltant d'un 70%. La implementació d'unes mesures preventives correctes, especialment en les àrees de més risc, – urgències, sales d'infeccions, sala de broncoscòpies i altres–, és una qüestió prioritària en aquest àmbit (OMS,1999a).

#### **2.10.3.2.2 Presons**

Les presons i la població reclusa constitueix un dels llocs i dels grups de risc més important per a la transmissió de la TB, tant per les seves característiques socials i clíniques, – VIH, UDVP, entre altres–, com per les condicions mediambientals, –de massificació, deficiències en la ventilació i altres factors–, i fins i tot de tipus administratiu, com l'elevada mobilitat de presos que acostumen a patir aquestes institucions (Valway i cols.,1994, March i cols.,2000). Diferents treballs realitzats amb aquest col·lectiu han evidenciat la importància de l'ús de les tècniques moleculars i de l'ECC per la detecció de les cadenes de transmissió dins i fora de la presó i, també, la detecció de brots de TB amb soques sensibles o MDR (Valway i cols.,1994, Chaves i cols.,1997, March i cols.,2000). En aquest estudis, la proporció de transmissió recent és molt elevada, d'un 51% (March i cols.,2000) a un 74% (Chaves i cols.,1997), xifres més altes que les observades en estudis desenvolupats en poblacions generals (taula 2.11) (apartat 3.10.3.1.1). L'avaluació d'aquestes xifres indiquen que la TB representa un problema molt seriós no només pels centres penitenciaris, sinó també per la població on els presos són alliberats. Pel que fa als factors de risc, la història prèvia de presó i el temps d'empresonament, semblen ser les variables més importants associades a transmissió recent (Chaves i cols.,1997, March i cols.,2000). En aquest context, és especialment important la implementació de programes de prevenció i control seguint les recomanacions dels organismes oficials (OMS,2001).

### **2.10.3.2.3 Poblacions marginades i centres d'acollida**

Els sense sostre o indigents són una subpoblació molt peculiar, de difícil accés i control. Donada la seva mobilitat, els malalts indigents i els seus contactes en la població general, són un reservori important per la TB. A més, en els centres d'acollida, on aquest col·lectiu hi fa estada, la TB, també, hi està molt present. En aquest ambient el nombre de factors de risc que potencien la transmissió són elevats, –alcoholisme, drogoaddicció, desnutrició, falta d'higiene, entre altres–. Les taxes de transmissió recent observades en diferents estudis oscil·len del 50% a quasi el 95%, associades sempre a brots en alguns casos sospitats i en d'altres no (van Soolingen i cols.,1991, Dwyer i cols.,1993, Barnes i cols.,1996, Lemaître i cols.,1998, Gutiérrez i cols.,1998). Són xifres molt elevades respecte a les de la població general (taula 2.11) (apartat 3.10.3.1.1). El nexa d'unió, més freqüent entre els malalts agrupats, sol ser haver compartit estada en algú dels centres d'acollida que hi ha per aquesta subpoblació urbana (Dwyer i cols.,1993, Lemaître i cols.,1998).

Altres estudis han descrit brots en llars per malalts VIH positius on s'observa una elevada taxa de transmissió recent, 80%, i es detecta un lligam epidemiològic comprovable en el 70% dels casos (Daley i cols.,1992). A més, aquest treballs van establir la ràpida progressió de la TB en aquest tipus de malalts, –12 pacients van emmalaltir en 106 dies (apartat 2.7.2)–.

### **2.10.3.3 Transmissió de soques resistents**

Saber si les soques resistents tenen la capacitat disminuïda per a produir infecció o malaltia és una pregunta, ara per ara, sense resposta. Tan aviat com es va introduir la INH en el tractament de la TB (apartat 3.1) es va començar a detectar resistències a aquest fàrmac, per això, aquesta resistència és la més freqüent i, majoritàriament, està implicada en els casos que presenten resistència a més d'un fàrmac. Tradicionalment, s'ha cregut que les soques resistents són menys transmissibles que les sensibles, ja que les resistències poden provocar alteracions en la viabilitat metabòlica del micobacteri, malgrat els efectes compensatoris a les mutacions que el bacteri posa en marxa (apartat 3.4.5). Aquesta creença està fonamentada en certes observacions com ara:

- a) les soques resistents de malalts crònics no generaven casos nous perquè desapareixen en morir al seu portador,
- b) en les soques aïllades en malalts prèviament tractats (apartat 3.4) predominen les resistències a més d'un fàrmac, mentre que el tipus de resistència detectada entre casos nous és essencialment monoresistent,



c) des dels inicis es va posar de manifest, experimentalment, que les soques resistents a la INH eren menys patògenes, fenomen atribuït a una reducció o anul·lació de l'activitat de l'enzim catalasa-peroxidasa (Middlebrook i Cohn,1953), el què va provocar que es relacionés aquest enzim amb la virulència dels bacils. Posteriorment, Zhang i cols., (1992) van demostrar que en una proporció significativa d'aquestes soques, la resistència a la INH estava associada a mutacions en el gen *katG* (apartat 3.4.4.2.1), i que la pèrdua de l'activitat catalasa-peroxidasa era la responsable de la inactivació de la INH, evidència que afavoria, la persistència intracel·lular del micobacteri. Des d'aquest moment s'ha associat la pèrdua d'activitat catalasa-peroxidasa per mutació en el gen *katG* i una CMI elevada, amb resistència i amb una disminució de la capacitat de transmissió. Darrerament, però, s'han descrit soques sense activitat catalasa-peroxidasa i CMI elevada, amb el gen *katG* intacte fet que suggereix la possibilitat de què sigui el grau de resistència i no el lloc de la mutació el factor que determinaria la capacitat de transmissió de les soques (Lonca i cols.,2002).

En la recerca a la qüestió de si les soques resistents són menys transmissibles que les soques sensibles, s'ha emprat l'ECC, en el sentit que s'ha avaluat el nombre de seroconversions, –PPD positius i/o casos de TB clínica–, entre els contactes de malalts que presenten els dos fenotipus. Amb aquesta metodologia, Snider i cols., (1985) no va trobar diferències significatives entre ambdós grups i, en un altre estudi posterior es va observar que la prevalença d'ITL i progressió a TB activa eren comparables en els dos grups (Teixeira i cols., 2001).

L'epidemiologia molecular, també, s'ha emprat en l'estudi de la dinàmica de la transmissió de soques resistents i MDR estimant el grau de transmissibilitat de les soques sensibles i resistents. Amb aquesta finalitat, els diferents estudis generats han comparat la freqüència i la mida de les agrupacions segons el patró de sensibilitat antibiòtica. Els resultats que aporten aquests treballs varien força tot i la similitud de les poblacions descrites. Aquest és el cas de dos estudis desenvolupats a Nova York i a San Francisco, on si bé el primer troba una associació entre resistència i agrupació, –transmissió recent–, el segon no (Alland i cols.,1994, Small i cols.,1994). En un altre treball, les soques resistents a la INH van ser menys probable d'estar agrupades respecte a les sensibles (van Soolingen i cols.,1999). Això suggereix que les soques amb resistència a la INH tenen reduïda l'habilitat de generar nous casos, ja sigui per infectar com per emmalaltir després de la infecció. Ara bé, quan els autors de l'estudi van considerar el tipus de mutació associada amb la resistència a la INH, –en aquest cas mutació puntual en el gen *katG* (apartat 3.4.4.2.1)–, les soques amb mutació al codó (c) 315 Serina-Treonina (**Thr**), van ser més freqüents de formar agrupacions que aquelles soques que presentaven un altre tipus de mutació (van Soolingen i cols.,2000). Altres treballs, però,



contradiuen aquesta observació (Marttila i cols.,1998). En la mateixa línia, l'epidemiologia molecular ha intentat estimar la proporció de casos de TB resistents produïts com a conseqüència de la transmissió d'aquestes soques i la proporció de casos produïts com a resultat d'un fracàs terapèutic, sota la premissa que les soques MDR són el resultat d'una teràpia inadequada. L'avaluació d'aquest estudi no semblen aportar una idea clara de la situació, però, suggereixen que poder caldria redefinir el terme fracàs terapèutic (van Rie i cols.,2000, Kruuner i cols.,2002).

Molt probablement caldria tenir present altres factors, com la duració i intensitat de l'exposició (apartat 3.1), la resposta immune de la persona (apartat 2.3), les característiques pròpies del bacil (apartat 2.5.4), i la seva viabilitat metabòlica (apartat 3.4.5), alhora d'avaluar la capacitat de transmissió de les soques resistents.

#### **2.10.3.3.1 Brots amb soques multiresistents**

Durant els primers anys de la dècada dels noranta es van detectar brots amb soques MDR a diferents hospitals de la ciutat de Nova York on hi estaven involucrats, majoritàriament, malalts VIH positius. El grau de mortalitat en aquest cas va ser extremadament alta, –més del 80%–, provocat per la pròpia immunodeficiència dels afectats i agreujada per la resistència als fàrmacs antituberculosos que presentava la soca de *M. tuberculosis* (Edlin i cols.,1992, Coronado i cols.,1993, Tabet i cols.,1994, Frieden i cols.,1996). Més tard, els brots de TB MDR s'esdevingué un fenomen observat a altres llocs d'arreu del món. A Madrid, també, se'n va descriure un, de caràcter nosocomial, que va afectar a 48 malalts infectats pel VIH (Rullan i cols.,1996). Les característiques dels malalts implicats en aquests brots, malalts VIH positius, va fer creure que la seropositivitat pel virus era, clarament, un factor que amplificava, accelerava i caracteritzava aquests brots. Posteriorment, la força d'aquesta idea va decaure i en la literatura s'ha descrit transmissió de soques MDR, –tipus U, una soca de la família W–, entre malalts immuno-competents i, a més, no localitzats en institucions tancades (van Rie A i cols.,1999b). En l'actualitat és força preocupant l'elevat nombre de soques resistents i MDR, entre casos nous, que s'han detectat a les ex-repúbliques soviètiques, –per ex: 10.2% a Estònia i 14.4% a Letònia–, (apartat 3.4) (OMS/UICTMR,2000).

#### **2.10.3.4 Contaminacions en el laboratori**

Les tècniques d'epidemiologia molecular s'han aplicat també en la detecció de contaminacions creuades entre mostres processades al laboratori (Burman i Reves.,2000). Alguns autors han evidenciat, així, l'existència de cultius positius de *M. tuberculosis* que han resultat ser falsos positius, producte d'una contaminació durant la manipulació en el

processament de les mostres. En general corresponen a mostres úniques de malalts sense una simptomatologia clara de TB, amb bacil·loscòpia negativa i cultiu positiu, processades el mateix dia que d'altres mostres, amb bacil·loscòpia i cultiu positiu, les quals un cop tipificades mostren patrons genètics idèntics. Les conseqüències d'aquest tipus de contaminacions són importants tant des del punt de vista mèdic, per l'endarreriment en l'autèntic diagnòstic que aleshores pot resultar més greu i, també, per l'inici de tractaments innecessaris amb riscos de toxicitat, així com per l'aspecte econòmic (CDC,1997b).



## EL TRACTAMENT DE LA TUBERCULOSI

La història dels fàrmacs antituberculosos i, conseqüentment, del tractament de la TB va començar en la segona meitat del segle passat, quan Albert Schatz, becari predoctoral, va descobrir l'SM (1944). Un any abans Jorgen Lehmann havia descobert el PAS. Un dels moments més importants, però, va sé quan Gerhart Domagk desenvolupà la INH (1952), antibiòtic bàsic en la lluita contra la malaltia. En el mateix any, Kushner i cols., van sintetitzar la PZA, tot i que la seva inclusió en el tractament antituberculós no va ser fins els anys vuitanta. L'any 1968 científics dels laboratoris Lederle descobriren l'ETM i, finalment, l'any 1972 es sintetitzar l'altre fàrmac bàsic en el tractament actual de la TB, la RIF.

### 3.1 FONAMENTS BACTERIOLÒGICS DEL TRACTAMENT ANTITUBERCULÓS

El tractament de la TB és relativament senzill, ara bé, degut a les característiques del bacil, qualsevol petita alteració pot conduir al fracàs. El coneixement dels fonaments bacteriològics que regeixen la teràpia permet entendre perquè el tractament està associat a diferents antibiòtics i perquè és necessari que duri alguns mesos.

En primer lloc, el tractament s'associa a l'administració de diferents fàrmacs per a arribar a tots els tipus de poblacions bacil·lars que hi ha en les lesions tuberculoses i, així, evitar l'aparició i selecció de resistències que inutilitzen per sempre aquests antibiòtics (apartat 3.4.1).

En segon lloc, el tractament és llarg per a poder eliminar les diferents poblacions de bacils i evitar les recidives. Durant la dècada dels vuitanta, Mitchison (1985) va definir les bases del tractament estàndard, –sis mesos i tres fàrmacs–. Ho va fer a partir de les evidències obtingudes de models experimentals, tant *in vivo* com *in vitro*, així com de les experiències clíniques observades. D'entre les primeres es destaquen els models *in vitro* que simulen la presència de bacils responsables dels "brots" de creixement. Paral·lelament, els estudis sobre l'activitat bactericida inicial dels fàrmacs, –*early bactericidal activity*–, van posar de manifest l'elevada activitat destructora dels fàrmacs en iniciar-se el tractament quan hi ha una forta presència de bacils en creixement logarítmic. En la seva hipòtesi, Mitchison va descriure la presència de quatre poblacions bacil·lars en les lesions i va definir tres fases en el tractament de la TB:

*Població A.* Es tracta d'una població metabòlicament activa, extracel·lular, que creix en pH neutre i tensió d'oxigen elevada. Representa la major part de la població bacteriana  $10^7$ - $10^9$  de la lesió, que es detecta en l'expectoració dels malalts. El fàrmac més actiu per aquesta és la INH, la RIF i SM ho són en menor grau. És la població responsable dels fracassos al tractament i del desenvolupament de resistències. *Fase I.* De 2 a 3 dies de duració on aproximadament el 90% de la població bacil·lar extracel·lular dels granulomes cavitats és destruïda ràpidament per la INH (RIF, SM).

*Població B.* Bacteris que creixen en pH àcid i medi intracel·lular en nombre de  $10^3$ - $10^5$ . Tenen poca activitat metabòlica i resulten difícils d'eliminar. És la població responsable de les recidives mesos o anys després d'acabar el tractament. *Fase II.* Dos mesos de duració. En les lesions cavitades hi ha un procés inflamatori suficientment important com per a que la majoria de la població extracel·lular estigui sota un pH àcid, permeten l'activitat de la PZA. Al final d'aquesta fase la gran part dels bacils restants són fagocitats pels macròfags i passen a ser intracel·lulars.

*Població C.* Es troba en les lesions casioses, multiplicant-se esporàdicament i a un pH neutre amb nombre de  $10^3$ - $10^5$ . Població responsable de les recaigudes després de la acabament de la teràpia. *Fase III.* Quatre mesos de duració, on les poblacions semilatenents de bacils són destruïdes per la RIF. En aquesta fase el pH en les lesions no és el suficientment àcid i la PZA deixa de ser bactericida.

*Població D.* És poc nombrosa i es troba en fase de latència controlada pel sistema immune que constituirà les lesions post-infecció. És la població responsable de les reactivacions endògenes i no és susceptible als fàrmacs.

Malgrat que la teoria exposada per Mitchinson no dona resposta a totes les preguntes, – per ex: quin afecte té el tractament de la ITL en la *població D* que, teòricament, no és susceptible a l'acció dels antibiòtics –, sí que posa de manifest la importància del metabolisme dels bacils en la resposta al tractament.

Els fàrmacs antituberculosos poden ser bactericides o esterilitzants. Els primers provoquen l'eliminació ràpida i inicial de la població en creixement actiu, *població A*. La capacitat bactericida es pot avaluar amb el percentatge de negativització dels cultius al final del segons mes de teràpia. La capacitat esterilitzant es produeix sobre bacteris en fase de creixement lent, *població B* i *C*. L'activitat esterilitzant pot quantificar-se amb el nombre de recaigudes després de completar el tractament. Els dos antibiòtics que tenen major activitat esterilitzant són la RIF i la PZA, mentre que la INH té la màxima capacitat bactericida. La base del tractament actual de la TB és la combinació dels fàrmacs amb elevat poder bactericida, INH i RIF i, esterilitzant, RIF i PZA.

---

### **3.2 EVOLUCIÓ DE LES PAUTES DE TRACTAMENT**

La primera sèrie de casos de TB tractats amb SM va ser publicada l'any 1945 per Hinshaw i Feldman i, dos anys després va començar la primera prova clínica supervisada pel *British Medical Research Council* (BMRC,1948). Aquest mateix organisme va coordinar, també, un assaig inclouen l'ús de l'SM sola, PAS sol i els dos antibiòtics alhora (BMRC,1950). Els resultats obtinguts van demostrar que l'opció combinada dels fàrmacs era molt més efectiva que l'opció individual (apartat 3.1). Posteriorment, es va introduir la INH en la teràpia antituberculosa. La anomenada *teràpia triple* va demostrar ser efectiva en els 90-95% dels malalts malgrat que el tractament s'havia de seguir durant 24 mesos (BMRC,1955). En els anys setanta es va substituir el PAS per l'ETM, fet que va tenir dos beneficis, primer, es va reduir el tractament a 18 mesos i, segon, la tolerància al ETM va ser molt millor que la del PAS (Doster i



cols.,1973). Ara bé, l'avenç més important en la teràpia antituberculosa va ser la introducció de la RIF. Aquest fàrmac és un derivat de *Streptomyces mediterranei* i va ser provat molt aviat per la *British Medical Research Council* a l'est d'Àfrica (EA/BMCR,1976) i a Hong Kong (HKCS/BMRC,1979), demostrant que les combinacions de INH, SM, ETM i RIF podien curar més del 95% dels casos entre 8 i 9 mesos. El darrer pas important en el tractament de la TB va ser la inclusió de la PZA, combinant-se amb la INH i la RIF, el que va permetre una reducció en el període de temps a 6 mesos mantenint les mateixes taxes de curació, >95% (HKCS/BMRC,1979, HKCS/BMRC,1982, STS/BMRC,1986).

---

### **3.3 PAUTES ACTUALS DE TRACTAMENT**

Des de la introducció dels fàrmacs antituberculosos es va posar de manifest la falta d'acompliment dels tractaments i, en les dècades dels 50-60, en els programes de control de Madràs, Índia, i Hong Kong, es va començar a definir les bases del DOT (Bayer i Wilkinson, 1995), tot i que el seu origen, encara ara, resulta polèmic (Mitchison i Sbarbaro,1998, Farga, 1999).

El DOT és l'observació de com el malalt ingereix la medicació antituberculosa assegurant-se de què s'ha produït la deglució dels fàrmacs. Aquest mètode constitueix l'eix fonamental en el control de la TB, l'anomenada estratègia DOTS, encara que la seva distribució mundial és bastant heterogènia (apartat 1.4).

El sistema DOT contribueix a millorar el tractament, tant de la infecció com de la malaltia. En aquest sentit, els organismes oficials recomanen la seva aplicació en institucions i unitats amb capacitat de diagnòstic i/o tractament de la TB. Prioritàriament:

- a) col·lectius de risc: usuaris de drogues, presos i ex-presos i indigents,
- b) malalts amb soques MDR,
- c) persones que tenen antecedents d'abandonament o d'alcoholisme, i
- d) tractament intermitent en els nens (UITB,2000).

#### **3.3.1 Infecció tuberculosa latent**

Tota persona que no presenta manifestacions clíniques, radiològiques i microbiològiques de TB i que, alhora, presenti la prova de la tuberculina positiva es considera que té una infecció latent (apartat 2.4). El tractament de la ITL, –també quimioprofilaxis secundària o tractament preventiu–, té l'objectiu de prevenir el desenvolupament de la infecció cap a malaltia en

aquelles persones prèviament infectades. A més, aquest, pot ser una eina important si s'utilitza en l'estratègia de control de la TB. Està indicada en persones de qualsevol edat segons les següents situacions:

- a) persones coinfectades amb el VIH,
- b) malalts infectats pel VIH, PPD negatiu però amb una prova prèvia positiva, – anèrgics–, i que hagin estat en contacte amb un pacient bacil·lífer,
- c) persones PPD positiu que conviuen amb el cas o amb contacte pròxim amb malalts bacil·lífers,
- d) tots els nens de menors de cinc anys amb PPD positiu,
- e) qualsevol persona amb viratge tuberculínic en els dos últims anys,
- f) persones PPD positives amb antecedent de patologies que incrementin el risc de patir TB (apartat 2.7), i
- g) homes menors de 35 anys, dones inferiors als 20 anys i persones vinculades a llocs d'alt risc (UITB,1999).

Les diferents pautes de tractament es descriuen a la taula 3.2. En general, les alternatives a la pauta clàssica d'INH, utilitzen dos o més fàrmacs sobretot RIF i PZA, tot i que, darrerament, alguns estudis han observat una elevada toxicitat en malalts tractats amb aquests antibiòtics (Jasmer i Daley, 2003). L'objectiu és millorar l'adherència al tractament i reduir el temps d'administració a 2 o 3 mesos. És important que les pautes amb fàrmacs combinats siguin administrats amb el sistema DOT, donat que s'utilitzen antibiòtics de primera línia i en períodes de temps curts (UITB,2000).

**Taula 3.2** Pautes de tractament de la infecció tuberculosa latent

Pauta	Dosificació	Duració total del Tt.	Observacions
<b>INH</b>	diària	6 mesos en VIH- 9-12 mesos en VIH+	- -
	2 dies/setmana	6 mesos en VIH- 12 mesos en VIH+	- -
<b>RIF+PZA</b> <sup>1</sup>	diària 2 dies/setmana	2 mesos	
<b>INH+RIF</b>	diària	3 mesos	Interaccions amb IP, MDA, ITINN
<b>INH+RIF+PZA</b> <sup>1</sup>	diària	3 mesos	

<sup>1</sup> pauta amb elevada toxicitat. (Adaptat de: UITB,2000, ATS,2000a) (Tt: Tractament, IP: Inhibidors de la Proteasa, MDA: MetaDonA, ITINN: Inhibidor de la Transcriptasa Inversa no aNàleg de Nucleòsid).

En malalts VIH positius la monoteràpia amb INH és més llarga, de 9 a 12 mesos, i en el cas d'administrar les pautes curtes cal tenir en compte les interaccions farmacocinètiques entre les rifamicines i els antiretrovirals. En aquests casos o bé es pot endarrerir l'inici del tractament antiretroviral fins que s'hagi acabat el tractament de la ITL o bé combinar ambdós tractaments utilitzant els antiretrovirals recomanats (UITB,2000).

### 3.3.2 Malaltia

Respecte al tractament de la malaltia, la pauta continuada de sis mesos és la més emprada i recomanada (OMS,2003a) i es considera el tractament estàndard en casos nous (taula 3.3). Qualsevol tipus de pauta consta d'una fase d'inici on s'administren tres o quatre fàrmacs, - INH, RIF, PZA, ETM o SM-, durant dos mesos i d'una fase de consolidació amb INH i RIF mínima de quatre mesos més. L'eficàcia d'aquesta combinació està basada en l'elevat poder bactericida i esterilitzant dels antibiòtics utilitzats (apartat 3.3).

**Taula 3.3** Pautes actuals de tractament per casos nous amb soques sensibles

Pautes continuades			
Pautes	Fase d'inici	Fase de consolidació	Duració total del Tt.
<b>Estàndard</b>	2 INH, RIF, PZA <sup>1</sup>	4 INH, RIF	6 mesos
	2 INH, RIF, ETM <sup>1</sup>	7 INH, RIF	9 mesos
Pautes intermitents			
<b>Parcial</b>	1 INH, RIF, ETM, (o SM)	8 (INH2, RIF2) <sup>2</sup>	9 mesos
<b>Parcial</b>	2 INH, RIF, PZA, (o SM)	4 (INH2 o 3, RIF2 o 3) <sup>3</sup>	6 mesos
<b>Total</b>	2 INH3, RIF3, PZA3, ETM3 (o SM3)	4 (INH3, RIF3) <sup>4</sup>	6 mesos

<sup>1</sup> en països d'elevada incidència i/o amb més d'un 4 % de resistència entre casos nous: s'afegeix un quart antibiòtic que pot ser o l'ETM o bé l'SM. <sup>2</sup> els fàrmacs s'administren dos cops/setmana durant 8 mesos. <sup>3</sup> els fàrmacs s'administren 2 o 3 cops/setmana durant 4 mesos: Pauta intermitent parcial. <sup>4</sup> els fàrmacs s'administren 3 cops/setmana durant 4 mesos: Pauta intermitent total. (Adaptat de: Rufi i cols.,2000) (Tt.: Tractament)

A més, presenta escàs nombre de recaigudes, menys 1 o 2% i pocs efectes secundaris. A la vegada, la combinació de la INH i RIF proporciona la potència necessària per impedir el desenvolupament de mutants resistents (apartat 3.4.1). En països on la prevalença de resistències entre casos nous és més gran del 4% (apartat 3.4.3) o bé en països d'elevada

incidència (apartat 1.2), s'afegeix un quart antibiòtic en la fase d'inici, l'ETM o l'SM, i la segona fase es manté igual.

Les elevades taxes de resistències a la INH fan necessari protegir i evitar generar una situació similar per la RIF. En aquest sentit, és important la supervisió estricta de la medicació quan en la fase de consolidació s'administra aquest fàrmac. Si això no es pot assegurar és recomanable l'administració d'altres fàrmacs, –inicialment T (Tiacetazona) substituïda més tard per l'ETM–, allargant la durada del tractament (UICTMR,1988).

En general, les pautes terapèutiques emprades poden ser de dos tipus (taula 3.3):

- a) pauta continuada,
- b) pauta intermitent.

La diferència entre ambdues és que en el primer tipus l'administració dels fàrmacs és diària mentre que en la segona és setmanal, de dos o tres cops. A la vegada, la pauta intermitent pot ser:

- b.1) parcial: amb una fase d'inici diària i una fase de consolidació setmanal,
- b.2) total: les dues fases amb administració setmanal.

El principal problema d'aquest tipus de pauta és que requereix una meticulosa supervisió per assegurar-ne el correcte acompliment.

La pauta terapèutica, en malalts VIH positius, constà d'una primera fase amb quatre fàrmacs, INH, RIF, PZA i ETM durant dos mesos i, una segona amb INH i RIF que es pot allargar durant set mesos. Generalment, la resposta al tractament antituberculós no és diferent de la que s'observa en els malalts immunocompetents, però, és molt important un seguiment acurat i proper de l'evolució del malalt VIH positiu degut al major nombre de reaccions adverses, intoleràncies i interaccions farmacològiques, –especialment amb les rifamicines–, que poden patir aquests tant si estan rebent tractament antiretroviral com no (Tuset,2000, UITB, 2000).

Finalment, cal esmentar que hi ha circumstàncies especials que poden modificar les pautes de tractament, afegint, canviant o allargant l'administració dels antibiòtics. Aquest és el cas de les persones que pateixen silicotuberculosi, cirrosi hepàtica, hepatitis alcohòlica, i insuficiència renal. També és una situació excepcional l'embaràs i l'etapa d'alletament, així com la TB en els nens.

### **3.3.2.1 Retractament**

El terme retractament en TB fa referència a la instauració d'una pauta terapèutica en un malalt que ja ha estat prèviament tractat. Cal distingir entre fracàs terapèutic i recaiguda o recivida:

*Tractament de fracassos terapèutics.* Es considera fracàs terapèutic la persistència de cultius positius més enllà del 4rt o 5è mes de tractament, –segons si la pauta és de 6 o 8 mesos–, o la reaparició de dos cultius positius després de la negativització d'aquests. En general, el fracàs terapèutic comporta l'adquisició de resistència als antibiòtics administrats, donat que la població bacil·lar ha estat activa metabòlicament durant tot el temps de tractament. És convenient, doncs, l'administració d'una nova pauta, de dos o tres fàrmacs no utilitzats prèviament, fins que es confirmi el patró de sensibilitat als antituberculostàtics (taula 3.4). Si es pot utilitzar INH o RIF es retracta el malalt de 12 a 18 mesos, en cas contrari, convé allargar-ho fins un màxim de 24 mesos. En cas de què el malalt presenti algun tipus de resistència s'ha d'adaptar el tractament utilitzant pautes alternatives (taula 3.4). En els retractaments és important individualitzar cada cas i considerar diversos factors, especialment, supervisar el tractament, vigilar la toxicitat d'aquest i incrementar el control bacteriològic com a mesura de l'eficàcia del tractament.

**Taula 3.4** Pautes terapèutiques alternatives en el tractament de la TB resistent

Tipus de resistència	Pauta terapèutica alternativa	Duració total del Tt.
a la <b>INH</b>	2 RIF,ETM,PZA o SM/ 10 RIF, ETM	12 mesos
a la <b>RIF</b>	2 INH,ETM,PZA o SM/ 16 INH, ETM	18 mesos
a la <b>PZA</b>	2 INH,RIF,ETM/ 7 RIF,ETM	9 mesos
a la <b>INH, RIF</b>	3 ETM,PZA,SM,OF ( <b>O</b> floxacino)/ 18 ETM,PZA (OF)	21 mesos
<b>Resistència múltiple</b>	individual segons malalt	-

(Adaptat de: Rufi i cols.,2000) (Tt.: Tractament)

*Recaiguda o Recidiva.* Es defineix com la reaparició d'un nou brot d'activitat bacil·lar en un malalt que ha acabat i completat correctament el tractament i s'ha curat. Solen presentar-se entre els 12-24 mesos posteriors a l'acabament del tractament. Ara bé, si aquestes es produeixen uns anys després, cal considerar el cas com una reinfecció més que no pas una recidiva. Les recaigudes després d'un tractament estàndard (taula 3.3) són infreqüents si el malalt ha pres correctament la medicació. Donat que és la població bacil·lar latent la responsable de la reactivació de la malaltia, l'aparició de resistències, en aquests casos, és també poc freqüent i el pacient pot ser retractat amb la mateixa pauta. Contràriament, si s'ha utilitzat una pauta alternativa menys potent, o bé hi hagut una absorció parcial dels fàrmacs, o



si el tractament no ha estat ben supervisat o ha pres la medicació de forma irregular és possible que s'hagin generat resistències. Davant d'aquesta situació s'estableix una nova pauta de tractament que s'haurà d'ajustar segons el resultat de l'antibiograma.

---

## 3.4 RESISTÈNCIES

### 3.4.1 Concepte de resistència en *Mycobacterium tuberculosis*

En la pràctica clínica diària, la resistència en un malalt tuberculós es sospita quan hi ha persistència de:

- a) símptomes clínics després de dos mesos de tractament,
- b) bacil·loscòpia positiva als quatre mesos o reaparició d'aquesta després de la negativització,
- c) recaiguda de la malaltia després d'haver fet correctament el tractament,
- d) episodis previs de TB sense resposta al tractament.

La confirmació definitiva s'obté amb l'antibiograma (OMS,2003d).

Donat el tipus de immunopatogènia associada a la infecció, les soques de *M. tuberculosis* tenen poques oportunitats d'interaccionar i canviar informació genètica amb altres soques, si ho comparem amb organismes colonitzadors dels tractes nasofaringi o gastrointestinal. Aquest darrers bacteris poden transmetre elements determinats de resistència com ara transposons, integrons i plàsmids utilitzant processos de transducció o transformació. Aquesta opció, però, no és vàlida pel bacil tuberculós on la resistència és d'origen cromosòmic. Es presenta espontàniament durant la multiplicació, és de caràcter irreversible i es transmet a tota la seva descendència tot i que el moviment de certs elements mòbils, com ara la *IS6110*, s'ha associat amb resistència com a resultat de la inactivació de determinats gens (Dale,1995, Lemaître i cols.,1999). Ara bé, si l'aparició d'un bacil resistent a un determinat antibiòtic és espontània, l'aparició de tota una població bacteriana resistent és sempre conseqüència del contacte previ amb el fàrmac. En aquest context, Rinder i cols.,(2001) han suggerit la existència de poblacions sensibles i resistents aïllades en una mateixa mostra clínica, fenomen que han definit amb el terme d'heteroresistència.

Actualment, s'accepta que en un cultiu de bacils tuberculosos salvatge apareix per mutació espontània natural  $2.56 \times 10^{-8}$  microorganismes resistent a la INH,  $3.32 \times 10^{-9}$  a la RIF,  $2.29 \times 10^{-8}$  a la SM,  $1.0 \times 10^{-7}$  al l'ETM i entre  $10^{-2}$ - $10^{-4}$  a la PZA (Canetti i Grosset,1961, David,1970). Quan es consideren dos o més fàrmacs junts la freqüència de mutació correspon

al producte de les freqüències parcials dels antibiòtics, així, tenim que la INH més la RIF tenen una freqüència de  $10^{-17}$  i, l'ús combinat de INH, RIF i SM dona una freqüència de  $10^{-25}$ . Paral·lelament, el risc de què apareguin mutants resistents depèn de la densitat de la població bacteriana que hi ha en les diferents lesions, calculada en  $10^3$ - $10^5$  per infiltrats de poca extensió o lesions nodulars i en  $10^8$ - $10^9$  per lesions cavitades (Canetti, 1964). L'ús d'un sol antibiòtic en el tractament comporta una primera fase on s'eliminen la majoria dels bacils, i una segona de selecció de mutants resistents a aquest fàrmac, –fenomen de *fall and rise*–, fet que provocarà la inutilització permanent de l'antibiòtic en qüestió. En administrar-se, alhora, una combinació de tres o quatre antibiòtics, –per ex: INH, RIF, ETM, PZA–, la probabilitat d'aparició de resistència, –per ex:  $10^{-24}$  per INH, RIF, ETM–, és pràcticament nul·la, doncs, es necessitaria una població bacil·lar impossible de trobar en l'organisme.

### **3.4.2 Classificació de les resistències**

L'OMS (2000) i el grup de treball de la UICTMR (Schwoebel i cols., 2000) han definit i classificat els tipus de resistència. Així es parla de:

*Mono-resistència*: resistència a un sol fàrmac de primera línia.

*Poliresistència*: resistència a dos o més fàrmacs de primera línia.

*Multiresistència*: soca resistent, a la vegada, a la INH i RIF. És un tipus especial de poliresistència.

*Resistència en casos nous* (abans resistències primàries): freqüència de soques resistents aïllades en malalts que no han rebut mai tractament antituberculós o que n'han rebut menys d'un mes.

*Resistència en casos prèviament tractats* (abans resistències adquirides): freqüència de soques resistents aïllades en malalts que prèviament han rebut com a mínim un mes de tractament antituberculós. S'inclou malalts que després de completar correctament el tractament pateixen un nou episodi de TB, malalts amb fracàs terapèutic, malalts que han fet un tractament discontinu i malalts amb TB crònica que tenen bacil·loscòpia positiva després de completar correctament els dos primers mesos de tractament.

*Resistència combinada*: suma de tots els casos resistents, casos nous i prèviament tractats, en un any i àrea geogràfica determinada.

### **3.4.3 Distribució mundial de les resistències**

Des de l'any 1994 fins 1999, la OMS i la UICTMR van impulsar un programa, d'àmbit mundial, per la vigilància de les resistències de *M. tuberculosis* als antibiòtics antituberculosos

de primera línia. El projecte es va desenvolupar en dues fases, de 1994-1997 (OMS,1997) i de 1996-1999 (OMS,2000), amb la participació, entre ambdues fases, d'un total de 72 indrets geogràfics diferents, des de països sencers o regions a ciutats concretes. En línies generals, els resultats obtinguts en l'última fase indiquen que més del 50% dels països que hi han participat presenten una incidència de resistència, de com a mínim a un fàrmac entre casos nous, superior al 10%, –des del 1.7% al 36.9%–. Entre casos prèviament tractats les freqüències observades varien del 0% al 93.8% (fig. 3.4). Pel que fa a les TB MDR entre casos nous, la incidència oscil·len del 0% al 14.1% i, entre casos prèviament tractats, del 0% al 48.2% (fig. 3.5).

Les resistències més elevades s'observen al sud-est asiàtic, –especialment, determinades regions de la Xina–, alguns països de Amèrica del Sud, –com ara Perú–, alguns d'Àfrica, –el cas de Moçambic–, i a l'Europa de l'Est, –Rússia, regions d'Ivanovo i Tomsk, i les ex-repúbliques soviètiques de Letònia i Estònia–. Cal destacar que la TB MDR és extremadament preocupant a determinades regions de la Xina, on no està implementat el DOTS (apartat 1.4), i a Rússia i les repúbliques bàltiques de Letònia i Estònia on la caiguda del règim de la Unió Soviètica va generar una descoordinació tant en els programes de control com en l'administració dels antituberculosos.

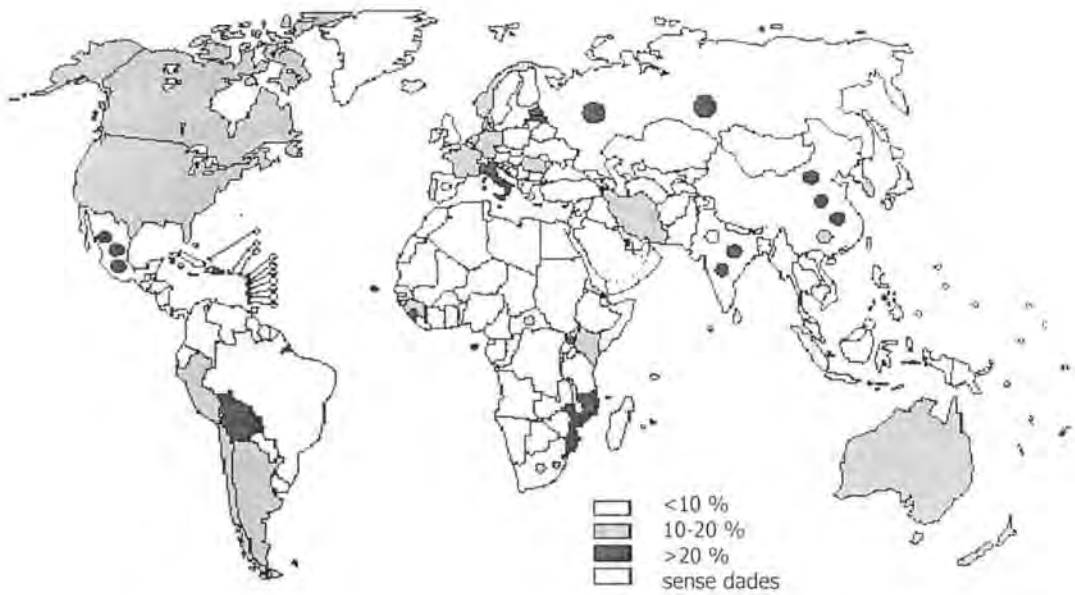
En analitzar les dades per continents s'observa la següent distribució (OMS,2000):

*Amèrica.* Entre casos nous i resistència a com a mínim un fàrmac, les freqüències van del 1.7% d'Uruguai al 18% de Perú. En els Estats Units la taxa es situa en un 12%. La MDR més alta és a Perú amb un 3% mentre que als Estats Units és d'un 1.2%. Respecte al casos prèviament tractats i resistència a un o més fàrmacs, els valors van d'un 18.1 a un 93.8% d'Uruguai i les TB MDR d'un 4.7% a un 22.4% d'alguns Estats de Mèxic.

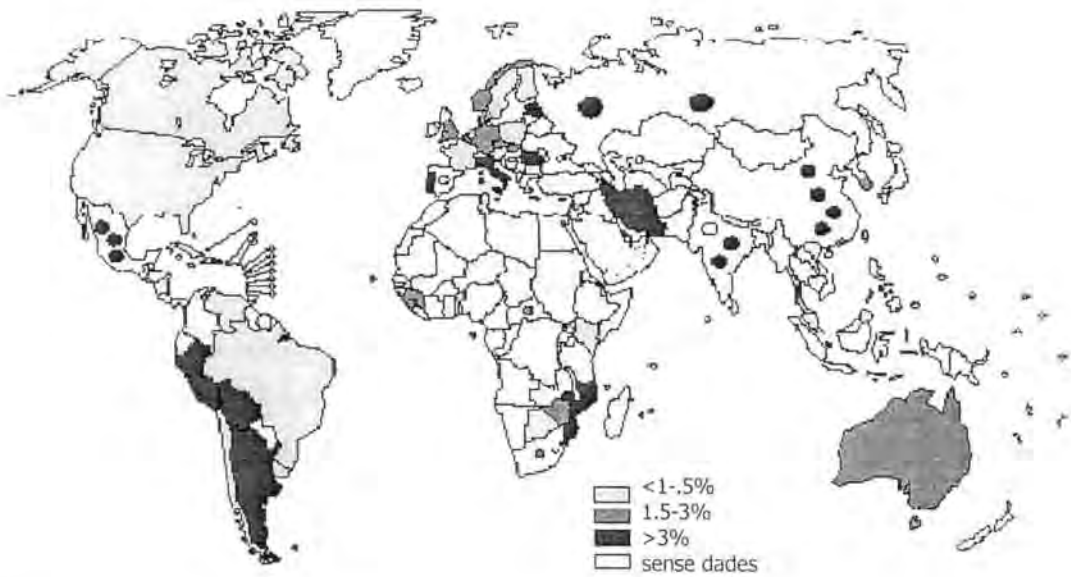
*Europa.* Entre casos nous i resistència a un o més fàrmacs, les taxes oscil·len del 2.4% d'Eslovènia al 36.9% d'Estònia, sense menysprear el 29.9% observat a Letònia o el 29.9% i 32.4% de les regions russes de Ivanovo i Tomsk, respectivament. Els valors observats en la TB MDR van del 0% al 14.1% també a Estònia, incloent-hi el 9% de Letònia i de la regió d'Ivanovo i el 6.5% de la regió de Tomsk. En relació als casos prèviament tractats les dades oscil·len del 0% al 68.5% a Ivanovo si es considera resistència a un o més fàrmacs i, si es considera la MDR la xifra arriba als 37.8% a la república d'Estònia.

L'anàlisi de les dades tant del treball de l'OMS/UICTMR com d'altres estudis indiquen que mentre que la situació a l'Europa de l'Est és força dramàtica, a l'Europa occidental se'n poden diferenciar dos:

a) països que han incrementat la prevalença respecte als anys anteriors, –degut al fenomen de la immigració–, el cas de Dinamarca, Holanda, entre altres,



**Figura 3.4** Prevalença de les resistències, entre casos nous i prèviament tractats combinats, a algun dels quatre fàrmacs avaluats, 1994-1999. (OMS/UICTMR,2000).



**Figura 3.5** Prevalença de les multiresistències, entre casos nous i prèviament tractats combinats, 1994-1999. (OMS/UICTMR,2000).

b) països que s'han mantingut o, fins i tot, han disminuït les seves taxes de resistència, com ara Portugal (de March, 2001).

*Àfrica.* Entre casos nous i resistència a com a mínim un fàrmac, les taxes oscil·len del 6.3% de Botswana al 24.8% de Sierra Leona sense oblidar d'altres com ara el 20.8% de Moçambic, el 19.8% a Uganda i el 16.4% a Bangui, República Centro Africana. La freqüència de la TB MDR varia del 0.5% al 3.5% observat a Moçambic. Pel que fa als casos prèviament tractats les freqüències són força altes arribant al 61.5% de Sierra Leona i amb una MDR que oscil·la del 3.3% al 28.1% de Guinea-Conakry. És important, però, tenir en compte que el nombre de països africans participants en aquest estudi ha estat escàs. Donada la situació de la TB en tot el continent africà, molt probablement, la prevalença de resistència entre casos nous que es podria trobar en altres països seria superior al 10%.

*Àsia.* Les freqüències, entre casos nous i resistència a un o més fàrmacs, oscil·len del 4.5% d'Oman al 35% de Henan, Xina. En altres països asiàtics els valors són també molt elevats com el 25% de Tailàndia, el 15.9 % d'Iran, el 18.8% de l'estat Tamul Nadu, Índia, o el 17.6% de Shandong, Xina. Considerada la TB MDR les xifres ronden del 0.1% de Malàisia al 10.8% de Henan, o els 4.5% i 5% de Zhejiang, a la Xina i al Iran, respectivament.

Respecte als casos prèviament tractats les freqüències són molt elevades d'un 13.2% a un 66% a Henan i, en relació a la TB MDR, els valors varien del 0% al 48.2% del Iran, sense subestimar el 35% de Zhejiang o el 34.4% de Henan. En aquest sentit, cal considerar que es desconeix quina és la situació exacte d'alguns països asiàtics, –Índia, Xina, Pakistan, entre altres–, on les taxes de TB són de les més altes del món –engloben quasi el 40% dels casos nous que es diagnostiquen cada d'any–, fet que podria incrementar molt més les xifres esmentades anteriorment.

*Oceania.* Entre casos nous i resistència com a mínim a un fàrmac les taxes van del 2.2% a Nova Caledònia fins al 11.2% a Nova Zelanda. La TB MDR és pràcticament inexistent. En casos prèviament tractats les freqüències ronden del 8.3% al 19% de Nova Zelanda i no s'ha observat TB MDR.

### **3.4.3.1 Situació de les resistències a l'Estat Espanyol**

A l'Estat Espanyol no existeixen ni dades generals ni oficials de la situació de les resistències. En els últims 10 anys, però, s'han publicat dos estudis multicèntrics, un a Barcelona (Martín-Casabona i cols.,2000) i l'altre a Madrid (GETRM,1996), que afegits a altres dades obtingudes de petits estudis o enquestes permeten estimar quina és la situació real a l'Estat Espanyol (de March, 2001). Globalment, la prevalença de resistències entre casos nous observada és aproximadament del 4.5%, –marge de 0.9% al 8.9%–, amb una mitjana de



monoresistència a la INH del 3% i amb un 0.4% de soques MDR. Paral·lelament, la taxa entre casos prèviament tractats ronda el 24% amb un marge que varia del 11.3% al 45.9% (de March, 2001).

#### **3.4.4 Detecció de la resistència**

L'estudi de la sensibilitat de *M. tuberculosis* als diferents antibiòtics té dos aspectes destacats:

- a) individual: conèixer la població bacil·lar del malalt,
- b) epidemiològic: conèixer el percentatge de soques resistents que circulen en una població concreta.

No existeix un criteri clar i únic sobre quan cal fer l'antibiograma. Hi ha dues posicions:

a) realització del test només quan hi ha indicacions clíniques. El cas de malalts amb fracàs clínic evident, amb antecedents de tractament previ, malalts que pertanyen a poblacions de més alt risc de patir resistències o immigrants de països en desenvolupament amb taxes de resistències entre casos nous elevades,

b) realització sistemàtica en tots els casos diagnosticats. Aquesta opció està basada en la detecció precoç de resistències entre casos nous no sospitades, afavorint la correcció del tractament i la monitorització continua de l'estat de les resistències en una població concreta (Martín-Casabona i cols.,2000). Des dels inicis de l'antibiograma ha predominat la primera opció tot i que en els darrers anys cada cop s'adopta més la segona.

##### **3.4.4.1 Detecció fenotípica**

L'estudi fenotípic de la sensibilitat, –l'antibiograma–, detecta, de forma aïllada per cadascun dels fàrmacs, el percentatge de bacils resistents que hi ha en una població bacteriana concreta. Els diferents mètodes descrits es poden classificar en quatre grups:

a) Mètodes de referència. Entre els anys 1961-1969 l'OMS va acceptar tres mètodes d'estudi per determinar la sensibilitat als fàrmacs antituberculosos (Canetti i cols., 1963, 1969). Aquests mètodes estan fonamentats en el concepte de les proporcions crítiques, és a dir, la mínima proporció de colònies que han de créixer amb una concentració crítica d'un antibiòtic concret per a què la soca sigui considerada resistent. Una soca es considera resistent si 1% dels bacteris del inòcul emprat creix davant d'una determinada concentració d'antibiòtic. Les característiques comunes als tres mètodes originals són que inclouen l'antibiòtic en el medi sòlid de cultiu, –Löwenstein-Jesen o Middlebrook 7H10 i 7H11–, i que per a la lectura cal

visualitzar colònies, conseqüentment, el resultat de l'antibiograma s'allarga fins a 3 o 4 setmanes. Breument, els tres mètodes són (Heiffets,1991):

*mètode del quocient de resistències* descrit per Mitchison l'any 1953 i basat en el comparació de la CMI, –concentració mínima d'antibiòtic a la qual s'inhibeix el creixement bacterià–, d'una soca amb la d'una altra soca salvatge de referència,

*mètode de concentracions absolutes* desenvolupat per Meissner al 1961 on es compara el nombre de colònies que creixen en un medi amb el fàrmac respecte al creixement obtingut en un medi sense cap antibiòtic,

*mètode de les proporcions i dilucions múltiples* descrit per Canetti l'any 1963 i que finalment ha estat el més emprat. A aquest mètode se li han fet diferents modificacions, –emprar medi de Middlebrook 7H10 en lloc del Löwenstein-Jesen segons el sistema del CDC, emprar discs d'antibiòtics i la modificació de Heiffets usant medi Middlebrook 7H11–, que han facilitat la pràctica en el laboratori i han reduït el temps de lectura a tres setmanes.

b) *Bactec 460TB* (Becton Dickinson Diagnostic Instruments, USA) (apartat 2.6.2.2.2). És una adaptació a medi líquid del mètode de les proporcions en medi sòlid. El sistema detecta el creixement bacterià mitjançant la utilització d'un isòtop radioactiu incorporat al medi líquid. S'inoculen els micobacteris en diferents vials cadascun d'ells amb una concentració d'antibiòtic diferent i es compara el creixement respecte a un vial de control lliure de qualsevol fàrmac i que conté un 1% del inòcul. El resultat de l'antibiograma és ràpid, pot està disponible entre el 5è i el 10è dia d'incubació i amb el temps s'ha esdevingut el mètode més emprat (Siddiqi i cols.,1981, 1985).

c) Sistemes no radiomètric amb lectura manual o automàtica (apartat 2.6.2.2.2): *ESP Myco II* (Trek Diagnostic Systems, USA); *MB/Bact* (Organon Teknika Corporation, USA) i *MGIT 960* (Becton Dickinson Microbiology Systems, USA). Els temps de lectura d'aquests sistemes són similars al del sistema radiomètric esmentat abans, però eviten els inconvenients d'utilitzar isòtops radioactius. En general són de recent introducció i alguns d'ells encara no han resolt el test de la PZA. Probablement seran les alternatives més emprades a mig termini.

d) Altres: *sistema E-test* (AB BIODISK, Sweden) ([www.abbiodisk.com/](http://www.abbiodisk.com/)). Es tracta d'un mètode que utilitza tires de plàstic no poroses les quals contenen els antibiòtics antituberculosos liofilitzats. Quan es col·loquen aquestes tires sobre medi sòlid es produeix una difusió de l'antibiòtic en el medi creant un gradient de major a menor concentració el que permet la lectura de la CMI; *mètode de microdilució en caldo* i *mètode de macrodilució*. Ambdós sistemes utilitzen medi líquid i permeten conèixer la CMI. A més, el segon permet determinar la concentració bactericida mínima de les soques a cadascun dels antituberculosos. Finalment, hi ha un seguit de nous mètodes que estan en fase d'avaluació: *sondes d'hibridació*

(Martín-Casabona i cols.,1997), *citometria de flux* (Kirk i cols.,1998), *cromatografia de gasos* (Garza i cols.,1997), entre altres.

### 3.4.4.2 Detecció genotípica

En els darrers anys s'han identificats els gens i/o les zones gèniques, així com les mutacions puntuals, delecions o insercions responsables de les resistències als principals fàrmacs utilitzats en la teràpia antituberculosa, INH, RIF, PZA, ETM i SM. Del coneixement dels mecanismes moleculars, que determinen la resistència de les soques de *M. tuberculosis* i de les bases d'actuació dels diferents antibiòtics, s'esdevé una eina important pel desenvolupament de noves estratègies en la detecció de la resistència, –alternativa al antibiograma convencional–, pel disseny de nous fàrmacs i per la millora en els programes de tractament.

#### 3.4.4.2.1 Alteracions genètiques associades amb la resistència

Breument, les bases moleculars implicades amb la resistència als principals fàrmacs antituberculosos són:

*Isoniazida*. S'han descrit diferents gens implicats amb la resistència a la INH (Ramaswamy i Musser,1998). L'activació de la INH implica la transformació d'aquesta en el seu compost actiu l'àcid nicotínic feina responsable de l'enzim catalasa-peroxidasa, una proteïna codificada pel gen *katG* (Zhang i cols.,1992). Qualsevol alteració en aquest gen provoca resistència impedit que l'antibiòtic sigui activat. En general, entre el 50% i el 60% de les soques resistents estudiades presenten alguna mutació puntual o petites delecions o insercions en el gen *katG* (Ramaswamy i Musser,1998). La mutació més freqüent en soques d'origen geogràfic diferent, –d'un 32% a un 92% (Haas i cols.,1997, Marttila i cols.,1998, Verdú i cols.,2002)–, és aquella que afecta al c315 i que provoca un canvi d'aminoàcid (aa.), de Ser a Thr. Altres mutacions puntuals observades són c463Leu, –tot i que s'ha suggerit que pot ser una mutació silenciosa–, c104,c108,c138,c148,c270,c275,c321 i c381 moltes de les quals es desconeix encara el seu significat (Ramaswamy i Musser,1998).

Un altre zona gènica associada amb la resistència a la INH és el *locus inhA*, constituït, en el cromosoma micobacterià, pels gens *mabA*, –que codifica l'enzim 3-cetoacil-ACP reductasa–, i *inhA*, –que codifica l'enoil-ACP reductasa–, ambdós participen en la síntesi de la paret bacteriana. En l'extrem 5' d'aquest *locus* s'hi troba la zona reguladora RBS (**R**ibosome **B**inding **S**ite) (Banerjee i cols.,1994, Rozwarski i cols.,1998). En general, s'han descrit mutacions tant a la zona reguladora com a la zona estructural (Ramaswamy i Musser,1998). Las alteracions que afecten a la primera provoquen un augment en la producció de l'enzim compensant, així, l'acció

inhibidora de l'antibiòtic sobre la síntesi de la paret. Contràriament, les mutacions a la zona estructural produeixen modificacions en l'enzim, fet que impedeix el seu reconeixement per la INH, evitant que pugui ser activa. Les mutacions associades a aquest *locus* expliquen d'entre el 25-30% de les soques amb resistència a la INH (Banerjee i cols.,1994).

A més, sembla ser que hi ha una forta correlació entre el tipus de mutació i les CMI, així, mutacions en el gen *katG* es relacionen amb concentracions elevades de resistència a la INH, –superior a 1µg/ml–, i alteracions en el gen *inhA* s'associen a CMI baixes (Banerjee i cols.,1994, Lonca i cols.,2002). En aquest mateix sentit, diferents estudis han observat una estreta relació entre resistència a concentracions baixes associada al gen *inhA* i resistència a la ET (Etionamida), un fàrmac de segona línia (Banerjee i cols.,1994).

També s'ha relacionat amb resistència a la INH la zona intergènica *oxyR-ahpC*. En aquest cas, el gen *ahpC* és regulat pel gen *oxyR* que codifica l'enzim ahpC (alkyl hydroperoxide reductase C) que destrueix als radicals peròxids (Telenti i cols.,1997b). El gen *ahpC* es manté inactiu quan el gen *katG* funciona correctament. Entre el 10-15% de les soques clíniques presenten alteracions en el gen *ahpC* (Telenti i cols.,1997b). Sembla, però, que les mutacions en la zona intergènica *oxyR-ahpC* apareixen quan el gen *katG* està mutat, per compensar l'acció detoxificadora que té aquest últim (Ramaswamy i Musser,1998).

Finalment, malgrat no se sap amb exactitud s'han identificat altres gens, *kasA*, *furA*, *ndh*, entre altres (Ramaswamy i Musser,1998, Lee i cols.,2001) associats amb resistència a la INH, i que podrien explicar la petita proporció, –10-19%–, de soques resistents sense cap alteracions en el gen *katG*, *inhA* i la zona intergènica *oxyR-ahpC*.

**Rifampicina.** La RIF actua interferint el procés de síntesi de l'ARNm (missatger), unint-se a la subunitat β de l'ARN polimerasa provocant la inhibició de l'inici del procés de transcripció (McClure i Cech,1978). La resistència a la RIF ve determinada per mutacions puntuals i petites delecions i/o insercions en el gen *rpoB* que codifica per la subunitat abans esmentada (Ramaswamy i Musser,1998). Aquest fet provoca un canvi d'aa., i conseqüentment, de conformació del lloc d'unió de l'antibiòtic a l'ARN polimerasa. Més del 95% de les soques resistents estudiades tenen alguna alteració localitzada en la regió *core* de 81pb, que codifica 27 aa., –c432-c458–, del gen *rpoB*, l'anomenada *regió determinant de la resistència a la rifampicina* (RDRR) (Telenti i cols.,1993b, Verdú i cols.,2002). Les mutacions més freqüents són aquelles que afecten als codons, 456Ser i 451Histidina, en el 43 % i 36 % de les soques resistents estudiades, alhora que la substitució d'aa., més comuna és Ser456Leu, –42% de les soques resistents–, i His451Tirosina, –23% de les soques (Ramaswamy i Musser,1998)–. Roman, aproximadament un 4% de soques resistent a la RIF on no s'ha identificat el mecanisme de resistència.



Diferents treballs han observat una forta correlació entre determinades mutacions i el nivell de la CMI. Així s'ha associat les mutacions en els codons 451 i 456 amb alt nivell de resistència,  $>32 \mu\text{g/ml}$ , i les mutacions en els codons 436,441,443, i 447 amb CMI baixes, alhora que aquestes mutacions romanen susceptibles a l'acció de la Rb, un antibiòtic derivat de la mateixa família que la RIF (Ramaswamy i Musser,1998, Espasa i cols.,2002).

*Etambutol.* L'acció d'aquest antibiòtic és inhibir la biosíntesi de la paret cel·lular micobacteriana, actuant sobre l'enzim arabinosil transferasa. La resistència a l'EMB està associada amb canvis en una regió genòmica concreta, l'operó *emb*, constituït per tres gens *embC,A,B* (Telenti i cols.,1997a). La resistència es produeix per una sobreexpressió de proteïnes *emb*, associada freqüentment amb CMI baixes i per mutacions de caràcter estructural en el gen *embB* (Telenti i cols.,1997a), relacionades en un alt percentatge, –més del 65% de les soques–, amb nivells elevats de resistència. La majoria d'aquestes mutacions afecten a determinats codons, en concret, al c306Metionina, –89% de les soques resistents–, i c406Glicina, a més del c328Asparagina i del c497Glutamina (Ramaswamy i cols.,2000).

*Estreptomícina.* L'SM és un aminoglicòsid. Les alteracions responsables, en gran part, de la seva resistència s'han identificat en els gens *rrs* i *rpsL*, –que codifiquen pel 16S ARNr i la proteïna ribosomal S12, respectivament–, ambdós relacionats amb la subunitat ribosòmica 30S. Aquestes alteracions provoquen la inhibició del procés de síntesi proteica (Sreevatsan i cols.,1996). El mecanisme més freqüent de resistència són les mutacions puntuals, una única mutació pot ser suficient per a provocar-la, donat que *M. tuberculosis* només té una còpia de l'operó 16S ARNr. Entre el 65-75% de les soques SM resistents tenen alguna mutació associada als dos gens esmentats abans, en la resta es desconeix encara el mecanisme que provoca la resistència. La mutació més comuna es produeix en el codó 43, –més del 50% de les soques resistents–, del gen *rpsL*, on la Lisina és substituïda per una Arginina. En el gen *rrs* les alteracions apareixen en el *loop* 530 o la regió 915 (Sreevatsan i cols.,1996). Existeix d'un 25 a un 35% de soques resistents a l'SM però amb els dos gens intactes el que suggereix que hi poden haver altres mecanismes responsables de la resistència. S'ha trobat una correlació entre les alteracions genètiques i el nivell de resistència *in vitro* (Meier i cols.,1996). Canvis en el gen *rpsL* correlacionen amb nivells elevats de resistència,  $>500 \mu\text{g/ml}$ , i mutacions en el gen *rrs* ho fan amb nivells intermedis,  $<250 \mu\text{g/ml}$ . Generalment, les soques sense cap alteració en els dos gens esmentats presenten resistència de baix nivell,  $<50 \mu\text{g/ml}$ .

*Pirazinamida.* El mecanisme de resistència a la PZA s'associa majoritàriament, –72% de les soques –, a mutacions puntuals, insercions i delecions produïdes en el gen *pncA*, que codifica una proteïna de només 186 aa., la pirazinamidasa (Sreevatsan i cols.,1997), encarregada de transformar la PZA en àcid pirazinoic, compost amb activitat



antimicobacteriana. Es desconeix el mecanisme en el percentatge restant. Qualsevol tipus d'alteració, en aquest gen, s'ha correlacionat amb un nivell elevat de resistència, >900 µg/ml (Ramaswamy i Muser,1998).

#### **3.4.4.2.2 Mètodes d'estudi**

La utilització de les tècniques de biologia molecular a l'estudi de resistències en els micobacteris es va iniciar al principi de la dècada dels noranta. Contràriament als mètodes fenotípics descrits en l'apartat anterior (apartat 3.4.4.1), aquestes tècniques són independents del creixement bacterià. Per la detecció de les resistències s'han descrit diferents mètodes:

a) tècniques fonamentades en l'electroforesi:

*PCR-SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism)* (Telenti i cols., 1993c). La tècnica té com a fonament l'estudi de la mobilitat d'una de les dues cadenes de l'ADN en un gel de poliacrilamida d'alta resolució. Una mutació en un gen provoca un canvi conformational de la cadena alterant també la seva mobilitat. És un mètode estandarditzat, ràpid i fàcil.

*Heteroduplex* (Williams i cols.,1998). Aquesta tècnica inclou una PCR de la regió que interessa, es desnatura i es barreja amb un altre amplicó també desnaturat d'una soca de referència. Es deixa reconstituir la cadena d'ADN. Si no hi ha cap mutació la homologia entre els amplicons de les dues cadenes, la soca problema i la de referència, serà total. En cas contrari, es formaran heteroduplex, que presentaran mobilitat electroforètica distinta dels amplicons originals.

b) tècniques fonamentades en la hibridació: *INNOlipA* (apartat 2.6.2.4.3), PCR-ELISA (García i cols.,2001), i *arrays* (Mikhailovich i cols.,2001).

c) tècniques fonamentades en la PCR a temps real. És un mètode ràpid que permet l'amplificació i la detecció del producte, amplicó, simultàniament mitjançant sondes fluorescents (apartat 2.6.2.3). Existeixen diferents tipus de sondes marcades, les d'ús més freqüent són: sondes *Taqman*, *moleculars Beacons*, sondes FRET (**F**luorescence-**R**esonance-**E**nergy-**T**ransfer), entre altres.

S'ha aplicat a l'estudi i detecció de les mutacions implicades amb la resistència als principals fàrmacs antituberculosos:

a) soques aïllades de diferents malalts (Torres i cols.,2000, García de Viedma i cols.,2002b),

b) directament en mostra clínica. Aquesta última presenta avantatges importants com és la rapidesa en la detecció, de 24 a 48 hores, amb una elevada especificitat i

una sensibilitat força significativa, en mostres amb bacil-loscòpia positiva negativa, d'un 97% i 47%, respectivament (Telenti i cols.,1997b, Espasa i cols.,2002).

d) tècniques fonamentades en la seqüenciació (Alcaide i cols.,1997, Marttila i cols., 1998, Lee i cols.,2001). Es considera el mètode de referència. Detecta exactament el lloc de la mutació, però, es necessita disposar de la soca. Malgrat que tècnicament, aquest mètode, és complex, es planteja com una bona alternativa, sobretot en l'estudi epidemiològic de soques.

### **3.4.5 Efecte de la resistència en la viabilitat metabòlica de *Mycobacterium tuberculosis***

La viabilitat metabòlica, *-fitness-*, d'un microorganisme és una mesura de l'habilitat que té aquest per sobreviure, reproduir-se i ser transmissible. Reflexa les característiques individuals del patogen per a créixer, l'habilitat per a resistir dintre de l'hoste i sobreviure a les condicions d'estrès ambiental que genera aquest, així com la capacitat de disseminació i transmissió a un nou hoste.

La/les mutació/ns que originen resistència poden tenir un cost important en la viabilitat del micobacteri. Com a conseqüència, aquest ha de modificar la seva estructura bàsica de funcionament i adaptar-la a la nova situació. En aquestes circumstàncies, es pot produir una resposta compensatòria a la mutació amb la finalitat de restaurar o, fins i tot, incrementar la viabilitat metabòlica que tenia el micobacteri inicialment (Böttger i cols.,1998). Per exemple, compensar la pèrdua d'activitat catalasa-peroxidasa per mutació en el gen *katG*, amb una sobreexpressió de l'enzim AhpC, com a conseqüència de mutacions en el promotor del gen *ahpC* (apartat 3.4.4.2.1) (Sherman i cols.,1996).

D'altre banda, cal tenir en compte que les proves per avaluar la viabilitat metabòlica *in vitro* d'un determinat microorganisme no tenen per què correlacionar-se amb la resposta *in vivo* de virulència en models animals o, fins i tot, amb la capacitat d'aquest de causar malaltia en humans. Així doncs, com la mutació i la subseqüent resposta compensatòria afecta a la viabilitat de la soca és, encara ara, una qüestió pendent d'estudi.

### **3.4.6 Variables relacionades amb la resistència**

L'anàlisi de diferents variables socials, clíniques i demogràfiques ha permès identificar quins factors són més freqüents entre els malalts que presenten soques resistents. En el projecte de l'OMS/UICTMR (2000), esmentat anteriorment, la resistència es va associar amb:

*Tractament previ* (apartat 3.3.2.1): Aquesta evidència, però, no significa que tots els malalts diagnosticats per segona vegada de TB tinguin un risc més elevat de resistència

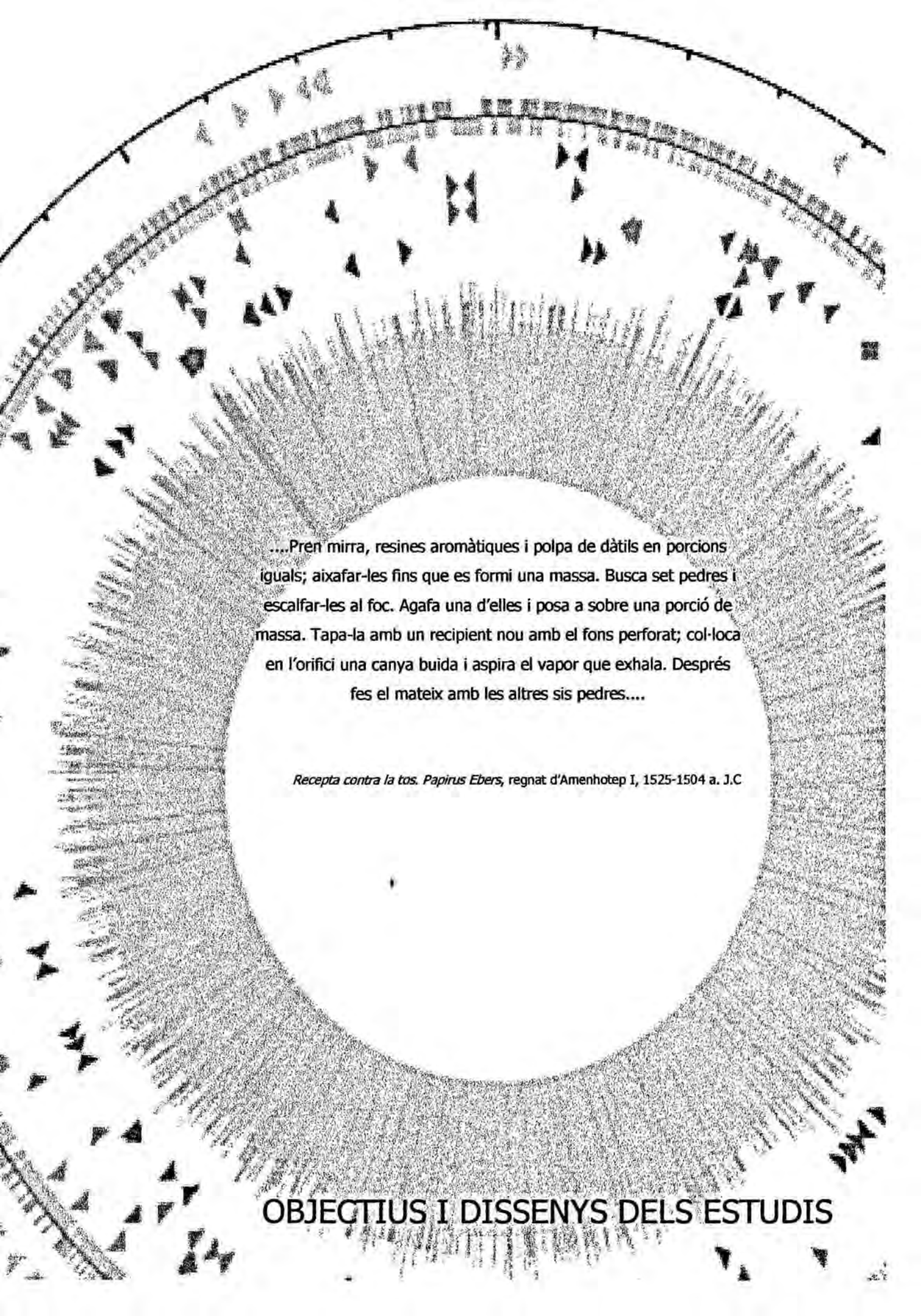
respecte als casos nous. De fet els malalts que presenten més risc de generar alguna resistència són aquells que pateixen una recaiguda després d'un tractament parcial, –ja sigui per deixar de prendre alguns dels fàrmacs o per alteracions en l'absorció d'aquests–,

*Edat:* La incidència de resistència i de MDR va ser més elevada entre persones més grans de 65 anys,

*La infecció amb el VIH* (apartats 1.3.2, 2.7.2, 2.10.3.2 i 2.10.3.3): La associació entre resistència i infecció pel VIH es va establir arrel dels brots de TB resistents i MDR durant la dècada del noranta als Estats Units. Les persones afectades van ser malalts VIH positius molt immunodeprimits que van desenvolupar molt ràpidament la TB amb elevades taxes de mortalitat. Tot i aquestes dades, la conclusió global de l'estudi de l'OMS/UICTMR és que la infecció pel VIH no està associada a una major prevalença de resistència i MDR, però sí que podria afavoreix la disseminació de les soques resistents en brots i en comunitats tancades, tal i com ja s'ha esmentat,

*La immigració* (apartats 1.3.3 i 2.10.3.1.3): El desplaçament de persones des de països en desenvolupament cap als industrialitzats ha comportat no solament un increment important de la prevalença de la TB en aquest últims sinó també un augment de les taxes de resistències.

Altres treballs desenvolupats en poblacions d'altres indrets del món han relacionat altres factors amb la resistència. Especialment, convé esmentar l'associació, inexplicable, detectada per alguns autors entre ser dona i resistència en casos nous (Lockman i cols.,2001, Lawn i cols.,2001, Bruchfeld i cols.,2002).



....Pren mirra, resines aromàtiques i polpa de dàtils en porcions iguals; aixafar-les fins que es formi una massa. Busca set pedres i escalfar-les al foc. Agafa una d'elles i posa a sobre una porció de massa. Tapa-la amb un recipient nou amb el fons perforat; col·loca en l'orifici una canya buida i aspira el vapor que exhala. Després fes el mateix amb les altres sis pedres....

*Recepta contra la tos. Papyrus Ebers, regnat d'Amenhotep I, 1525-1504 a. J.C*

**OBJECTIUS I DISSENYS DELS ESTUDIS**

L'objectiu general del present treball doctoral ha estat estudiar la transmissió de la TB en el context nosocomial i poblacional, emprant la caracterització fenotípica i genotípica de soques de *Mycobacterium tuberculosis*.

Amb aquesta finalitat s'han fixat tres objectius concrets que es descriuen tot seguit:

**Objectiu 1:**

Anàlisi de la transmissió nosocomial de TB en malalts ingressats en un hospital de tercer nivell, durant un període de quatre anys (1994-1997).

**Objectiu 2:**

Descriure les resistències i els factors de risc associats, entre casos nous i prèviament tractats, en el districte de Bata i a l'illa de Bioko, a Guinea Equatorial:

- 2.1 Estudiar la resistència als fàrmacs antituberculosos de primera línia
- 2.2 Ge notipificació de les mutacions associades a les resistències a isoniacida i rifampicina.
- 2.3 Transmissió de les soques resistents.

**Objectiu 3:**

Caracteritzar genotípicament les soques de *Mycobacterium tuberculosis*, aïllades en malalts dels districtes de Bata i Malabo, a Guinea Equatorial: determinant la freqüència de transmissió recent, els factors de risc, i els lligams de transmissió.



De manera similar el disseny general d'aquest treball correspon al conjunt del disseny individual de cadascun dels objectius definits. Breument,

### **Objectiu 1:**

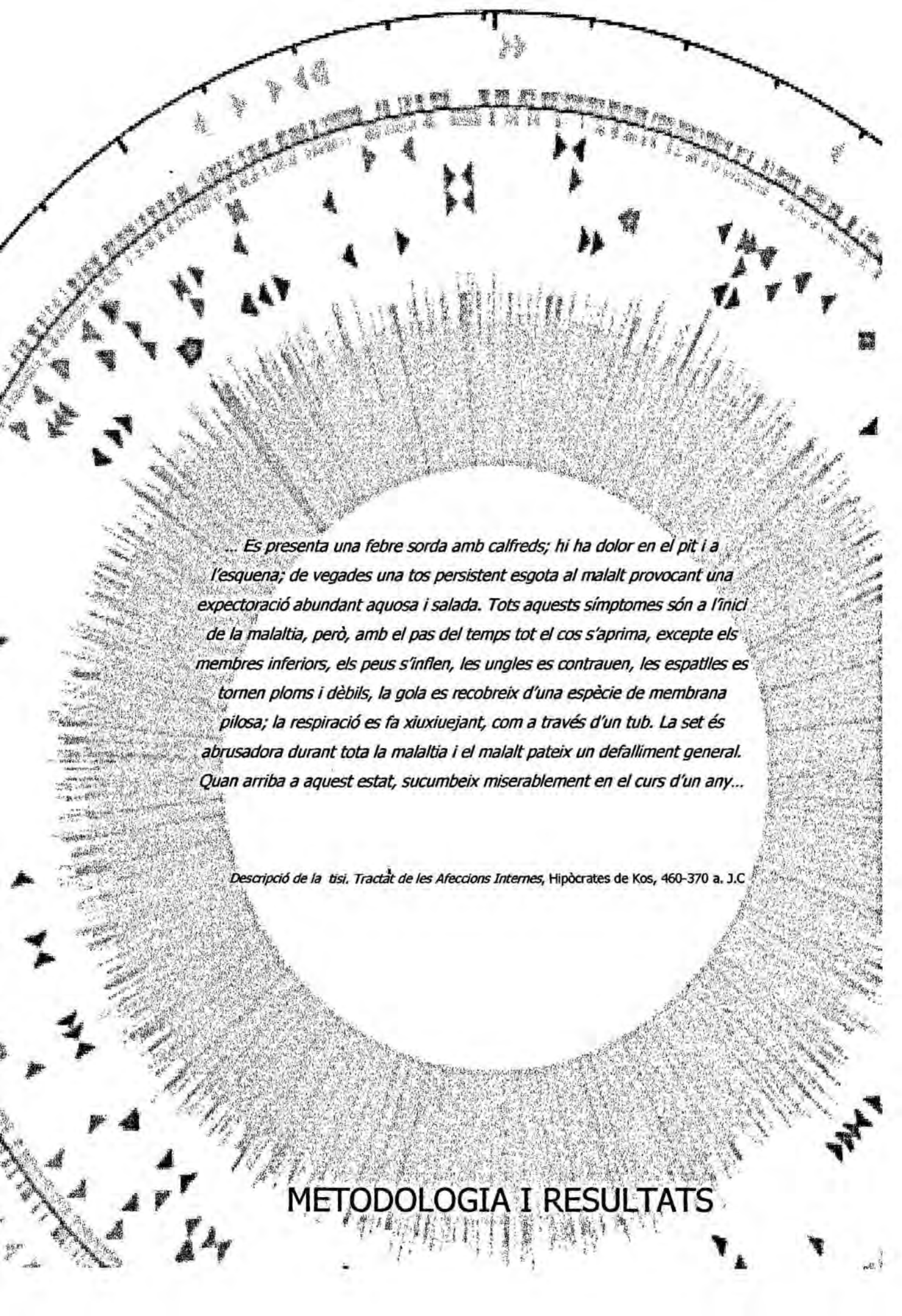
Les soques de *Mycobacterium tuberculosis* incloses en l'estudi han estat aïllades durant un període consecutiu de quatre anys, en mostres de malalts ingressats en el servei de Malalties Infeccioses de l'Hospital Clínic de Barcelona. L'anàlisi genètic de les soques s'ha fet emprant la tècnica molecular RFLP, amb la seqüència d'inserció IS6110 com a marcador. Posteriorment, les imatges generades s'han analitzat per determinar l'absència/presència d'agrupacions, avaluant-se en aquest últims la dinàmica de transmissió, intra i/o extrahospitalària, de la malaltia. Amb les dades generades s'ha avaluat, també, el risc de contagi i de desenvolupar la malaltia dels pacients, no tuberculosos i contactes, companys d'habitació dels malalts tuberculosos estudiats. El seguiment dels malalts-contactes s'ha fet durant un període consecutiu de 18-60 mesos.

### **Objectiu 2:**

Estudi prospectiu de resistències als fàrmacs antituberculosos, entre casos nous i prèviament tractats, de soques aïllades en malalts diagnosticats al districte de Bata i a l'illa de Bioko, durant un període consecutiu de dos anys. L'antibiograma de les soques s'ha fet utilitzant el sistema radiomètric convencional i s'han avaluat els fàrmacs de primera línia. S'han estudiat les mutacions associades a la resistència a la isoniacida, gens *katG* i *inhA*, i rifampicina, gen *rpoB*, amb un equip de PCR a temps real. L'epidemiologia molecular de les soques resistents s'ha determinat amb la tècnica RFLP-IS6110. L'anàlisi estadística de les variables sociodemogràfiques i clíniques ha permès trobar els factors de risc associats a resistència.

### **Objectiu 3:**

Les soques que s'han estudiat han estat les mateixes que s'han aïllat prèviament per l'objectiu 2. La tipificació s'ha fet amb la tècnica molecular RFLP associada a la IS6110. Els patrons de restricció-hibridació s'han analitzat visualment i informàticament. Les imatges generades s'han avaluat per determinar el grau de polimorfisme, i la presència/absència d'agrupacions. Entre els malalts amb soques idèntiques s'ha investigat la distribució geogràfica d'aquestes, i els possibles lligams de transmissió de la malaltia. Finalment, s'han determinat, estadísticament, els factors de risc associats a tenir una soca amb un patró idèntic a un altre.



*... Es presenta una febre sorda amb calfreds; hi ha dolor en el pit i a l'esquena; de vegades una tos persistent esgota al malalt provocant una expectoració abundant aquosa i salada. Tots aquests símptomes són a l'inici de la malaltia, però, amb el pas del temps tot el cos s'aprima, excepte els membres inferiors, els peus s'inflen, les ungles es contrauen, les espatlles es tornen ploms i dèbils, la gola es recobreix d'una espècie de membrana pilosa; la respiració es fa xiuxiuejant, com a través d'un tub. La set és abusadora durant tota la malaltia i el malalt pateix un defalliment general. Quan arriba a aquest estat, sucumbeix miserablement en el curs d'un any...*

*Descripció de la tisi. Tractat de les Afeccions Internes, Hipòcrates de Kos, 460-370 a. J.C*

**METODOLOGIA I RESULTATS**

# I

## DETECTION UNSUSPECTED CASES OF NOSOCOMIAL TRANSMISSION OF TUBERCULOSIS USING A MOLECULAR METHOD

*Clinical Infectious Diseases* 2001;33:453-459

G. Tudó, J. González, JM. Gatell, JA. Caylà, E. Martínez, A. García, M. Navarro, E. Soriano, MT. Jiménez de Anta.

---

L'objectiu d'aquest estudi va ser detectar, emprant la tècnica RFLP-IS6110, casos no sospitats de transmissió nosocomial entre malalts tuberculosos que es trobaven ingressats en un Hospital Universitari.

Es van estudiar les soques de *Mycobacterium tuberculosis* de 151 malalts. Les soques de 37 malalts (24.5%) van permetre definir 11 agrupacions diferents. Cap dels malalts infectats amb una d'aquestes soques agrupades havien coincidit uns amb els altres i el 5.4% d'aquests tenien un lligam epidemiològic

clar establert fora de l'hospital. Les variables *història prèvia de TB* i *presó* van ser associada significativament amb pertànyer a una agrupació. A més, 109 malalts sense TB, —41 dels quals estaven coinfectats amb el VIH—, que havien compartit habitació amb alguns dels malalts tuberculosos estudiats, van ser seguits clínicament durant un mínim de 18 mesos i un màxim de 60.

Entre els malalts-companys que van sobreviure no es va detectar cap cas secundari de TB que fos degut a una transmissió nosocomial.

---



# Detection of Unsuspected Cases of Nosocomial Transmission of Tuberculosis by Use of a Molecular Typing Method

Griselda Tudó,<sup>1</sup> Julián González,<sup>1</sup> Josep M. Gatell,<sup>2</sup> Joan A. Caylà,<sup>3</sup> Esteban Martínez,<sup>2</sup> Albert Garcia,<sup>1</sup> Marian Navarro,<sup>1</sup> Eladio Soriano,<sup>2</sup> and M. Teresa Jiménez de Anta,<sup>1</sup> for the Tuberculosis Investigation Unit of Barcelona, Spain

<sup>1</sup>Servei de Microbiologia, Institut Clínic d'Infeccions i Immunologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), <sup>2</sup>Servei de Malalties Infeccioses, Institut Clínic d'Infeccions i Immunologia, Departament de Medicina, IDIBAPS, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, and <sup>3</sup>Servei d'Epidemiologia, Institut Municipal de Salut Pública de Barcelona, Barcelona, Spain

The aim of this study was to use restriction fragment length polymorphism to detect unsuspected cases of nosocomial transmission of tuberculosis (TB) among patients who had been admitted to a university hospital. One hundred fifty-one samples of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients with pulmonary TB were studied. The isolates from 37 patients (24.5%) defined 11 clusters. None of the patients infected with these cluster isolates had hospital stays that coincided with one another, and for 5.4% of the patients, the epidemiological link was clearly outside the hospital. Previous incarceration was associated with infection with cluster isolates. In addition, 109 patients without TB (41 of whom were infected with human immunodeficiency virus) who shared a room with patients who had TB were followed for 18–60 months. Among the patients who survived, secondary cases of TB due to nosocomial transmission were not detected.

The ability to determine transmission links and risk factors for acquiring infection and developing disease with *Mycobacterium tuberculosis* has advanced since the development of molecular methods for *M. tuberculosis* complex strain typing [1–3]. Several repetitive genetic elements have contributed to DNA polymorphism in *M. tuberculosis* [4–9]. Nonetheless, the insertion sequence (IS) 6110 is the most widely used marker for epidemiological studies [10].

The restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing method has been applied for population-based studies [1–3, 11, 12], differentiation of new cases

of tuberculosis (TB) from relapses [13], and identification of cases of laboratory cross-contamination [14]. In addition, DNA fingerprinting is ideal for studies of the transmission of *M. tuberculosis* in closed institutions, such as nosocomial outbreaks of infection in hospitals [15–18], shelters for the homeless [19, 20], and prisons [21, 22]. Moreover, outbreaks of infection that involve multidrug-resistant strains also have been studied by use of this method [15, 23–26].

Because the interval of time between infection and the development of the disease ranges from a few weeks to several years [23, 27], transmission in closed institutions may be difficult to identify. The aim of the present study was to detect unsuspected cases of nosocomial transmission of TB during a long-term study period by use of a molecular typing method.

## MATERIALS AND METHODS

**Study setting.** The study was performed in a 900-bed university hospital. During the 43 months of the study period, ~504 patients had TB diagnosed, 397 (78.8%)

Received 28 June 2000; revised 28 December 2000; electronically published 20 July 2001.

Financial support: Máximo Soriano Private Foundation, Barcelona, Spain (to G.T.); Fondo de Investigaciones Sanitarias (grant 98/1282) and Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (grant 96/444).

Reprints or correspondence: Dr. Julián González-Martín, Servei de Microbiologia, Hospital Clínic, Villarroel 170, E-08036 Barcelona, Spain (jgm@medicina.ub.es).

Clinical Infectious Diseases 2001;33:453–9

© 2001 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.  
1058-4838/2001/3304-0005\$03.00



of whom had their infections confirmed by means of microbiological testing. The remaining cases were diagnosed on the basis of clinical and epidemiological suspicion and favorable response to treatment.

Smear-positive patients who had TB diagnosed in the Hospital Clinic (Barcelona) were isolated in single rooms with negative pressure and without ultraviolet light. Masks (EN 149 FFP2S; 3MM) were required for health care workers and visitors. Patients with TB were allowed out of their rooms only to undergo procedures and they were required to wear a mask. Approximately 70% of the patients with TB were admitted to the Infectious Disease Department. The infectious disease ward (IDW) has 22 beds, including 2 single rooms with negative pressure.

The study comprised 2 different parts: the molecular typing of the isolates obtained from index patients (IP) during a 43-month period, and the research and follow-up of their roommates for 60 consecutive months (range, 18–60 months).

**Patients.** Each patient was classified as either an IP or as a roommate of an IP (RP). An IP was a patient who had been admitted to the Infectious Disease Department of Hospital Clinic for at least 1 day with culture-confirmed *M. tuberculosis* recovered from respiratory samples. An RP was a patient without suspected or confirmed TB who shared a room with an IP for at least 1 day.

**Definitions.** The exposure period was defined as the number of days an IP and an RP shared a room. The minimum period of RP survival after exposure was 1 year for HIV-infected patients and 2 years for patients without HIV infection. This definition was based on the reported incidence of TB. Several studies have reported that the lifelong risk of developing TB is 5%–15% for immunocompetent persons with TB infection, although the incidence is greatest during the first 2 years after exposure to the contagion [28–34]. For HIV-infected subjects, the annual risk of developing TB is 4.7%–9.7%, which increases to 35.7% during outbreaks of infection in closed institutions [15, 23, 35–38]. Receipt of  $\geq 10$  days of continuous antituberculous therapy was used to define an IP as "treated." This definition is based on studies done in the 1970s of contacts of patients with TB. These studies concluded that patients who received treatment were not contagious [31, 39–42].

**Patient data.** Data concerning the IPs and RPs were obtained from the hospital database, laboratory records, review of medical charts, IDW registers, and records of the TB control program of the Barcelona Department of Public Health.

**Mycobacterial strains and clinical specimen processing.** Clinical samples were digested and decontaminated by use of the NaOH-*N*-acetyl-l-cysteine method [43]. Samples were cultured in Löwenstein-Jensen slants (BBL) and onto radiometric 12B medium (BACTEC; Becton-Dickinson). Identification was done by use of commercial DNA probes (AccuProbe; Gen

Probe) [44]. Drug susceptibility testing was performed by use of the proportions method with the radiometric system [43].

**Molecular analysis.** IS6110 RFLP patterns were determined according to the standard procedure described by van Embden et al. [10].

**Analysis of RFLP patterns.** Fingerprinting patterns were analyzed by means of visual examination. A cluster was defined as  $\geq 2$  strains with identical numbers of copies and locations of IS6110.

**Research and follow-up of RPs.** The hospital census was reviewed to determine which rooms had been assigned to IP patients. Next, the IDW register was used to identify all of the persons who shared rooms with IPs (i.e., RPs) during the same period. The clinical follow-up of RPs was performed by reviewing the Microbiology Laboratory database and the official notifications to the Barcelona TB program during the past 18 months. The mortality census of Barcelona was checked to see how many RPs had died during the study period.

**Statistical analysis.** Demographic, clinical, and laboratory characteristics of patients with cluster isolates were compared those of patients with noncluster isolates. The univariate analysis was performed by use of the  $\chi^2$  test, with Yates correction when indicated, and Fisher's exact test. Multivariate analysis was performed by use of logistic regression. The logistic regression model was tested by use of the Hosmer-Lemeshow test.

## RESULTS

**IP characteristics and RFLP patterns.** The isolates recovered from 151 patients were included in the study. Different patterns were found in 114 isolates (75.4%). The remaining 37 isolates (24.5%) were classified into 11 different cluster groups. The main characteristics of the 37 patients with cluster isolates and the 114 patients with noncluster isolates were compared (table 1). Univariate analysis showed that radiological evidence of cavitation, lack of resistance to antituberculous drugs, injection drug use, history of incarceration, and previous TB were the factors observed significantly more frequently among patients who were infected with cluster isolates. Multivariate analysis revealed that histories of TB and, especially, incarceration were independent factors for acquisition of cluster isolates (table 1).

**Epidemiological investigation.** Seven IPs (19%) had been previously admitted to the hospital, and none had prior admissions to the Hospital Clinic that coincided with those of another IP. Prison contact was clearly established for patients with cluster 1 (table 2). Twenty (74%) of 27 patients included in cluster groups A–E and H had a history of imprisonment, 2 lived near each other, and 2 others were injection drug users. The mechanisms of transmission were not determined for the patients in the remaining cluster groups.

**Research and follow-up of the secondary cases.** Eighty-



**Table 1. Demographic and epidemiologic characteristics of the 151 index patients who were studied.**

Characteristic	No. (%) of patients infected with		Univariate analysis		Multivariate analysis <sup>a</sup>	
	Cluster isolates (n = 37)	Noncluster isolates (n = 114)	OR (95% CI)	P <sup>b</sup>	Adjusted OR	P
Age group, years						
≤30	14 (34.1)	27 (65.9)	2.5 (0.7–9.4)	.19		
31–45	18 (22.2)	63 (77.7)	3.9 (1.1–14.6)	.03		
≥46	5 (17.2)	24 (82.8)	1		—	—
Sex						
Male	30 (25.0)	90 (75.0)	1.1 (0.4–3.2)	.9		
Female	7 (22.6)	24 (77.4)	1		—	—
Country of origin						
Spain	35 (25.7)	101 (74.2)	2.2 (0.4–15.2)	.3		
Other	2 (13.3)	13 (86.7)	1		—	—
Cavitary disease <sup>c</sup>						
Yes	32 (54.2)	27 (45.8)	23.7 (7.0–87.5)	<.001		
No	4 (4.8)	80 (95.2)	1		—	—
Sputum smear result						
Positive	18 (20.9)	68 (79.0)	0.6 (0.2–1.4)	.32		
Negative	19 (29.2)	46 (70.8)	1		—	—
History of tuberculosis						
Yes	15 (42.9)	20 (57.1)	3.2 (1.3–7.8)	.007	2.4 (0.19–6.4)	.07
No	22 (18.9)	94 (81.0)	1			
Previous admission to hospital						
Yes	7 (26.9)	19 (73.1)	1.17 (0.4–3.3)	.94		
No	30 (24.0)	95 (76.0)	1		—	—
Drug resistance						
Any resistance	—	18 (100.0)	0.0 (0.0–0.77)	.006		
No resistance	37 (27.8)	96 (72.2)	1		—	—
HIV infection status						
Positive	26 (29.8)	61 (70.1)	2.0 (0.87–4.92)	.06		
Negative	11 (17.2)	53 (82.8)	1		—	—
Alcohol abuse						
Yes	6 (30.0)	14 (70.0)	1.38 (0.4–4.2)	.58		
No	31 (23.6)	100 (76.3)	1		—	—
History of incarceration						
Yes	20 (76.9)	6 (23.1)	21.0 (6.7–69.0)	<.001	18.9 (6.5–54.5)	
No	17 (13.6)	108 (86.4)	1		1	<.001
Injection drug use <sup>d</sup>						
Yes	23 (39.7)	35 (60.3)	3.7 (1.6–8.6)	<.001		
No	14 (15.2)	78 (84.8)	1		—	—

<sup>a</sup> Only significant data are shown.

<sup>b</sup> Statistical significance at  $P < .05$ .

<sup>c</sup> Excluding 8 patients for whom radiographs were not mentioned in the medical record.

<sup>d</sup> Excluding 30 patients for whom information concerning drug use was not available.

seven (57.6%) of 151 IPs who had been admitted to the Infectious Disease Department were found in the IDW census. The remaining 64 patients had been distributed in other wards that did not have registries. Thirty-three (37.9%) of the 87 patients were in isolated rooms for the whole period of their hospital stay.

Fifty-four (62%) IPs shared rooms with 151 RPs. Forty-two RPs were excluded from the study because they had shared

rooms with patients who had TB that was not confirmed by culture or nonpulmonary TB. The final number of RPs who were studied was 109, 41 (38%) of whom were HIV infected and 68 (62%) of whom were not HIV infected. Every RP was classified according to HIV status, smear result, and TB therapy of the IP (table 3). Table 3 shows the RPs' exposure to 8 different risk situations, which varied from contact with treated, smear-negative IPs for ≤5 days to contact with untreated, smear-

**Table 2. General characteristics of the 11 cluster groups found among 151 patients with tuberculosis.**

Cluster and patient characteristics	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
No. of isolates <sup>a</sup>	3	4	9	4	4	2	2	3	2	2	2
No. of copies of IS6110	6	6	13	12	11	7	10	12	11	8	12
HIV status, no. positive/ no. negative	2/1	2/2	7/2	2/2	3/1	1/1	1/1	3/0	2/0	1/1	2/0
Result of acid-fast bacillus smear, no. positive/no. negative	3/0	2/2	6/3	2/2	2/2	0/2	1/1	3/0	1/1	0/2	1/1
Sex, no. male/no. female	1/2	4/0	8/1	3/1	3/1	2/0	2/0	2/1	2/0	1/1	2/0
Source of infection <sup>b</sup>	NF <sup>c</sup>	NF <sup>c</sup>	NF <sup>c</sup>	NF <sup>c</sup>	NF <sup>c</sup>	NF	NF	NF <sup>c</sup>	P <sup>c</sup>	NF	NF

**NOTE.** NF, not found; P, prison.

<sup>a</sup> The 11 clusters comprised 37 isolates.

<sup>b</sup> Epidemiological relationship between the patients.

<sup>c</sup> See comments in the epidemiological investigation section of Materials and Methods.

positive IPs for >5 days. However, it should be taken into account that the definition of untreated IPs included patients who had received <10 days of treatment. Among these groups, the theoretical higher risk of transmission was for RPs who had been exposed to untreated, smear-positive IPs: 9 (21.9%) of 41 HIV-infected RPs and 21 (30.8%) of 68 RPs without HIV infection. Most of the RPs (5 of 9 HIV-infected RPs and 17 of 22 RPs without HIV infection) were exposed to untreated, smear-positive IPs for ≤5 days (mean, 1–2 days).

Clinical follow-up was performed from the time of inclusion in the study protocol until the end of the study: 43% were followed for 60 months, 30.2% for ≥36 months, and 26.6% for 12–24 months. Twenty-eight of the HIV-infected patients (68.3%) and 26.4% of the patients without HIV died during the follow-up period as a result of other diseases (table 3). One HIV-infected RP developed TB 16 months after 2-days' exposure to an IP after the IP had received treatment for 1 month. RFLP analysis of both strains showed different patterns.

## DISCUSSION

The introduction of molecular typing in the epidemiology of *M. tuberculosis* has led to important advances in the knowledge of the risk factors associated with acquisition of infection and the development of the disease. The IS6110 RFLP technique [10] has been the most effective in epidemiologic studies of TB transmission [45, 46]. In this study, the IS6110-based RFLP typing method was used to detect unsuspected cases of nosocomial transmission of TB among patients who were admitted to our hospital.

The molecular analysis of 151 isolates selected in the study allowed identification of 11 clusters. An epidemiologic relationship was established in one of the clusters (5.4% of the isolates). Nonetheless, only 21 patients (56.7%) who were infected with

any cluster isolate shared a history of imprisonment or lived in the same neighborhood.

The following different population models of TB transmission that used the molecular methods have been reported: (1) general population [1–3, 11, 12]; (2) outbreaks of infection, often due to multidrug-resistant isolates that are found in closed communities or hospitals [15–17, 19, 20, 23–27]; (3) penitentiary populations or other restricted communities [21, 22, 47, 48]; and (4) detection of cases of unsuspected nosocomial transmission [18, 46]. The percentage of isolates found in clusters varied in these models; it ranged from 38%–55% in open population studies to 44%–89% in studies of outbreaks of infection. The situation in restricted communities and hospitals is intermediate (percentage of isolates found in clusters, 51%–74% and 25%–54%, respectively). Similarly, among the isolates included in clusters, a correlation may be established with conventional epidemiology in a small proportion of clusters in open population studies (10%–29%); this proportion may be very high during the course of outbreaks of infection (70%–90%). The data in the present study are similar to those observed in the monitoring of nosocomial transmission [18, 46] (5% and 2.2%, respectively).

Nineteen percent of the IPs who were infected with cluster isolates had been previously hospitalized in our center. However, none of the patients' hospital stays coincided with another, so transmission was not nosocomial. Nonetheless, the possible contact of these patients with other patients who acted as a common nosocomial source during previous admissions cannot be excluded.

Various risk factors associated with clustering have been described in the literature [1, 11, 12, 18, 46]. Univariate analysis associated the following factors with an increased risk of being infected with a cluster isolate: presence of cavitated TB, drug sensitivity that contrasts with the outbreaks of infection with

**Table 3. Classification of roommate patients during follow-up according to type and time of exposure to index patients with tuberculosis (TB).**

Characteristics of index patients (n = 54)	Exposure time, days <sup>a</sup>	No. (%) of roommate patients (n = 109)			
		HIV-positive		HIV-negative	
		Total	Survived ≥1 year	Total	Survived ≥2 years
Smear positive for TB					
Treated	≤5	4	2	1	1
	>5	3	1	0	0
Not treated	≤5	5	3	17	11
	>5	4	0	4	3
Smear negative for TB					
Treated	≤5	7	3	2	2
	>5	1	0	3	3
Not treated	≤5	12	4	31	21
	>5	4	1	10	9
Total		41	13 (37.7)	68	50 (73.5)

**NOTE.** The number of patients who were smear positive was 28; the number who were smear negative was 26. Roommate patients are patients without suspected or confirmed TB who shared a room with an index patient for at least 1 day. Treated, treatment with ≥10 days of continuous anti-TB therapy.

<sup>a</sup> Days that roommate patients shared a room with index patients.

multidrug-resistant isolates that have been reported [17, 24, 25], and a history of imprisonment and injection drug use. Recent studies of populations with characteristics similar to those of our patients show an important association between these last 2 factors and infection with a cluster isolate [22, 47]. In addition, multivariate analysis revealed that histories of TB and, especially, incarceration were independent risk factors for infection with cluster isolates.

In contrast [1, 3], no association was found between HIV infection and belonging to ≥1 cluster groups. This could be explained in part by the introduction of new antiretroviral therapies (one-third of the patients in this study had received these drugs). However, no specific investigation was performed to demonstrate this. On the other hand, previous episodes of TB were associated with infection with cluster isolates, and no other factor for recent transmission was found in these patients. This suggests that these patients could have been included in a common cluster group in the previous episode, and that the main mechanism of TB development in the present episode may be endogenous reactivation and relapse after poor treatment compliance instead of new exogenous episodes. Nevertheless, this point is not demonstrable because the strains of previous episodes were not available.

The aim of the second part of the study was to determine the risk of infection with and development of TB for RPs. Eighty-seven IPs were studied, and we evaluated their situation in the IDW and localized their contacts. During the maximum follow-up period of 60 months, none of the 109 RPs developed TB as a result of contact in the hospital with the IPs who were

studied. Forty-one of the RPs were HIV positive, and 30 (73%) presented CD4 cell counts of <200 cells/mm<sup>3</sup> during the exposure period, a condition that enhances the risk of developing TB [49]. A rapid progression has been reported in the development of active TB among HIV-infected patients [15, 23–27]. On the other hand, in clinical practice, it is admitted that after several days of chemotherapy, the patients may become noncontagious. Several early studies compared how many patients became infected with TB or developed TB after contact with a treated IP; they concluded that treated smear-positive or culture-positive patients were not more contagious than were treated IPs who had negative results of smear and culture [31, 39–42]. Moreover, bacteriological studies have demonstrated that the burden of bacteria decreases to 5% in 2 weeks [50]. However, with some exceptions [42], these studies were performed using patients who were not receiving drugs according to treatment schedules that included the most active drugs and did not clearly assess the time period in which the patients became noncontagious. Therefore, this issue still remains unsolved [51, 52].

The contacts of the IPs in the present study were evaluated on the basis of whether an initial 10-day treatment regimen had been completed (table 3). A total of 87 (79.8%) of the RPs were in contact with IPs who had received <10 days of anti-tuberculous therapy. However, most RPs were in contact with IPs for ≤5 days. Several reasons may explain the contact between IPs who had been treated for <10 days and RPs: for some IPs, TB was not suspected at admission, and for other IPs, TB was moderately suspected but initial smear results were

negative. Most of the untreated IPs (i.e., patients who received <10 days of therapy) who shared a room with an RP for >5 days had received 7–9 days of appropriate treatment.

A total of 73.5% of the immunocompetent RPs survived for 2 years, and 37.7% of HIV-infected RPs survived for 1 year. The highest risk of development of TB disease occurs during the first 2 years after infection [28–34]. Nonetheless, several factors may influence the development of TB, such as the age of the contact patient (TB occurs more frequently in children) [34] and elderly persons [53]; the intensity of smear positivity of the IP [54]; and the degree of relationship between the IP and the contact patient, which is greater for contact patients who sleep in the same room (9% of persons who slept in the same room vs. 6% of persons who did not sleep in the same room) [30, 55]. A more rapid progression to disease has been demonstrated in HIV-infected patients; it is 6.9%–13% during the first year for purified protein derivative (PPD)–positive or anergic patients and ~5% for PPD-negative patients, becoming highest (35%–50%) during nosocomial outbreaks of infection [15, 23]. It may theoretically be estimated that 1–2 of the HIV-infected RPs who survived and 2–3 of immunocompetent RPs who survived could have developed TB; however, no cases of TB were detected. Several factors may explain this fact: the unknown state of infection of the RPs; both the lack of homogeneity between duration of exposure and time of initiation of treatment of the IPs when contact occurred with the RP; the high mortality rate among the HIV-infected population (37.7% of the patients survived for 1 year after inclusion in the study); and the retrospective nature of the search for contact patients. In addition, the study was performed with the assumption that all cases of TB that were diagnosed in our city were detected by use of the active epidemiologic surveillance system of the Barcelona TB Program [56].

In conclusion, no evidence of nosocomial transmission was observed among the patients who were infected with the different cluster isolates that were determined. Nonetheless, a proportion of patients with culture-confirmed TB could not undergo the complete isolation measures indicated in the hospital program as a result of the lack of isolation rooms and the delay in the diagnosis, which was a consequence of TB not having been initially suspected or confirmed by positive results of staining. During this study, the hospital stays of up to 4 patients with TB likely coincided in the IDW, and 2 of these patients did not stay in an isolated single room. It may be concluded that more single isolation rooms are needed in a IDW that attends to >42 patients with pulmonary TB per year. The use of the IS6110-based RFLP typing technique for *M. tuberculosis* as a screening tool may be justified in the surveillance of TB transmission.

## Acknowledgments

We thank the Microbiology Department and Infectious Diseases Department of the Hospital Clinic of Barcelona for their collaboration in the study, especially J. Geladó; P. Gorrindo and Dr. H. Galdós-Tangüis, from the Barcelona Department of Public Health; and Dr. R. Guerrero, from the Conselleria de Justicia, Generalitat de Catalunya, for the information concerning incarcerated patients. We are indebted to Drs. P. Coll, F. March, and X. Garriga, from Hospital de Sant Pau of Barcelona, for their technical advice.

## References

1. Small PM, Hopewell PC, Singh SP, et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco: a population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med* 1994; 330:1703–9.
2. Braden CR, Templeton GL, Cave MD, et al. Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a state with a large rural population. *J Infect Dis* 1997; 175: 1446–52.
3. van Deutekom H, Gerritsen JJ, van Soolingen D, et al. A molecular epidemiological approach to studying the transmission of tuberculosis in Amsterdam. *J Infect Dis* 1997; 25:1071–7.
4. Dale JW. Mobile genetic elements in mycobacteria. *Eur Respir J Suppl* 1995; 20:633s–648s.
5. McAdam RA, Hermans PWH, van Soolingen D, et al. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. *Mol Microbiol* 1990; 4:1607–13.
6. Cave MD, Eisenach KD, McDermott PF, et al. IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. *Mol Cell Probes* 1991; 5:73–80.
7. Ross BC, Raios K, Jackson KM, et al. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J Clin Microbiol* 1992; 30:942–6.
8. Hermans PWM, van Soolingen D, Bik EM, et al. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a host-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect Immun* 1991; 59:2695–705.
9. Hermans PW, van Soolingen D, van Embden JD. Characterization of a major polymorphic tandem repeat in *Mycobacterium tuberculosis* and its potential use in the epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium goodii*. *J Bacteriol* 1992; 174:4157–65.
10. van Embden DJA, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31:406–9.
11. Sufi H, Aznar J, Palomares JC. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated during a 3-year period (1993 to 1995) in Seville, Spain. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2472–6.
12. Samper S, Iglesias MJ, Rabanaque MJ, et al. The molecular epidemiology of tuberculosis in Zaragoza, Spain: a retrospective epidemiological study in 1993. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997; 2:281–7.
13. Small PM, Shafer RW, Hopewell PC, et al. Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. *N Engl J Med* 1993; 328:1137–44.
14. Bauer J, Thomsen V, Poulsen S, et al. False-positive results from *Mycobacterium tuberculosis* due to laboratory cross-contamination confirmed by restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 1997; 35:988–91.
15. Dooley SW, Villarino ME, Lawrence M. Nosocomial transmission of tuberculosis in a hospital unit for HIV-infected patients. *JAMA* 1992; 267:2632–5.



16. Jereb JA, Burwen DR, Dooley SW, et al. Nosocomial outbreak of tuberculosis in a renal transplant unit: application of a new technique for restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Infect Dis* 1993;168:1219-24.
17. Blázquez H, Espinosa de los Monteros LE, Samper S, et al. Genetic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus positive patients. *J Clin Microbiol* 1997;35:1390-3.
18. Lemaître N, Sougakoff W, Truffot-Pernot C, et al. Use of DNA fingerprinting for primary surveillance of nosocomial tuberculosis in a large urban hospital: detection of outbreaks in homeless people and migrant workers. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998;2:390-6.
19. Barnes PF, El-Hajj H, Preston-Martin S, et al. Transmission of tuberculosis among the urban homeless. *JAMA* 1996;275:305-7.
20. Frieden TR, Sherman L, Maw KL, et al. A multi-institutional outbreak of highly drug-resistant tuberculosis. *JAMA* 1996;276:1229-35.
21. Chaves F, Drona F, Cave MD, et al. A longitudinal study of transmission of tuberculosis in a large prison population. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:719-25.
22. March F, Coll P, Guerrero RA, et al. Predictors of tuberculosis transmission in prison: an analysis conventional and molecular methods. *AIDS* 2000;14:1-11.
23. Daley CL, Small PM, Schecter GF, et al. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with immunodeficiency virus: an analysis using restriction fragment length polymorphism. *N Engl J Med* 1992;326:231-5.
24. Coronado VG, Beck-Sague CM, Hutton MD, et al. Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among persons with human immunodeficiency virus infection in a urban hospital: epidemiologic and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Infect Dis* 1993;168:1052-5.
25. Tabet SR, Goldbaum GH, Hooton TH, et al. Restriction fragment length polymorphism analysis detecting a community-based tuberculosis outbreak among persons infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1994;169:189-92.
26. Rullan JV, Herrera D, Cano R, et al. Nosocomial transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Spain. *Emerg Infect Dis* 1996;2:125-9.
27. Di Perri G, Cruciano M, Danzi MC, et al. Nosocomial epidemic of active tuberculosis among HIV-infected patients. *Lancet* 1989;2(8678-9):1502-4.
28. Comstock GW, Livesay VT, Woolpert SF. The prognosis of a positive reaction in childhood and adolescence. *Am J Epidemiol* 1974;99:131-8.
29. British Medical Research Council. BCG and vole bacillus in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life. *Bull World Health Organ* 1972;46:371-85.
30. Vidal R, Miravilles M, Caylà J, et al. A contagiousness study in 3071 familial contacts of tuberculosis patients. *Med Clin (Barc)* 1997;108:361-5.
31. Kamat SR, Dawson JY, Devadatta S, et al. A controlled study of the influence of segregation of tuberculous patients for one year on the attack rate of tuberculosis in a 5 year period in close family contacts in South India. *Bull World Health Organ* 1966;34:517-32.
32. Contact Study Sub-Committee of the Research Committee of the British Thoracic Association. A study of a standardised contact procedure in tuberculosis. *Tubercle* 1978;59:245-59.
33. International Union against Tuberculosis Committee on Prophylaxis. Efficacy of various durations of isoniazid preventive therapy for tuberculosis: five years of follow-up in the IAUT trial. *Bull World Health Organ* 1982;60:555-64.
34. Rieder HL, Cauthen GM, Comstock GW, Snider DE. Epidemiology of tuberculosis in the United States. *Epidemiol Rev* 1989;11:79-98.
35. Solera J, López E, Serna E, et al. Risk of tuberculosis in parenteral drug addicts with human immunodeficiency seropositivity: a cohort study in detoxification communities. *Med Clin (Barc)* 1993;100:725-9.
36. Moreno S, Baraya J, Parras F, et al. Desarrollo de tuberculosis en pacientes anérgicos infectados por VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1992;10(Suppl 2):123.
37. Guelar A, Gatell JM, Verdejo J, et al. A prospective study of the risk of tuberculosis among HIV infected patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1992;10(Suppl 2):122.
38. Selwyn PA, Sckell BM, Alcabes P, et al. High risk of active tuberculosis in HIV-infected drug users with cutaneous anergy. *JAMA* 1992;268:504-9.
39. Riley RL, Moodie AS. Infectivity of patients with pulmonary tuberculosis in inner-city homes. *Am Rev Respir Dis* 1974;110:810-2.
40. Gunnels JJ, Bates JH, Swindoll H. Infectivity of sputum-positive tuberculosis patients on chemotherapy. *Am Rev Respir Dis* 1974;109:323-30.
41. Eddison GG, Farmer BM. A control study of home versus hospital treatment of tuberculosis: three year study results. *Am Rev Respir Dis* 1971;103:886-7.
42. Brooks SM, Lassiter NL, Young EC. A pilot study concerning the infection risk of sputum positive tuberculous patients on chemotherapy. *Am Rev Respir Dis* 1973;108:799-804.
43. Kubica GPW, Dye E, Cohn ML, et al. Sputum digestion and decontamination with *N*-acetyl-L-cysteine-sodiumhydroxide for culture of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1963;87:775-9.
44. González J, Tudó G, Gómez J, et al. Use of microscopic morphology in smears prepared from radiometric cultures for presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium xenopi*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:493-500.
45. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 1999;37:2607-18.
46. French AL, Sharon WF, Dietrich SE, et al. Use of DNA fingerprinting to assess tuberculosis infection control. *Ann Intern Med* 1998;129:856-61.
47. Solsona J, Caylà J, Verdú E, et al. Molecular and conventional epidemiology of tuberculosis in an inner city district. The Cooperative Group for Contact Study of Tuberculosis Patients in Ciutat Vella. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;1:1-8.
48. Caminero A, Pena MJ, Campos-Herrero MI, et al. Exogenous reinfection with tuberculosis on a European island with a moderate incidence of disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:717-20.
49. Theuer P, Hopewell PC, Elias D, et al. Human immunodeficiency virus infection in tuberculosis patients. *J Infect Dis* 1990;162:8-12.
50. Yaeger H, Lacy J, Smith LR, LeMaistre CA. Quantitative studies of mycobacterial populations in sputum and saliva. *Am Rev Respir Dis* 1967;95:998-1004.
51. Noble RL. Infectiousness of pulmonary tuberculosis after starting chemotherapy: review of the available data on an unresolved question. *Am J Inf Control* 1981;9:6-10.
52. Menzies D. Effect of treatment on contagiousness of patients with active pulmonary tuberculosis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997;18:582-6.
53. Stead WW, Lofgren JP. Does the risk of tuberculosis increase in old age? *J Infect Dis* 1983;147:951-55.
54. Grzybowski S, Barnett GD, Styblo K. Contacts of cases of active pulmonary tuberculosis. *Bull Int Union Tuberc* 1975;50:90-106.
55. Riley RL. The J. Burns Amberson lecture: aerial dissemination of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Tuberc* 1957;76:931-41.
56. Caylà JA, Galdós-Tangüis H, Jansà JM, et al. Evolución de la tuberculosis en Barcelona (1987-1995): influencia del virus de la inmunodeficiencia humana y las medidas de control. *Med Clin (Barc)* 1998;111:608-15.



## II

### STUDY OF RESISTANCE TO ANTI-TUBERCULOSIS DRUG IN FIVE DISTRICT OF EQUATORIAL GUINEA: RATES, RISK FACTORS, GENOTYPING OF GENE MUTATIONS AND MOLECULAR EPIDEMIOLOGY

*The International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases* 2004;8:15-22

G. Tudó, J. González, R. Obama, JM. Rodríguez, JR. Franco, M. Espasa, P. Simarro, G. Escaramís, C. Ascaso, A. García, MT. Jiménez de Anta.

Estudi prospectiu de resistències als fàrmacs antituberculosos desenvolupat a Guinea Equatorial de març del 1999 a febrer del 2000. Els objectius van ser determinar la freqüència de resistència en casos nous i prèviament tractats, estudiar els factors de risc associats a la resistència, descriure genèticament les mutacions associades a la resistència a la INH i la RMP i tipificar les soques resistents.

Durant tot el període d'estudi es van estudiar 499 malalts. D'aquest 240 foren cultiu positiu i identificat com a complex *M. tuberculosis*. L'antibiograma va ser possible en 236 soques. La freqüència de resistència entre casos nous va ser del 16.9% (38/224), i entre els casos prèviament tractats va ser de 41.6% (4/5). La monoresistència a la INH va ser majoritària en els dos grups d'un 12.5 i 16.6%, respectivament. La MDR es va observar en

el 1.7 i el 25 % en casos nous i prèviament tractats, respectivament. El sexe femení va ser associat amb resistència en casos nous (OR 2.5; 95% CI 1.2-5.2 ). De les 41 soques resistents a la INH 33 (80.5%) tenien mutat el gen *inhA*, i totes les soques tenien resistències a la INH de baix nivell. No hi va haver cap soca amb mutació en el gen *katG*, i les vuit soques restants no tenien cap mutacions en cap dels dos gens estudiats. Vuit soques van ser resistents a la RMP i sis tenien el gen *rpoB* mutat. El 86% de les soques resistents van ser tipificades i 30 d'aquestes soques van determinar 7 agrupacions.

L'estudi va detectar una freqüència moderada de resistència entre casos nous, amb predomini de resistència de baix nivell a la INH associada a mutacions en el gen *inhA*; amb un alt percentatge de soques resistents agrupades.

## Study of resistance to anti-tuberculosis drugs in five districts of Equatorial Guinea: rates, risk factors, genotyping of gene mutations and molecular epidemiology

G. Tudó,\* J. González,\* R. Obama,† J. M. Rodríguez,‡ J. R. Franco,‡ M. Espasa,\* P. P. Simarro,‡ G. Escaramís,§ C. Ascaso,§ A. García,† M. T. Jiménez de Anta\*

\* Hospital Clínic de Barcelona, Servei de Microbiologia, Barcelona, Spain; † Ministerio de Sanidad, Programa de Lucha Contra la TB de Guinea Ecuatorial, Malabo, ‡ Fundació CIDOB, Bata, Equatorial Guinea; § Universitat de Barcelona, Salut Pública, Barcelona, Spain

### SUMMARY

**SETTING:** Five districts in Equatorial Guinea, March 1999 to February 2001.

**OBJECTIVES:** To determine tuberculosis drug resistance among new and previously treated cases, the risk factors associated with resistance, and the mutations associated with isoniazid and rifampicin (*katG*, *inhA* and *rpoB* genes) resistance, and to genotype resistant strains.

**RESULTS:** A positive culture identified as *Mycobacterium tuberculosis* complex was obtained in 240/499 patients. Susceptibility testing was performed in 236 strains. The overall resistance rate in new cases was 16.9% compared to 41.6% in previously treated cases. Isoniazid resistance was the most frequent (respectively 12.5% and 16.6%) in the two groups, while multidrug resistance was observed in 1.7% and 25% of new and

previously treated cases, respectively. Female sex was statistically associated with resistance in new cases. Of 41 isoniazid-resistant strains, 33 (80.5%) had mutations in the *inhA* gene; none had mutations in the *katG* gene and eight had no mutations in either gene. All strains had low-level isoniazid resistance. Of eight strains resistant to rifampicin, six had mutations in the *rpoB* gene. Genotyping defined seven clusters.

**CONCLUSIONS:** Moderate resistance was found in new cases. Low-level isoniazid resistance predominated among mutations in the *inhA* gene, with a high percentage of clustering in resistant strains.

**KEY WORDS:** tuberculosis; drug resistance; *katG*, *inhA*, *rpoB* genes; transmission; Africa

ONE THIRD of the world's population is infected with *Mycobacterium tuberculosis*, with about 8.4 million new cases of tuberculosis (TB) worldwide. This increase is largely due to a 20% rise in the incidence of TB in the African countries most affected by the human immunodeficiency virus (HIV) and acquired immune-deficiency syndrome (AIDS) epidemic. If the present trend continues, 10.2 million new cases may be expected in 2005, with more cases being observed in Africa than in any other World Health Organization (WHO) region.<sup>1</sup>

The emergence of anti-tuberculosis drug resistance is an increasing problem for populations and TB control programmes in industrialised and developing countries alike. A recent global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance by the WHO and the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD),<sup>2</sup> reported a prevalence of drug resistance among new cases of more than 10% in more than 30 countries; it also identified 14 coun-

tries in which multidrug resistance (MDR-TB, defined as resistance to at least isoniazid [INH] and rifampicin [RMP]) among new cases was more than 3%. In Africa, the overall level of resistance among new cases was from 6.3% to 24.8%, and the level of MDR-TB was 1% to 5.3%.<sup>2</sup> However, the data available on the rates of drug resistance in Africa are not extensive, as only eight countries have conducted nationwide surveillance of the level of drug resistance.<sup>2</sup>

Equatorial Guinea is in the Gulf of Guinea in West Africa and has an area of 28 051 km<sup>2</sup>, with a population of 442 000. The country is made up of a continental zone, a large island (Bioko) and a small island (Annobon). Administratively, Equatorial Guinea is divided into 18 districts. The National Tuberculosis Control Programme (NTCP) of Equatorial Guinea was established in 1986 by the Ministry of Health.<sup>3</sup> The Spanish International Cooperation Agency (AECI) has supported the NTCP since its initiation, and the

Correspondence to: Griselda Tudó, Julián González, Servei de Microbiologia, Hospital Clínic de Barcelona, c/ Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain. Tel: (+34) 93 227 5522. Fax: (+34) 93 227 9372. e-mail: gonzalez@clinic.ub.es, griselda@medicina.ub.es

Article submitted 23 December 2002. Final version accepted 18 June 2003.

CIDOB Foundation, a non-governmental organisation (NGO), provided support from 1996 to 2001. The NTCP covers 16 of the 18 health districts (89%), providing health care to 96.3% of the overall population. Patients are diagnosed following NTCP guidelines, which include clinical symptoms and smear values.<sup>3</sup> The treatment guidelines for new cases include INH, RMP, pyrazinamide (PZA) and ethambutol (EMB) administered over a 6-month period. The NTCP guidelines do not include a policy on treatment with second-line drugs.

In 2000, the number of new cases and the incidence of smear-positive cases were estimated at 141 and 113 per 100 000 population, respectively. Treatment was initiated in 98.2% of the cases, and 13.6% of the TB patients had HIV co-infection (NTCP 2000 report, unpublished data). No published information on drug resistance was available in Equatorial Guinea before the study.

The aim of this study was to determine the frequency and type of resistance to first-line anti-tuberculosis drugs, to identify those associated with resistance in TB patients, to describe the mutations associated with resistant strains, and finally, to study the geographic distribution of resistant strains in five districts of Equatorial Guinea over a 2-year period.

## STUDY POPULATION AND METHODS

### *Study setting*

The study was carried out over 24 consecutive months, from 1 March 1999 to 28 February 2001, in five of the 18 districts in Equatorial Guinea: one district in the continental zone (Bata), and four districts of Bioko Island (Malabo, Riaba, Luba and Baney). The 13 remaining districts were not included because it was impossible to keep samples refrigerated or frozen until transport to the Malabo and Bata TB clinics.

### *Patients*

Thirty-nine per cent of the overall population was studied. Patients diagnosed with TB within the geographic area defined in the study during the established study period were included in the study, while those patients who fulfilled the inclusion criteria but in whom samples were not provided were excluded. The criteria for TB diagnosis were those described by the NTCP.<sup>3</sup> Briefly, a diagnosis of TB was established in those patients with clinical manifestations compatible with any site of TB and who were smear-positive, or those patients with the above criteria but who were smear-negative and who decided to initiate anti-tuberculosis treatment after other diseases were excluded from the diagnosis. Treatment of TB patients, independent of HIV status, consisted of the following: 1) new cases: INH, RMP, PZA and EMB for 3 months, followed by INH and RMP for 4 months. Patients were admitted to hospital and received directly observed

treatment (DOT) during the first 2 months; following hospital discharge the patients were given drugs for 15 days of treatment and were asked to return for a control visit and collect the following 15-day treatment. This was done until completion of the second phase of treatment. 2) Retreatment or therapeutic failure cases: INH, RMP, EMB, PZA and streptomycin (SM) were given for 2 months, followed by INH, RMP, EMB and PZA for 1 month and INH, RMP and EMB, for 5 months. 3) Chronic cases, defined as retreatment failures, are treated for an indefinite period with INH. Only in cases of MDR was ofloxacin (OFX) administered, when available and if the drug susceptibility test (DST) was sensitive. Cases suspected of being resistant (recent previous treatment, treatment failure, and poor evolution with fever and persistent toxic syndrome) were prioritised for DST so that treatment could be modified accordingly.

### *Sample collection*

In accordance with NTCP guidelines, two sputum samples were obtained from each patient for diagnostic purposes: one on the first consultation, and the other the following day. Smear microscopy was performed for each sample in the Bata and Malabo laboratories. One of each two samples was frozen, and sent every 4 months to the Microbiology Laboratory at Hospital Clínic, Barcelona, for the remaining studies. For children in whom sputum could not be obtained, a single gastric aspiration was performed.

### *Patient data*

A data sheet designed for collecting information on each study patient included demographic data: sex, age, country of origin, district; clinical data: HIV status, alcohol consumption (interviewer's subjective evaluation), tuberculin skin test (read by the TB district supervisor in accordance with NTCP criteria: children aged <5 years in contact with smear-positive patients), residence in another country, history of familial TB, previous TB, chemoprophylaxis (indicated by the NTCP in children aged <5 years in contact with TB patients; chemoprophylaxis consisted of INH for 6 months after active TB disease was eliminated by clinical symptoms and X-ray), clinical form, and microbiological data: culture and smear results, species identification and DST.

### *Mycobacterial cultures*

The samples were digested and decontaminated by the NaOH-N-acetyl-cysteine method,<sup>4</sup> and were cultured on Löwenstein-Jensen slants (BBL) and in radio-metric BACTEC 12B medium (Becton Dickinson, Sparks, MD). Identification was confirmed using commercial DNA probes (AccuProbe; Gen Probe, San Diego, CA)<sup>5</sup> and polymorphic restriction analysis (PRA).<sup>6,7</sup>



### Drug susceptibility testing method

DST was performed using the proportions method by the radiometric system.<sup>8</sup> All of the positive cultures were tested against first-line anti-tuberculosis drugs at the following concentrations: 0.1 µg/ml for INH, 2 µg/ml for RMP, 7.5 µg/ml for EMB, 6 µg/ml for SM, and 100 µg/ml for PZA. On detection of first-line drug resistance, the strain was tested with second-line anti-tuberculosis drugs at the following concentrations: 5 µg/ml for amikacin (AMK), 5 µg/ml for capreomycin (CAP), 50 µg/ml for cycloserine (CIC), 5 µg/ml for ethionamide (ETH), 5 µg/ml for kanamycin (KAN), 1 µg/ml for OFX, 0.5, 1 and 2 µg/ml for rifabutin (RFB), and increasing INH concentrations of 0.2, 0.4, 1, 5 and 10 µg/ml.

### Definitions

The definitions used for resistant cases were those recommended by the WHO/IUATLD:<sup>2</sup> resistance among new cases was defined as resistance to at least one of the anti-tuberculosis drugs in patients who had never been treated with these drugs or who had received treatment for less than one month. Resistance among previously treated cases was defined as resistance to at least one of the anti-tuberculosis drugs in patients who had previously been treated for at least one month. MDR was defined as resistance to at least INH and RMP. Polyresistance was defined in this study as resistance to more than one drug, but not simultaneous resistance to INH and RMP.

### HIV testing

HIV status was studied retrospectively only in smear-positive TB patients. The test was performed on filter blood samples collected at the time of diagnosis using a described method.<sup>9</sup> A rapid test, Determine™ HIV-1/2 test (Abbott, Abbott Park, IL, USA), was performed in Equatorial Guinea using a double-blind method. Positive results were confirmed in Barcelona using the INNO-LIA™ HIV confirmation kit (Innogenetics, Gent, Belgium). The test results were included in the database in Barcelona.

### Genotyping of the mutations

#### Taqman® probes and primer design

The gene sequences of insertion sequence (IS)6110, *katG*, *inhA*, and *rpoB* were selected from the Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Using the software programme Primer Express 1.5 (Applied Biosystems®, ABI, Foster City, CA), Taqman® probes and primers for each genetic zone were designed. According to the prevalence of mutations found in genetically characterised strains collected for a previous study,<sup>10</sup> the mutation zones selected for study were: codon (c) 315 of the *katG* gene, ribosome binding site (RBS) of the *inhA* gene for INH, and the 81 base pairs (bp) between c432 and c458 of the *rpoB* gene for RMP. Two

fluorescent probes were designed for each mutation site, one homologous to a susceptible DNA strain (labelled with FAM fluorophor), and the other to a mutated DNA strain (labelled with VIC fluorophor). In the case of the *rpoB* gene, five probe pairs were designed to cover the 27 target codons.<sup>11</sup>

#### Clinical sample DNA extraction

One ml samples were centrifuged for 10 min at 13 000 rpm, the supernatant was rejected and the sediment was resuspended with 200 µl of TE buffer and inactivated for 45 min at 95°C in a thermal cycler. A silica gel column system (High Pure DNA Extraction Kit, Roche Diagnostics®, Indianapolis, IN) was used for DNA extraction following the manufacturer's instructions.

#### Amplification-hybridization assay

For each sample studied, eight amplification analyses were made (IS6110, c315 *katG*, RBS *inhA*, 5x c432-456 *rpoB*).<sup>11</sup> The pair of probes designed (wild type FAM, mutated VIC) for each resistance gene were mixed in the same amplification reaction. The amplification programme was the same for all amplification reactions; 2 min at 50°C, 10 min at 95°C and 40 cycles of 15 sec at 95°C and 60 sec at 60°C. Amplifications were performed in an ABI Prism 7700 (Applied Biosystems®) spectrofluorometric thermal cycler.

#### Results analysis

The results obtained were analysed by the Software Sequence Detection System (Applied Biosystems®).

#### Molecular analysis

IS6110-RFLP patterns were determined according to standard procedures.<sup>12</sup> Fingerprinting patterns were analysed visually. A cluster was defined as two or more strains with identical numbers of copies and locations of IS6110.

#### Follow-up of the TB patients

The patients were followed for different lengths of time (14–30 months), depending on when they were diagnosed, i.e., since the first (1999–2000) or second (2000–2001) study period. Two follow-up methods were carried out: 1) active follow-up: during the treatment period follow-up consisted of weight control, adverse drug reactions, evolution of clinical symptoms, and control bacilloscopy at 2, 4 and 6 months in accordance with NTCP guidelines.<sup>3</sup> Clinical resistance was suspected when the smear remained positive after 2 months of treatment, and persistence was considered depending on whether the patient presented significant improvement in fever and cough. Clinical resistance was confirmed when the smear remained positive after 4 months of treatment with persistence of clinical symptoms; 2) passive follow-up: after completion of treatment, follow-up was

performed by reviewing official notifications of cases to the Equatorial Guinea NTCP.

#### Statistical analysis

Demographic, clinical and laboratory characteristics of patients considered as new cases were compared with those of previously treated patients using a logistic model. In addition, the associations between the risk factors studied in patients with a resistant DST result were evaluated with a logistic model using the generalised estimating equations (GEE) technique, which controls the statistical dependence among individuals in the same cluster.<sup>13</sup> *P* values <0.05 were considered statistically significant. The differences between relapses in sensitive and resistant patients were evaluated using Fisher's exact test. Statistical analyses were performed using the SPSS 10.0 (Chicago, IL) and SAS 8.0 (Cary, NC) statistical packages.

## RESULTS

### Patients

From March 1999 to February 2001, 1043 patients from all of Equatorial Guinea were diagnosed with TB (NTCP 2000 report, unpublished data). In the study area, Bata district and Bioko Island, 499 (47.8%) patients were studied; 57.9% were smear positive. The male:female ratio was 277:222, with a mean age of 33.3 years (range 2–85). Thirty-five (7%) patients were aged under 15 years and 93.5% of the cases were born in Equatorial Guinea. HIV testing was performed in 376 of the 499 patients (75.3%). Co-infection with HIV was observed in 13.5% (51/376) of the patients studied.

### Samples and strains

Five hundred and three samples were collected from the 499 patients included during the study period. Four patients had two samples corresponding to different TB episodes. Culture was negative in 167/503 samples (33.2%) and was contaminated in 92/503 (18.2%). Respectively 67 and 25 of the culture-negative and contaminated samples were smear-positive. Finally, 244 (48.5%) samples were culture-positive, 82.4% of which were smear-positive. Samples from patients under 15 years of age were distributed as follows: three children under 10 years of age (2, 5 and 7 years), and 33 (94.2%) children between 11 and 15 years of age. Seventeen (51.5%) were smear-positive.

*M. tuberculosis* complex was identified in 98.3% of the cases (240 strains were *M. tuberculosis* and one was *M. bovis*) and the remaining isolates were identified as non-tuberculous mycobacteria (one *M. goodii* and two *M. fortuitum* complex).

DST was performed in 236 strains (four isolates were not recovered for susceptibility testing) (Table 1): 193 (81.7%) strains were drug-susceptible, and 43 (18.2%) strains presented resistance to one (32

**Table 1** Patterns of resistance among new and previously treated cases

Pattern of resistance	New cases (n = 224) n (%)	Previously treated cases (n = 12) n (%)
No resistance	186 (83.0)	7 (58.3)
Some resistance	38 (16.9)	5 (41.6)
One drug resistance	30 (13.4)	2 (16.6)
H	28 (12.5)	2 (16.6)
R	0	0
E	0	0
S	2 (0.9)	0
Z	0	0
Multidrug resistance*	5 (2.2)	3 (25.0)
HR	3 (1.3)	0
HRE	1 (0.45)	2 (16.6)
HRS	0	1 (8.3)
HRSZ	1 (0.45)	0
Polyresistance	3 (1.3)	0
HS	3 (1.3)	0

\* Defined as resistance to at least H and R.

H = isoniazid; R = rifampicin; E = ethambutol; S = streptomycin; Z = pyrazinamide.

mono-resistant strains) or more drug (eight MDR and three poly-resistant strains).

### Resistance among new cases

Of the 236 strains studied, 224 (95%) were new cases (Table 1). Resistant strains were isolated in 38 (16.9%) patients, with 13.4% showing resistance to one drug: 12.5% demonstrated resistance to INH and 0.9% were resistant to SM. MDR was detected in 2.2% and polyresistance was detected in 1.3%. Among patients aged ≤15 years, four cases of resistance to INH were detected (10.5%).

### Resistance among previously treated cases

Of the 236 strains studied, 12 (5%) were previously treated cases (Table 1). Five (41.6%) patients showed resistance to one or more drug, with 16.6% resistant to one drug. MDR was detected in 25%. No resistance was detected among previous cases in patients ≤15 years.

### Second-line drug resistance

All the 43 strains showing resistance to first-line drugs were tested against second-line drugs, and 12 patients (28%) showed resistance (Table 2). All the patients resistant to RMP were also resistant to RFB; strains resistant to ETH were associated with INH resistance.

### Risk factors associated with resistance among new cases

The variable female sex (11.5% vs. 24.7%, OR 2.5; 95% CI 1.2–5.2, *P* = 0.009) was found to be significantly associated with resistance among new cases on bi- and multivariate analysis. This significance was not



**Table 2** Relationship between resistance to first- and second-line drugs

Resistant strains (n = 12)	First-line drug resistance	Second-line drug resistance
1	H	ETH
1	HS	ETH
2	HS	OFX
1	HR	RFB
2	HR	ETH + RFB
1	HRE	RFB
2	HRE	ETH + RFB
1	HRS	ETH + RFB + CYC
1	HRSZ	RFB + OFX + CYC

H = isoniazid; R = rifampicin; E = ethambutol; S = streptomycin; Z = pyrazinamide; ET = ethionamide; RFB = rifabutin; OFX = ofloxacin; CYC = cycloserine.

found when statistical analysis was adjusted for the fact of being in a cluster. Other factors studied for which no association was found with risk of resistance were: age, district, country of origin, residence in another country, history of familial TB, HIV status, sputum smear result, alcohol consumption, tuberculin skin test, chemoprophylaxis and clinical presentation.

#### Genetic analysis of the mutations

Of the 43 resistant strains, 41 were INH-resistant. Thirty-three (80.5%) had mutations in the RBS of the *inhA* gene, and no strain had mutations in the *katG* gene. Moreover, the mutations studied were not observed in the eight remaining INH-resistant strains. On analysing the distribution of mutations according to new and previously treated cases, 29/36 (80.5%) new cases had a mutation in the *inhA* gene, as did 4/5 (80%) previously treated cases. In addition, 32 (78%) of the INH-resistant strains with a mutation in the *inhA* gene had low-level resistance. Eight strains were resistant to RMP: six (75%) had mutations in the *rpoB* gene, with five showing mutations in c456 and in c451 in the remaining strain.

#### Molecular epidemiology of resistant strains

Molecular typing was available for 37 (86%) of the 43 resistant strains. The patterns obtained were analysed with those corresponding to sensitive strains (data not shown). Different patterns were found in seven strains (18.9%), and the remaining 30 strains (81%) were classified into seven different cluster groups (I–VII). The size of the clusters ranged from 2 to 21 strains. Clusters V, VI and VII had two strains, one resistant and the other sensitive. Cluster IV was composed of two resistant and two sensitive strains. Cluster III had two resistant strains. Cluster II was composed of two MDR strains, and finally one cluster included 21 low-level INH-resistant strains and three sensitive strains. The main characteristics of the patients in clusters were: 56.6% were females; 10% HIV-positive (although HIV status was not deter-

mined in 28% of the patients); 60% lived in Bata; and 90% were new cases.

The strains associated with clusters were isolated throughout the study period. The hypothesis of cross-contamination was eliminated, as the samples were processed in different culture lots. The mechanism of transmission among cluster patients with resistant strains could not be determined.

#### Follow-up of the TB patients

Of the 236 TB patients in whom DST had been performed, 120 were followed for 14–18 months and 116 were followed for 19–30 months. When the DST was determined, most of the patients were in the final stages of treatment, with no signs of treatment failure. All the cases with resistance to more than one drug presented treatment failure and initiated retreatment. With respect to the evolution of patients with resistance to more than one drug, the results of follow-up were as follows: among the eight MDR cases, two died during treatment, two remained chronic, two abandoned treatment and two were cured after retreatment. The three polyresistant cases (Table 1) were cured after retreatment. None of the patients with low-level INH monoresistance showed clinical suspicion of any resistance during the standard treatment period, and their evolution was good. Relapse was observed in 2/193 (1.03%) patients with sensitive strains and in none of the 30 patients with INH-monoresistant strains ( $P = 0.1889$ ).

## DISCUSSION

The present study was mainly aimed at determining anti-tuberculosis drug resistance in Malabo (and Bioko Island) and Bata Districts in Equatorial Guinea by establishing the frequency of *M. tuberculosis* resistance to first-line drugs in new and previously treated cases, describing the resistance mutations to RMP and INH (and their association with the level of resistance), and analysing the molecular epidemiology of the resistant strains.

The overall rate of resistance among new cases was 16.9%. Different studies in Africa have shown similar rates, from 14.4% to 20.8%,<sup>14–17</sup> but some of these studies should be interpreted with caution, as they were carried out several years ago. In addition, the level of anti-tuberculosis drug resistance in the districts studied is comparable to areas and/or countries in West Africa such as the Ivory Coast (13.4%),<sup>18</sup> the Central African Republic (16.4%),<sup>19</sup> and West Cameroon (19.7%),<sup>20</sup> and is lower than the levels of 31.8% observed in Yaounde, Cameroon,<sup>21</sup> or 54.4% in Ghana.<sup>22</sup>

The overall rate of resistance among previously treated cases was 41.6%; the rates in some African countries range from 11.1% to 51.1%.<sup>2,16,17,23</sup> Relatively similar levels have been reported in West African

countries: 56% in Nigeria,<sup>24</sup> 58.2% in Yaounde, Cameroon,<sup>25</sup> and 63% in the Central African Republic.<sup>19</sup>

Among new cases, the highest monoresistance observed in our study was associated with INH (12.5%). The resistance rate to INH in other African countries ranged from 2.1% to 8.4%.<sup>2,15-17,20</sup> On the other hand, resistance to SM was only 0.9%, much lower than the rates reported in other African countries (range 2.5% to 14.5%)<sup>2,15-17,20</sup> and may be explained by the use of therapeutic schedules without SM since the implementation of the NTCP.

The high prevalence of MDR-TB is the result of poor therapeutic management of TB cases. The overall rates of MDR in new and previously treated cases were 1.7% and 2.5%, respectively. In other African studies these rates ranged from 0.5% to 3.5% in new cases, and from 1.4% to 18.2% in previously treated cases.<sup>2,16,17,20</sup> According to the WHO/IUATLD study,<sup>2</sup> the MDR rates of the districts studied could be considered moderate, and similar to those in other developing countries. However, it should also be taken into account that the MDR-TB cases could be underestimated since the overall number of cases studied is limited.

On multivariate analysis, the variable of female sex was associated with resistance in new cases. Studies in African populations have found a similar relationship between resistance and female sex.<sup>26</sup> On the other hand, other studies developed in African populations and published in the last 2 years have found an association between women and clustering.<sup>23,27,28</sup> In our study, 21 of the 38 resistant strains of new cases belonged to the same cluster, which may affect the evaluation of the risk factors. When the statistical dependence between the individuals with strains in the same cluster was controlled, no association was found between women and resistance, suggesting that other factors may favour the female sex/cluster relationship, and may possibly be an example of cultural factors rather than an association between female sex and resistance.<sup>23,27</sup>

As reported in other studies from sub-Saharan Africa<sup>18,21,29</sup> and the recent Global Project on Drug Resistance,<sup>2</sup> no significant association was observed between the level of resistance to TB drugs and HIV infection status in the new cases. However, the number of cases of HIV lacking results in this study (25%) could be a limitation in analysing this relationship.

On studying the genetic alterations of INH, mutations were observed in the *inhA* gene in 80.5% of the resistant strains, with no mutations being found in the *katG* gene in any of the strains. Several studies have associated resistance to INH with geographic variations,<sup>10,30,31</sup> and have reported mutations in the *katG* gene in approximately 50-60% of resistant strains. Mutations in the *inhA* gene appear to be responsible for resistance in 21-34% of strains, and are generally associated with low-level INH resistance.<sup>32</sup> We did

not observe the same distribution of mutations, although the degree of resistance to INH followed the same pattern, as the mutation in the *inhA* gene corresponded to a low level of INH resistance.<sup>32</sup> In addition, several studies have shown that for certain strains, low-level INH resistance is correlated with co-acquisition of ETH resistance, suggesting that INH and ETH share a molecular target.<sup>33</sup> In our study, all the ETH-resistant strains also had low-level INH resistance. The frequency observed in our study may be due to the fact that 80.5% of the strains corresponded to new cases,<sup>2</sup> in whom monoresistance and probably the low levels of INH are more frequent, and that 21/33 of these strains were found in Cluster I. Finally, eight resistant strains did not show mutations in the *katG* and *inhA* genes, and 10-20% of INH-resistant strains lacked mutations in both genes. The search for additional genes led to the identification of the *kasA*, *oxyR-ahpC* and *furA* genes.<sup>30</sup> On the other hand, more than 96% of RMP-resistant strains showed a mutation in the 81 bp central region of the *rpoB* gene.<sup>32</sup> In our study, only eight strains were resistant to this drug, and six (75%) presented mutations in this region. A similar frequency has been reported in other studies with African strains.<sup>34</sup>

Typing of resistant strains showed that most of the strains (21/37) had the same RFLP pattern, suggesting a high level of recent transmission, although no relationship was established among the patients with identical strains. Identical strains in different patients usually represent a link in transmission; however, this transmission may be indirect through other undetermined patients at an undetermined time. This situation is frequent and has been reported in other studies.<sup>29,35</sup> On the other hand, it has been suggested that in a country with a high prevalence of TB, the relationship between cluster and the proportion of disease attributable to recent transmission is not clear, as there are few strains circulating in the country.<sup>35</sup> Other factors, such as strain virulence, the length of the study and the age of the patients, may strongly influence the results observed,<sup>35</sup> as may cultural and social conditions.<sup>26</sup>

Thirty patients presented low level resistance to INH. None of these patients presented clinical signs of resistance (persistence or scarce reduction in clinical signs and symptoms) during treatment. Thus, the DST results were available well into the treatment period or at the end of anti-tuberculosis therapy. In addition, no relapse was reported during a long follow-up period (14-30 months). This strongly suggests that standard therapy could be sufficient in patients with low-level INH resistance, and that the remaining drugs may be sufficient to eliminate most of the bacterial population during the first phase of treatment. A residual bacterial population would remain during the second phase that would be lower than that required to produce mutations to RMP, also taking



into account that INH maintains a certain power of therapeutic efficacy. Nonetheless, factors such as immunological status or radiological involvement should be taken into account to possibly explain why no relapses were observed. In the 30 patients with low-level INH resistance in this study, only one was HIV-positive.

This study may be limited by the fact that not all the patients diagnosed during the study period could be included in the study (five of 18 districts in the country were studied, 36.6% of the population), due to the lack of refrigerators or freezers to store the samples until transport to the TB clinics in the Bata and Malabo districts. It should also be taken into account that electricity to the clinics was occasionally cut off, thus resulting in thawing and refreezing of samples, with consequent alterations in mycobacterial viability (culture negative), overgrowth of oral flora and subsequent culture contamination. However, patients were not selected according to clinical or epidemiological data; the inclusion criteria were the possibility of obtaining samples, which was possible only in the Bata and Malabo populations.

In conclusion, we found a moderate rate of resistance in new cases of TB infection, with a predominance of low-level INH resistance associated with mutations in the *inhA* gene, and a high percentage of clustering of the resistant strains which responded to standard treatment with no increase in relapse.

#### Acknowledgements

We wish to thank all the patients and the staff of the TB Programme of Equatorial Guinea; the CIDOB Foundation, Barcelona, Spain, and the Microbiology Department of the Hospital Clínic of Barcelona for their collaboration in the study, and especially to Mrs Rosa Monté and Mrs Dolors Ricart.

This work was supported by the CIDOB Foundation, Barcelona, Spain, Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) grant 98/1282, and the Spanish International Cooperation Agency (AECI). Griselda Tudó was granted a fellowship from the Universitat de Barcelona, Divisió de Ciències de la Salut, Spain.

#### References

- 1 World Health Organization. Global Tuberculosis Control. WHO Report 2001. WHO/CDS/TB/2001. Geneva, Switzerland: WHO, 2001.
- 2 Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report n° 2. Prevalence and Trends. The WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. WHO/CDS/TB/2000.278. Geneva, Switzerland: WHO, 2000.
- 3 Programa Nacional de Lucha contra la Tuberculosis de Guinea Ecuatorial. Manual de Normas. Guinea Ecuatorial: Ministerio de Sanidad y Bienestar Social, 1999.
- 4 Kubica G P W, Dye E, Cohn M L, et al. Sputum digestion and decontamination with *N*-acetyl-L-cysteine-sodiumhydroxide for culture of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1963; 87: 775-779.
- 5 González J, Tudó G, Gómez J, García A, Navarro M, Jiménez de Anta M T. Use of microscopic morphology in smears prepared from radiometric cultures for presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium xenopi*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17: 493-500.
- 6 Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger E, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 175-178.
- 7 Sreevatsan S, Escalante P, Pan X, et al. Identification of a polymorphic nucleotide in *oxyR* specific for *Mycobacterium bovis*. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2007-2010.
- 8 Siddiqi S H, Libonati J P, Middlebrook G. Evaluation of a rapid radiometric method for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1981; 13: 908-913.
- 9 Wéry M, Wéry-Paskoff S, van Wettère P. The diagnosis of human African Trypanosomiasis (*Trypanosoma gambiense*) by the use of fluorescent technique to be used in mass surveys. *Ann Soc Belg Méd Trop* 1970; 50: 613-634.
- 10 Verdú E, March F, Cortés P, et al. Molecular mechanism of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* from Barcelona. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8 (Suppl 1): 94-95.
- 11 Espasa M, González J, Alcaide F, Lonca J, Manterola X M, Verdú E, Coll P. Use of real-time PCR for detection in clinical samples genetic polymorphisms causing resistance to isoniazid and rifampin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8 (Suppl 1): 15.
- 12 van Embden J D A, Cave M D, Crawford J T, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 406-409.
- 13 Liang L I, Zeger S. Longitudinal analysis using generalized linear models. *Biométrica* 1986; 45: 255-268.
- 14 Githui W A, Kawamanga D, Chakaya J M, Karini F G, Waiyaki P G. Anti-tuberculosis initial drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Kenya: a ten-year review. *E Afric Med J* 1993; 70: 609-612.
- 15 Demissie M, Gebeyehu M, Berhane Y. Primary resistance to anti-tuberculosis drugs in Addis Ababa, Ethiopia. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997; 1: 64-67.
- 16 Bretzel G, Aziz M, Wendl-Richter U, et al. Anti-tuberculosis drug resistance surveillance in Uganda 1996-1997. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3: 810-815.
- 17 Mac-Arthur A Jr, Glooyd S, Perdigo P, Noya A, Sacardal J, Kreiss J. Characteristics of drug resistance and HIV among tuberculosis patients in Mozambique. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5: 894-902.
- 18 Dosso M, Bonard D, Msellati P, et al. Primary resistance to anti-tuberculosis drugs. A national survey conducted in Côte d'Ivoire in 1995-1996. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 3: 805-809.
- 19 Garin B, Constanzo B, Kassa Kemlembho E, et al. Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in tuberculosis in patients in Bangui, Central African Republic. *AIDS* 1995; 9: 213-214.
- 20 Kuaban C, Bercion R, Neske J, Cunin P, Nkamsse P, Ngo Niobe S. Anti-tuberculosis drug resistance in the West Province of Cameroon. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4: 356-360.
- 21 Bercion R, Kuaban C. Initial resistance to anti-tuberculosis drugs in Yaounde, Cameroon in 1995. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997; 1: 110-114.
- 22 van der Werf T S, Groothuis D G, van Klingeren B. High initial resistance in pulmonary tuberculosis in Ghana. *Tubercle* 1989; 70: 249-255.
- 23 Bruchfeld J, Aderaye G, Berggren P I, et al. Molecular epidemiology and drugs resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Ethiopian pulmonary tuberculosis patients with and without human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1636-1643.
- 24 Idigbe E O, Duque J P, John E K O, Annam O. Resistance to anti-tuberculosis drugs in treated patients in Lagos, Nigeria. *J Trop Med Hyg* 1992; 95: 186-191.

- 25 Kuaban C, Bercion R, Jifon G, Cunin P, Ngu Blackett K. Acquired anti-tuberculosis drug resistance in Yaounde, Cameroon. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4: 427-432.
- 26 Githui W A, Hawken M P, Juma E S, et al. Surveillance of drug-resistant tuberculosis and molecular evaluation of transmission of resistant strains in refugee and non-refugee populations in North-Eastern Kenya. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4: 947-955.
- 27 Lockman S, Sheppard J D, Braden C R, et al. Molecular and conventional epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Botswana: a population-based prospective study of 301 pulmonary tuberculosis patients. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1042-1047.
- 28 Lawn S D, Frimpong E H, Al-Gusein H, et al. Pulmonary tuberculosis in Kumasi, Ghana: presentation, drug resistance, molecular epidemiology and outcome of treatment. *West Afr J Med* 2001; 20: 92-97.
- 29 Wilkinson D, Pillay M, Davies G R, Sturm A W. Resistance to anti-tuberculosis drugs in rural South Africa: rates, patterns, risks, and transmission dynamics. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90: 692-695.
- 30 Ramaswamy S, Musser J M. Molecular genetic basis of anti-microbial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuberc Lung Dis* 1998; 79: 3-29.
- 31 Haas W H, Schilke K, Brand J, et al. Molecular analysis of *katG* gene mutations in strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1601-1603.
- 32 Telenti A. Genetics of drug resistant tuberculosis. *Thorax* 1998; 53: 793-797.
- 33 Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, et al. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1994; 263: 227-230.
- 34 Schilke K, Weyer K, Bretzel G, et al. Universal pattern of *rpoB* gene mutations among multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3: 620-626.
- 35 van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med* 2001; 249: 1-26.

## RÉSUMÉ

**CONTEXTE:** Cinq districts en Guinée Equatoriale entre mars 1999 et février 2001.

**OBJECTIFS:** Déterminer la résistance aux médicaments antituberculeux dans des cas neufs ou traités précédemment, les facteurs de risque associés à la résistance et la fréquence des mutations principales associées à la résistance à l'isoniazide et à la rifampicine (gènes *katG*, *inhA* et *rpoB*), et génotyper les souches résistantes.

**RÉSULTATS:** On a obtenu une culture positive, identifiée comme complexe *Mycobacterium tuberculosis*, chez 240 sur 499 patients. Le test de sensibilité a été pratiqué sur 236 souches. Le taux global de résistance dans les nouveaux cas a été de 16,9% et dans les cas de retraitement de 41,6%. La résistance à l'isoniazide a été la plus fréquente (respectivement 12,5% et 16,6% dans les deux groupes). On a observé une multirésistance dans 1,7%

des cas neufs et dans 25% des cas de retraitement. Dans les nouveaux cas, il y a une association entre le sexe féminin et la résistance. Sur 41 souches résistantes à l'isoniazide, 33 (80,5%) avaient des mutations du gène *inhA*. Il n'y avait aucun cas de mutation du gène *katG* et huit n'avaient aucune mutation dans les deux gènes. Dans toutes les souches, le niveau de résistance à l'isoniazide était faible. Huit souches étaient résistantes à la rifampicine dont six avaient des mutations du gène *rpoB*. Le génotypage a défini sept grappes.

**CONCLUSIONS:** On a trouvé un taux modéré de résistance dans les nouveaux cas de tuberculose. Les mutations du gène *inhA* étaient prédominantes dans les faibles niveaux de résistance à l'isoniazide, avec un pourcentage élevé de regroupement en grappes.

## RESUMEN

**CONTEXTO:** Cinco distritos en Guinea Ecuatorial, marzo 1999 a febrero 2001.

**OBJETIVO:** Determinar la resistencia a los fármacos antituberculosos entre casos nuevos y previamente tratados, los factores de riesgo asociados con la resistencia, las mutaciones asociadas con resistencia a isoniácida y rifampicina (genes *katG*, *inhA* y *rpoB*). Genotipado de las cepas resistentes.

**RESULTADOS:** Se obtuvo cultivo positivo para *Mycobacterium tuberculosis* complex en 240/499 pacientes estudiados. El antibiograma se realizó en 236 cepas. La tasa global de resistencia fue del 16.9% y 41.6% entre casos nuevos y previamente tratados, respectivamente. La resistencia a la isoniácida fue la más frecuente en ambos grupos (12.5% y 16.6%, respectivamente). Se observó

multiresistencia en el 1.7% y 25% de los casos nuevos y previamente tratados. El sexo femenino se asoció estadísticamente a la resistencia en casos nuevos. El 80.5% de las cepas isoniácida resistentes tenían mutaciones en el gen *inhA*. Ninguna en el gen *katG*. Ocho no tenían mutaciones en ninguno de los dos genes. Todas las cepas presentaban resistencia a la isoniácida de bajo nivel. Ocho cepas fueron resistentes a la rifampicina: seis con mutaciones en el gen *rpoB*. El genotipado definió siete agrupaciones.

**CONCLUSIONES:** Se encontró una resistencia moderada en los casos nuevos. Predominio de resistencia de bajo nivel a la isoniácida asociada a mutaciones en el gen *inhA* con alto porcentaje de cepas agrupadas.



### III

#### MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF *Mycobacterium tuberculosis* IN THE BATA AND MALABO DISTRICTS IN EQUATORIAL GUINEA

*Acceptat a The International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases*

G. Tudó, J. González, R. Obama, JM. Rodríguez, JR. Franco, M. Espasa, P. Simarro, G. Escaramís, C. Ascaso, A. García, MT. Jiménez de Anta.

---

Estudi de la transmissió de la tuberculosi a les ciutats de Bata i Malabo, a Guinea Equatorial, durant el període de març del 1999 fins febrer del 2000. L'objectiu va ser estudiar l'epidemiologia molecular i convencional i els factors de risc associats a la transmissió recent de la TB.

Durant el període d'estudi, 429 malalts van ser diagnosticats amb TB als districtes de Bata i Malabo. El 48% (206 soques) va tenir cultiu positiu. La tipificació de les soques per RFLP va ser possible en 185 (89.9%) dels cultius positius per *M. tuberculosis*, i es van identificar 92 patrons diferents. El 38.3% (71 soques) van presentar patrons únics i les 114 (61.6%) restants van determinar 21 agrupacions diferents, de 2 a 25 malalts. A més, 37 de

les soques tipificades van ser resistents a un o més fàrmacs. El 81% (30 soques) estaven en alguna de les agrupacions identificades. Vint-i-una d'aquestes soques van ser resistents a la INH de baix nivell ( $CMI \leq 1 \mu\text{m/ml}$ ), i formaven part de l'agrupació més gran. L'anàlisi estadístic va determinar que la resistència als fàrmacs antituberculosos ( $OR=3.1$ ;  $95\%CI$  1.2-7.6;  $P = 0.014$ ), i una bacil·loscòpia positiva de grau 4 ( $OR=4.3$ ;  $95\%CI$  1.4-12;  $P = 0.005$ ), eren els factors significativament més freqüents entre els malalts amb soques agrupades.

El nivell d'agrupació (61.6%) observat suggereix un elevat grau de transmissió recent i un predomini de determinats patrons.

---

**TITLE:** Molecular epidemiology of tuberculosis in the Bata and Malabo districts of Equatorial Guinea

**RUNNING TITLE:** Molecular epidemiology of tuberculosis in Equatorial Guinea

**AUTHORS:** Griselda Tudó<sup>1</sup>, Julián González<sup>1</sup>, Ricardo Obama<sup>2</sup>, Juan Manuel Rodríguez<sup>3</sup>, José Ramón Franco<sup>3</sup>, Mateu Espasa<sup>1</sup>, Pere P. Simarro<sup>3</sup>, Geòrgia Escaramís<sup>4</sup>, Carlos Ascaso<sup>4</sup>, Albert García<sup>1</sup>, and Maria Teresa Jiménez de Anta<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Servei de Microbiologia, Centre de Diagnòstic i Biomedicina (CDB). Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clínic, Universitat de Barcelona. Spain.

<sup>2</sup>Programa de Lucha contra la Tuberculosis de Guinea Ecuatorial (PNLT).

<sup>3</sup>Fundació CIDOB, Guinea Ecuatorial.

<sup>4</sup>Departament de Salut Pública. IDIBAPS. Universitat de Barcelona. Spain.

Correspondence to: Dr. Julián González-Martín, Servei de Microbiologia, Hospital Clínic. Villarroel 170, E-08036 Barcelona, Spain. Phone: (+34) 932 275 522; Fax: (+34) 932 275 454; e-mail: jgm@medicina.ub.es.

**KEY WORDS:** Tuberculosis, molecular epidemiology, transmission, Africa.

## ABSTRACT

**SETTING:** Bata and Malabo districts in Equatorial Guinea, from March 1, 1999 to February 28, 2001.

**OBJECTIVE:** To study the molecular epidemiology of tuberculosis.

**RESULTS:** During the study period, 429 patients were diagnosed with tuberculosis in the Bata and Malabo districts. A culture positive was obtained in 206 (48 %) TB patients, with RFLP analysis being performed in 185 (89.8 %). Ninety-two different patterns were identified. Single patterns were found in 71 strains (38.3 %) and the remaining 114 strains (61.6 %) were classified into 21 clusters (from 2 to 25 patients). In addition, 37 of the typing strains were resistant to one or more anti-tuberculosis drugs, and thirty were included in clusters (81 %), with 21 low level isoniazid (MIC  $\leq 1\mu\text{g/ml}$ ) resistance strains being in the same cluster. Statistical analysis showed that resistance to anti-tuberculosis drugs (OR=3.1; 95%CI 1.2-7.6;  $P = 0.014$ ), and positive smear results (4+ grade smear)(OR=4.3; 95%CI 1.5-12;  $P = 0.005$ ), were significantly more frequent factors among patients with clustered strains. No epidemiological links were related to clustering.

**CONCLUSIONS:** The level of clustering (61.6 %) observed suggests a high degree of recent transmission and the predominance of determined patterns of *M. tuberculosis* strains among the EG population.

## INTRODUCTION

Every day more than 23,000 people around the world develop active tuberculosis (TB) and close to 5,000 die from this disease <sup>1</sup>. If the present trend continues 10.2 million new cases may be expected in 2005, with more cases being observed in Africa than in any other region of the World <sup>2</sup>.

In the last decade, the introduction of molecular methods capable of genetically characterizing each isolate of *Mycobacterium tuberculosis* has led to a great advance in studies on TB transmission. Molecular typing methods have been applied to study transmission within

and between communities and to identify the risk factors associated with acquisition of infection and development of the disease <sup>3-11</sup>, to investigate unsuspected cases of nosocomial transmission <sup>12</sup>, to facilitate tracking of the spread of both drug-sensitive and drug-resistant strains in health care and other institutions <sup>13</sup>, and finally, to study TB recurrence and the role of reinfection <sup>14</sup>.

Equatorial Guinea (EG) is in the Gulf of Guinea, West Africa. The country is made up of a continental (26017km<sup>2</sup>) and an insular zone (2035 km<sup>2</sup>), Bioko and Annobon islands. The country has 442,000 inhabitants <sup>15</sup>, with Bata and Malabo being the two most highly populated districts. The National Tuberculosis Control Programme (NTCP) <sup>16</sup> of EG was established in 1986 by the Ministry of Health of this country. The NTCP covers 89 % of the territory and provides health care coverage to 96.3 % of the overall population. In 2000 the number of new cases of TB was estimated at 141/100,000 inhab., with the incidence of smear-positive cases being 113/100,000 inhab. Treatment was initiated in 98.2 % of the cases (TB Programme 2000 report, unpublished data).

The aim of this study was to determine the molecular epidemiology of TB and to identify the risk factors associated with clustering in the Bata and Malabo districts over a two-year period.

## **STUDY POPULATION AND METHODS**

*Study setting.* The study period was over 24 consecutive months from March 1, 1999 to February 28, 2001. The patients studied were collected in the Bata (continental zone), and Malabo districts (Bioko island). In both districts the largest proportion of the populations are concentrated in the main cities, Bata and Malabo. The lay out of these cities is similar being made up of an Old Quarter (with good infrastructure), small residential neighbourhoods surrounded by areas of high density population and others which are also of high density population but more disperse. In all these areas the requisites of infrastructure, such as potable water and electricity, are scarce and non-regular, and living conditions are crowded. Two main



ethnic groups may be found in EG, the Fang and the Bubi, the latter living mainly in the southern part.

*Study population and samples. Inclusion criteria:* The study included patients diagnosed with TB within the geographic area defined in the study during the established study period for which samples for culture and RFLP processing were available. *TB diagnosis:* The criteria used were those described by the NTCP of EG <sup>16</sup>. Briefly, TB diagnosis was established in patients with: (a) smear-positive and clinical symptoms of TB, (b) smear-negative and clinical symptoms of TB who received anti-tuberculosis treatment after ruling out other diseases and responded to treatment.

*Sample collection.* Following the NTCP guidelines <sup>16</sup>, two samples were obtained from each patient for diagnostic purposes: one on the first consultation, and the other, the following day. Smear microscopy examination was performed in each sample in the Bata and Malabo laboratories. One of the two samples was frozen and every four months sent to the Laboratory of Microbiology in the Hospital Clínic (Barcelona, Spain), for the remaining studies.

*Patient data.* A questionnaire designed for the data collection of each patient studied included: (i) demographic data: sex, age, country of origin, district of residence, residence in another country in the last five years, and city area in which the patient resided. To study the last factor the two cities were divided into three sectors of different density distribution: Sector 1 – with moderate crowding; Sector 2 – with overcrowding, and Sector 3 – with disperse crowding (defined as small groups over a larger area) <sup>15</sup>, (ii) clinical data: HIV status, alcohol consumption (subjective evaluation of interviewer), tuberculin skin test (read by the TB-district supervisor following the NTCP<sup>3</sup> criteria), history of familial TB, previous TB, previous chemoprophylaxis (following the NTCP<sup>3</sup> criteria), clinical form of TB, (iii) microbiological data: results of culture and smear, species identification and drug sensitivity test were studied.

*Mycobacterial strains and drug susceptibility method.* Frozen sputum samples were processed using the standard method on arrival to the laboratory <sup>17</sup>. Identification was made using morphological features in radiometric 12B medium <sup>18</sup> and commercial probes (AccuProbe

system; Gen-Probe, San Diego, Calif.), and polymorphic restriction analysis (PRA)<sup>19</sup> in strains for which no commercial probes are available. First-line anti-tuberculosis drugs susceptibility testing was performed by the radiometric method according to the BACTEC system<sup>20</sup>, at the following concentrations 0.1, 0.2, 0.4, 1, 5 and 10 µg/ml for isoniazid (INH), 2 µg/ml for rifampicin (RIF), 7.5 µg/ml for ethambutol, 6 µg/ml for streptomycin (SM) and 100 µg/ml for pyrazinamide.

*HIV testing.* HIV status was studied in the smear-positive TB patients. With a rapid test, Determine™ HIV-1/2 test (Abbott, USA), used in EG. The positive results were confirmed using the INNO-LIA™ HIV confirmation kit (Innogenetics, Belgium) in the Hospital Clínic, Barcelona, Spain.

*Molecular analysis.* IS6110-RFLP patterns were determined according to the standard procedure described elsewhere<sup>22</sup>. *Analysis of RFLP pattern.* Fingerprinting patterns were analysed by means of visual examination by two authors. Subsequently, the patterns were compared with computer-assisted analysis Lane Manager 2.1a (TDI, Spain). A cluster was defined as  $\geq 2$  strains with identical numbers of copies and locations of IS6110.

*Epidemiological investigation.* To determine the epidemiological links (i.e. two or more clustered patients) the relationship between the patients who constituted a cluster was established using the questionnaire on demographic data for each case as well as the registry and TB Control Programme database of EG in search, especially, of familial and neighbourhood relationships.

*Statistical analysis.* The characteristics of patients (demographic, clinical, and microbiologic) with cluster strains and those with non-cluster strains were compared. Bivariate analysis was performed with the chi-square test and the Fisher exact test. Multivariate analysis was done with logistic regression. *P* values of 0.05 or less were regarded as significant. Statistical analysis was performed with the SPSS 10.0 statistical packet.

## RESULTS

*Patient characteristics.* From March 1999 to February 2000, a total of 429 patients were studied, 57.1% being smear positive. Of these 429 cases, 234 (54.5%) were males. The mean age of the patients was 33.3 years. Coinfection with HIV was observed in 12.5% of the patients in 1999 and 13.6% in 2000. Approximately, 50% of the patients were from Bata. Most of the patients were born in EG.

*Strains.* Out of 429 samples collected over 24 months of study, 206 (48%) were culture positive (81.5% smear positive). One hundred forty samples (32.6%) and eighty-three (19.3%) were culture negative and contaminated, respectively. Sixty-seven samples were culture negative and smear positive and 43 samples were culture positive and smear negative. Two hundred four strains were identified as *Mycobacterium tuberculosis* complex. The remaining two strains were identified as non-tuberculosis mycobacteria (*M. fortuitum* complex and *M. goodii*).

*Drug susceptibility.* Forty-three strains were resistant to one or more anti-tuberculosis drug. Thirty strains were INH monoresistant, and two strains were monoresistant SM. Eight strains were multidrug resistant (resistance to at least INH and RIF)<sup>21</sup>, and three were resistant to INH and SM.

*Degree of clustering.* RFLP analysis was performed in 185 (89.8%) of the 206 positive pulmonary TB cultures with 92 different patterns. Single patterns were found in 71 strains (38.3%) and the remaining 114 strains (61.6%) were classified into 21 clusters (table 1). The number of IS6110 copies per strain ranged from 6 to 15. The number of patients within a cluster varied from 2 (nine clusters) to 25 (one cluster) patients, and 65.8% of clustered cases were in big clusters of > 5 patients. Molecular typing was available for 37 (86%) of the 43 resistant strains. Different patterns were found in seven strains (18.9%) and the remaining 30 strains (81%) were classified into one of the 21 clusters (table 1). One cluster (I) included 21 low level INH resistant strains and three sensitive strains.

*Risk factors associated with clustering.* Univariate and multivariate analysis showed that resistance to anti-tuberculosis drugs ( $P = 0.005$ ), and a high smear positive result (4+ grade smear) <sup>17</sup> ( $P = 0.014$ ) were significantly more frequent factors among patients with clustered strains. The results of HIV testing were available in 147/185 (79.4%) patients with no significant difference being observed ( $P = 0.316$ ). Neither were significant differences found when considering the other factors studied.

*Epidemiological investigation.* The strains in clusters were isolated over the 24 months of the study. The geographical distribution of the clustered strains was random, within and between the two districts studied. No relationship was reported on familial or neighbour to neighbour transmission.

## DISCUSSION

In this study we describe the molecular epidemiology of TB and the risk factors associated with clustering in the Bata and Malabo districts of EG. This is the first study of these characteristics to be undertaken in this country. Our findings show a high level of clustering, with one large cluster including most of the resistant strains. Moreover, a significant association was found between drug resistant and smear positive (4+) variables and clustering.

The proportion of patients with clustered strains was 62.1%. Other African studies have shown lower rates such as 33.5% in Dar es Salaam, Tanzania <sup>5</sup>, 42% in four communities of Botswana <sup>6</sup> and in Addis Ababa, Ethiopia <sup>7</sup>, 45% in the Hlabisa district, South Africa <sup>11</sup>, and a similar percentage of 67% among gold miners in South Africa <sup>10</sup>. In general, it is assumed that the proportion of clustered isolates in a population reflects the amount of recent transmission of TB <sup>23</sup>. However, the inference of the proportion of disease due to recent transmission directly derived from a clustered proportion is complicated and several studies have questioned this hypothesis <sup>6,10,11,23</sup>. Similar patterns in different patients normally represent a common point of transmission, which, however, may not necessarily be direct and may, in fact, be produced by other, unidentified patients, at a determined time <sup>24</sup>. In areas of high TB prevalence, such as



Africa and Asia, there may be strains of *M. tuberculosis* which are more predominant among the population (in our study, isolates from clusters I, II and VI), and which remain so over a long period of time<sup>5,8-10</sup>. Therefore, the clusters produced by these strains may not reflect recent transmission. Moreover, it has been suggested that the relationship between clustering and the proportion of disease attributable to recent transmission depends on different factors such as the ages of the TB cases, geographical study area, and duration of the study<sup>24</sup>, as well as the number of patients studied and the virulence and the transmissibility of the strains<sup>23</sup>.

Contact investigation in several African settings has only been able to demonstrate epidemiological links in 15-25% of cases with identical patterns<sup>6,10,11</sup>. In our study, no familial or community relationship was found among patients with identical patterns. Moreover, no statistically significant association was observed on evaluating clustering when the study was divided into two 12-month periods ( $P = 0.390$ ), thereby discarding a possible epidemic outbreak. The probability of becoming infected after contact with a contagious patient decreases in proportion to the distance from the patient. However, the total number of persons which a patient may infect, despite the lack of close contact, is considerable and may be higher than the number of persons in close contact with the patient<sup>25</sup>. In a very mobile population such as that of EG, casual contacts may be proportionally more frequent than close contacts which may explain why epidemiological links have not been demonstrated. This may be confirmed by the fact that strains with the same molecular patterns have been detected in the two cities studied (one continental and another insular). Other studies suggest that in a community with a high incidence of TB and where people live in conditions of poverty, such as in African countries, the difficulty of tracing the transmission of TB is illustrated by the complexity of the household structures<sup>26</sup>. In these countries, perhaps other factors, such as social habits and cultural customs, which may influence decisively in the dynamics of transmission, should be taken into account.

Multivariate analysis associated resistance and smear positive results with clustering. Most of the resistant strains (32/43) were resistant at low INH levels (Minimal Inhibitory

Concentration  $\leq 1$   $\mu\text{g/ml}$ ). In a previous study we found that resistance was exclusively associated with mutations in the ribosome binding site region of the *inhA* gene<sup>27</sup>. Moreover, most of the resistant strains (21) were part of the largest cluster suggesting that these strains did not present any alterations in their fitness, which could affect their capacity of transmission<sup>28</sup>. Other studies have also reported a relationship between resistance and clustering<sup>3,7,13</sup>. On the other hand, in this study 87.7% of the cluster patients were smear positive, 73.5% of them being smear positive (4+ grade smear), and were isolated in the first study period suggesting that these patients may be the index cases of the clusters<sup>29</sup>. Finally, contrary to what was expected, no significant association was found between clustering and the density of the population of the area in which the patient resided ( $P = 0.529$ ).

Possible limitations of this study may be: (i) only two of the 18 districts of EG was studied because of the lack of refrigerators or freezers to maintain the samples until transport to the TB clinics in the Bata and Malabo districts. It should also be taken into account that electricity to the clinics was occasionally cut off thus resulting in the thawing and refreezing of samples with the possible alteration in mycobacteria viability (culture negative), and overgrowth of oral flora and subsequent culture contamination. Consequently, the recent transmission may have been under- or over evaluated; and (ii) logistical problems made it difficult to carry out a conventional contact study in the search for possible links among the patients with clustered strains.

In conclusion, the level of clustering (61.6%) observed suggests a high degree of recent transmission and the predominance of determined patterns of *M. tuberculosis* strains among the EG population.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank all the patients and the staff the TB Programme of Equatorial Guinea; the CIDOB Foundation, Barcelona, Spain, and the Microbiology Department of the Hospital Clínic of Barcelona for their collaboration in the study, especially to Mrs R. Monté and to Mrs. D. Ricart.

This work was supported by the CIDOB Foundation, Barcelona, Spain, the Spanish International Cooperation Agency (AECI), and Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) grant PI020348 from the Ministerio de Salud, Madrid, Spain. Griselda Tudó was granted a fellowship from the Divisió de Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona, Spain.

## REFERENCES

1. World Health Organization. *Stop TB*. Annual report 2001. Geneva, Switzerland, WHO/CDS/STB/2002.17.
2. World Health Organization. *Global Tuberculosis Control*. WHO Report 2001. Geneva, Switzerland, WHO/CDS/TB/2001.
3. Alland D, Kalkut G, Moss A, et al. Transmission of tuberculosis in New York city. *N Engl J Med* 1994;330:1710-1716.
4. Small P, Hopewell P, Singh S, et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco: a population based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med* 1994;330:1703-1709.
5. Yang ZH, Mtoni I, Chonde M, et al. DNA fingerprinting and phenotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and HIV-seronegative patients in Tanzania. *J Clin Microbiol* 1995;33(5):1064-1069.
6. Lockman S, Sheppard JD, Braden CR, et al. Molecular and conventional epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Botswana: a population-based prospective study of 301 pulmonary tuberculosis patients. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(3):1042-1047.
7. Bruchfeld J, Aderaye G, Berggren Palme I, Bjorvant B, Ghebremichael S, Hoffner S, Lindquist L. Molecular epidemiology and drugs resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Ethiopian pulmonary tuberculosis patients with and without human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol*.2002;40(5):1636-1643.
8. Hermans PW, Messadi F, Guebrexabher H, et al. Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia, and The Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. *J Infect Dis* 1995; 171:1504-11513.
9. van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. *J Clin Microbiol* 1995; 33:3234-3238.



10. Godfrey-Faussett P, Sonnenberg P, Shearer SC, Bruce MC, Mee C, Morris L, Murray J. Tuberculosis control and molecular epidemiology in South African gold mining community. *Lancet* 2000; 356:1066-1071.
11. Wilkinson D, Pillay M, Crump J, Lombard C, Davies GR, Sturm AW. Molecular epidemiology and transmission dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in rural Africa. *Trop Med Int Health* 1997; 2(8):747-753.
12. Tudó G, González J, Gatell JM, et al. Detection of unsuspected cases of nosocomial transmission of tuberculosis by use of a molecular typing method. *Clin Infect Dis* 2001; 33:453-459.
13. Frieden TR, Sherman LF, Maw KL, et al. A multi-institutional outbreak of highly drug-resistant tuberculosis. *JAMA* 1996; 276:1229-1235.
14. García de Viedma D, Marín M, Hernáñez S, et al. Tuberculosis recurrences: reinfection plays a role in a population whose clinical/epidemiological characteristics do not favour reinfection. *Arc Int Med* 2002; 162:1873-1979.
15. Atlas de la Guinée Équatoriale. Les Atlas de l'afrique. (Ed) Les éditions J.A.
16. Programa Nacional de Lucha contra la Tuberculosis de Guinea Ecuatorial. *Manual de Normas*. Ministerio de Sanidad y Bienestar Social. Guinea Ecuatorial. 1999.
17. Metchock BG, Nolte FS, Wallace RJ, Jr. *Mycobacterium*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Eds. *Manual of clinical microbiology*, 7<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington DC 1999: pp399-437.
18. González J, Tudó G, Gómez J, García A, Navarro M, Jiménez de Anta MT. Use of microscopic morphology in smears prepared from radiometric cultures for presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium xenopi*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17:493-500.

19. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger E, Bodmer T. Rapid identification of Mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993; 31(2):175-178.
20. Sidiqqi SH, Libonati JP, Middlebrook G. Evaluation of a rapid radiometric method for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1981; 13:908-913.
21. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report n° 2. Prevalence and Trends. The WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. Geneva, Switzerland, WHO/CDS/TB/2000.278.
22. van Embden DJA, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31:406-409.
23. van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacteria infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med* 2001; 249:1-26.
24. Glynn JR, Bauer J, de Boer AS, Borgdorff MW, Fine PEM, Godfrey-Fausset P, Vynnycky E. Interpreting DNA fingerprinting clusters of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3(12):1055-1060.
25. Veen J. Microepidemics of tuberculosis: the stone-in-the-pond principle. *Tubercle Lung Dis* 1992; 73:73-76.
26. Classen CN, Warren R, Richardson M, et al. Impact of social interactions in the community on the transmission of tuberculosis in a high incidence area. *Thorax* 1999; 54:136-140.
27. Tudó G, González J, Obama R, et al. Study of the anti-tuberculosis drugs in five districts of Equatorial Guinea: rates, risk factors, genotyping of gene mutations and molecular epidemiology. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8:1-8.
28. Cohen T, Sommers B, Murray M. The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet Infect Dis* 2003; 3(1):13-21.

29. Solsona J, Caylà JA, Verdú E, et al. Molecular and conventional epidemiology of tuberculosis in an inner city district. *Int J Tuber Lung Dis* 2001; 5(8):724-731.

Table 1. General characteristics of clusters

Characteristics	Clusters																					
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX	XXI	
<b>N° strains</b>	25	15	8	2	6	15	6	4	3	2	2	2	3	4	3	2	2	2	2	2	4	2
<b>Sex M/F</b>	14/11	10/5	4/4	0/2	2/4	3/12	3/3	3/1	3/0	2/0	2/0	2/0	0/3	2/2	1/2	1/1	1/1	0/2	0/2	0/2	4/0	2/0
<b>Smear +/-</b>	22/3	15/0	6/2	1/1	6/0	4/11	6/0	4/0	3/0	2/0	2/0	2/0	2/1	4/0	2/1	2/0	2/0	2/0	0/2	0/2	4/0	2/0
<b>HIV +/-*</b>	1/15	0/10	1/7	0/2	1/4	2/9	0/3	2/1	0/3	0/2	0/2	1/0	0/3	0/1	1/2	1/1	1/1	0/2	1/1	1/1	1/2	0/1
<b>Resist/Sensitive</b>	21/3 *	0/15	0/8	2/0	2/4	0/15	0/6	0/4	0/3	0/2	0/2	0/1*	0/3	0/4	0/3	0/2	2/0	1/1	1/1	1/1	0/4	1/1
<b>Type of resistance</b>	A	-	-	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B	A	B	B	-	C

M: Male. F: Female. \* Values unknown in some patients. \* One strain could not be tested.  
A: INH resistant ≤ 1µg/ml. B: MDR. C: SM resistant.



- Accept -

To: griselda@medicina.ub.es  
From: akritski@hucff.ufrj.br  
Date: Mar 28, 2004  
CC: akritski@hucff.ufrj.br  
Subject: IJTLD-06-03-0178.R2

Dear Mrs. GRISELDA TUDÓ:

Thank you for sending us the revised version of your article entitled

"Molecular epidemiology of tuberculosis in the Bata and Malabo districts of Equatorial Guinea" (Original Article)

and your reply to the reviewers' comments.

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in one of the forthcoming issues of The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease subject to the usual editorial revisions.

Please send any Figures by e-mail attachment to the Editorial Office (journal@iutald.org) in PDF, Powerpoint or Excel format, along with details of your full correspondence address.

If your tables were uploaded as images, or the full article was initially uploaded in PDF format, please also send these by e-mail attachment in Word format. Any Figure legends should also be in the Word document.


Finally, please ensure that you have faxed in the signed copyright form.

With kind regards,

Sincerely,

Dr. Afranio Kritski

Close Window



La tisi secundària a les úlceres pulmonars, es reconeix per la febre continua, més important durant la nit, doncs durant el dia pot estar emmascarada o ser intermitent i s'acompanya de malestar general, debilitat i aprimament. Conforma progressa, el pols es fa cada vegada més petit i dèbil, la pell perd el color i el son és irregular. Els espunts adopten múltiples aspectes: lívids, ennegrits, blancs, groguencs, verds, blanc-verdós, arrodonits, gelatinosos, consistents, líquids, fètids o inodors, però sempre purulents...

Areteu de Capadócia, segle I d. J.C

DISCUSSIÓ

Tenint en compte l'objectiu general d'aquest treball doctoral i donat que els resultats obtinguts dels tres objectius concrets ja han estat comentats en cadascun dels articles derivats, la discussió global d'aquests s'ha dividit en diferents temes considerats com els més remarcables i que permeten interrelacionar els tres treballs publicats.

---

## I. TRANSMISSIÓ RECENT I REACTIVACIÓ D'UNA INFECCIÓ PRÈVIA

La idea clàssica que es tenia de la transmissió de la TB en la comunitat ha variat força arrel de l'aplicació de l'epidemiologia molecular pel seu estudi. En general, aquests treballs han evidenciat, entre altres aspectes, que el grau de transmissió recent de la TB és molt més important del què es pensava, –al voltant d'un 10%–, independentment de la prevalença i incidència de la població estudiada (Capítol 2, taula 2.11).

En l'epidemiologia molecular s'assumeix que la proporció de soques agrupades d'una població és un reflexa del grau de transmissió recent de TB dins la mateixa població. Tot i això, inferir quina proporció de casos deguts a transmissió recent deriva directament de la proporció de soques agrupades és difícil de saber i, darrerament, s'ha qüestionat molt aquest fet (Wilkinson i cols.,1997, Godfrey-Faussett i cols.,2000, Lockman i cols.,2001). Sembla clar, que patrons iguals en diferents malalts normalment representen un punt comú de transmissió, malgrat que no necessàriament aquest ha de ser directe, tot el contrari, pot ser indirectament per un altre malalt, no identificat, en un moment indeterminat en el passat (van Soolingen i cols.,1999). Aquest raonament podria explicar les agrupacions petites constituïdes per dos o tres malalts i on l'ECC no detecta cap tipus de lligam. A més, no s'ha d'oblidar que l'epidemiologia molecular té, des del seu inici, un cert biaix donat que només considera els casos amb cultiu positiu i exclou les TB clíniques sense diagnòstic microbiològic.

En l'anàlisi de la dinàmica de transmissió d'una població, la distribució de les soques tipificades en les diverses agrupacions, –el nombre de soques que les conformen–, i el grau de similitud entre elles, –més o menys polimòrfiques–, són variables que cal considerar i que poden orientar sobre la manera d'interpretar el grau de transmissió recent determinat. És lògic pensar que no és el mateix trobar moltes agrupacions petites de dues, tres o quatre soques que trobar poques agrupacions però amb un nombre elevat de soques. Probablement, en el primer cas, els casos s'haurien d'interpretar com a reactivacions d'infeccions latents mentre que la situació contrària indicaria la presència prevalent de determinades soques amb una elevada

capacitat d'infectar i desenvolupar TB, com el cas del genotipus Beijing (Small i cols.,1994, Alland i cols.,1994, Bauer i cols.,1998, Bhanu i col.,2002, Sharma i cols.,2003). Paral·lelament, soques genèticament molt diferents indicarien reactivació d'infecció latent mentre que empremtes molt similars, constituint grans famílies, podrien representar transmissió recent (Small i col.,1994, Alland i col.,1994, Hermans i cols.,1995, van Soolingen i cols.,1999). A més, la presència de grans agrupacions amb un nombre important de soques respecte les més petites hauria de ser interpretat amb criteris diferents segons la correlació existent amb l'ECC (Pena i cols.,2003). Així doncs, en zones d'elevada prevalença i incidència de la malaltia, hi podria haver soques de *Mycobacterium tuberculosis* més predominats que altres entre la població, –ni més infectives ni més virulentes–, capaces de romandre circulant durant un llarg període de temps esdevenint el que es podria definir com *soques endèmiques* característiques d'una zona en concret (Godfrey-Fausset i Stoker,1992, Zhang i cols.,1995, Hermans i cols., 1995, van Soolingen i cols.,1995, Godfrey-Fausset i cols.,2000, Warren i cols.,2002, Dillaha i cols.,2002). En aquestes circumstàncies, les agrupacions produïdes per aquestes soques no reflectirien, necessàriament, transmissió recent.

Un altre aspecte a considerar és que quan l'epidemiologia molecular s'aplica a l'estudi de poblacions cal tenir en compte que aquests no reflecteixen la dinàmica de transmissió de la població com si es tractés d'una comunitat perfectament tancada. La població és oberta i és el propi disseny de l'estudi el que la delimita. Aquest fet fa que en l'avaluació de les dades es puguin subestimar o sobreestimar els valors reals de la transmissió recent. El moviment propi que té una població fa que la transmissió recent a partir d'un cas índex aliè a aquesta s'interpreti com una reactivació de la malaltia, conseqüentment, el valor de la transmissió recent s'estarà subestimant. En contraposició, si en una agrupació s'inclou com un cas índex el que és una reactivació d'una infecció latent es produirà una sobreestimació de la incidència de la transmissió recent. Relacionat amb aquest fet, és important tenir present la influència que una sèrie de factors poden tenir sobre la proporció de transmissió recent determinada. Les variables més importants a considerar són:

- a) la taxa de prevalença i incidència de la infecció tuberculosa del lloc on es desenvolupa l'estudi,
- b) el nombre de malalts estudiats i la incidència de malalts amb bacil·loscòpia positiva,
- c) el període d'estudi. Aquesta variable és molt important, doncs com més llarg sigui més possibilitat hi ha per establir agrupacions. En la literatura es recomana que aquest sigui de com a mínim dos anys (van Soolingen i cols.,1999),
- d) l'àrea geogràfica de l'estudi,



- e) l'edat dels malalts estudiats, i
- f) la virulència i el potencial de transmissibilitat de les soques.

Arrel d'aquestes observacions alguns autors, emprant models matemàtics, han mesurat l'efecte d'algunes de les variables prèviament citades sobre la relació agrupació i proporció de malaltia atribuïble a transmissió recent (Glynn i cols.,1999, Vynnycky i cols.,2001, Borgdorff i cols.,2001, Murray i Alland,2002a, Murray,2002b). La conclusió final, de tots aquests treballs és que el percentatge de transmissió recent en una àrea concreta s'hauria d'interpretar amb molta cura i considerar el grau d'efecte que les variables esmentades tenen sobre aquesta d'una manera individual, però també, conjunta.

Des del punt de vista metodològic s'ha de considerar el fet que les còpies de la seqüència IS6110 no estan distribuïdes a l'atzar en el genoma (McHugh i Gillespie,1998). Així, en determinades posicions les bandes tenen una presència significativament més constant del que és podria esperar per la freqüència de canvi del marcador, –estimat entre 3 i 4 anys (Yeh i cols.,1998, de Boer i cols.,1999)–, fet que podria interferir amb la interpretació epidemiològica de les soques relacionades. Una situació similar succeeix amb els patrons de soques que difereixen en una o dues seqüències IS6110. En aquests casos: com s'han d'interpretar aquestes empremtes? Un treball publicat darrerament associa significativament, canvis en la IS6110 amb soques que tenen més de cinc còpies de l'esmentada seqüència (Warren i cols.,2002). Els autors suggereixen que l'agrupació de soques fonamentada només amb patrons molecular idèntics està subestimant la transmissió en aquells malalts infectats amb soques que tenen un nombre elevat de còpies de la IS6110. En aquest mateix sentit, altres treballs suggereixen que l'agrupació disminueix quan s'utilitzen dos marcadors moleculars diferents (Burman i cols.,1997, Solsona i cols.,2001). Probablement, l'ús combinat de diferents marcadors i tècniques en la determinació de les empremtes genètiques podria augmentar la fiabilitat en la proporció de la transmissió recent resultant (Warren i cols.,1996).

No hi ha cap dubte de què l'epidemiologia molecular és una eina molt valuosa per l'estudi de la transmissió de la TB, però, les dades aportades pels diferents treballs desenvolupats arreu del món fan necessari avaluar i tornar a definir les premisses de base, considerar l'efecte de determinades variables i pensar que soques idèntiques poden suggerir, però no necessàriament demostrar, transmissió recent entre elles.

---

## II. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR I EPIDEMIOLOGIA CONVENCIONAL

Una de les funcions de l'ECC és reconstruir la cadena de transmissió partint del cas diagnosticat així com dels seus antecedents. La cadena de transmissió, de qualsevol malaltia

contagiosa, pot definir-se com una successió de fets temporals i espacials, el que pressuposa que la transmissió s'ha produït cas a cas. Aquesta successió és molt sovint difícil d'establir, doncs freqüentment, els malalts ignoren que s'ha produït el contacte i reconstruir la cadena en base a dades indirectes sobre les activitats de les persones implica una gran quantitat d'informació poques vegades disponibles.

L'epidemiologia molecular és, fins ara, l'única eina per a comprovar exactament el lligam entre malalts relacionats per l'ECC. Les dades observades en els nombrosos estudis de poblacions han demostrat que la correlació entre l'epidemiologia molecular i convencional és molt variable, -d'un 10% a un 83% (Capítol 2, taula 2.11)-, i més complexa del que es podia esperar. La situació, però, és força diferent quan s'estudien comunitats més petites i tancades, com ara hospitals o presons (Frieden i cols.,1996, March i cols.,2000) o col·lectius concrets, com els indigents o malalts VIH positius on les taxes de correlació són més elevades, -d'un 70 a un 90% (Barnes i cols.,1996, Daley i cols.,1992)-.

Les cadenes de transmissió establertes per l'epidemiologia convencional i molecular es poden comparar de tres formes diferents:

- a) investigar la connexió clínica abans de determinar les empremtes moleculars de les soques,
- b) investigar la connexió clínica després d'establir les agrupacions (Small i cols.,1994),
- c) investigar la connexió clínica i establir les relacions moleculars per separar i, posteriorment, interrelacionar-les (Solsona i cols.,2001).

En un treball concret, l'ús d'una d'aquestes tres opcions pot influir en el grau de correlació final obtingut entre els dos mètodes.

La principal raó per la qual la correlació entre l'ECC i l'epidemiologia molecular mai pot coincidir del tot és que l'epidemiologia convencional engloba tots els casos de TB, tant els clínics com els bacteriològics i, per tant, una proporció de casos quedaran sense poder ser analitzats molecularment. A més, no sempre és possible obtenir l'empremta genètica de tots els cultius positius, hi ha un tant per cent de les soques que no creixen en les successives resembres i, finalment, convé considerar les limitacions temporals i geogràfiques pròpies de l'epidemiologia molecular. Ara bé, el fet que la correlació entre ambdues tècniques no pugui ser total no implica que els lligams moleculars establerts siguin incorrectes. L'epidemiologia molecular no pot precisar ni el moment del contacte ni tampoc la manera en què s'ha produït aquest. Des de sempre s'ha considerat que la TB era una malaltia infecciosa difícil de transmetre i que per fer-ho es necessitava un contacte intens i llarg en el temps (Enarson,1994). L'epidemiologia molecular ha evidenciat el contrari, que la transmissió de la TB

pot produir-se, en un elevat nombre dels casos, per un contacte no identificat, de forma casual o curta en el temps i sense tenir-ne cap sospita (Behr i cols.,1998, van Soolingen i cols.,1999). A més, si bé és cert que la probabilitat de infectar-se d'un malalt contagiós disminueix en proporció a la distància amb aquest malalt, el nombre total de persones a les quas un malalt pot infectat sense mantenir un contacte íntim amb ell és considerable i, conseqüentment, pot arribar a ser quasi més gran que el nombre de persones de contacte més íntim (Veen,1992). La transmissió de la TB és un fenomen multifactorial on hi intervenen moltes variables, la influència de les quals no es pot calcular.

Un altre fet significatiu que podria explicar l'escassa correlació entre l'epidemiologia convencional i molecular és que en estudiar la connexió clínica, després d'haver establert les diferents agrupacions, és possible que s'estigui subestimant la correlació entre ambdues tècniques si només és busquen lligams entre les soques absolutament idèntiques. Quin paper juguen en la transmissió i en la recerca dels lligams entre les soques agrupades, aquelles amb empremtes que difereixen d'una o dues bandes respecte a les soques 100% idèntiques? Hi ha diferents factors que poden produir canvis en el patró RFLP. Les mutacions en un únic nucleòtid, –que provoqui o una nova diana de restricció o la pèrdua d'ella–, insercions, duplicacions, inversions, delecions i transposicions de la IS6110 poden, també, afectar als fragments de restricció. Tot i que les empremtes per RFLP-IS6110 són força estables en el temps de vegades s'observen petites variacions en els patrons (Cavé i cols.,1994). D'aquesta manera diferents treballs han pogut establir lligams epidemiològics i augmentar, així, la correlació entre els dos mètodes tenint en compte els patrons amb empremtes similars alhora de reconstruir la cadena de transmissió (Frieden i cols.,1996, Ijaz i cols.,2002).

A més, no s'ha d'oblidar que les característiques pròpies de la comunitat que s'estudia influeixen directament en la recerca dels lligams epidemiològics establerts a partir de la identitat de les soques. En aquest sentit, en una població que es mou amb facilitat els contactes casuals poden ser proporcionalment més freqüents que els contactes propers i íntims, això podria explicar perquè no es poden demostrar lligams entre els malalts amb soques idèntiques. Aquesta podria ser la situació de molts dels malalts guineans agrupats (Article III). Un fenomen similar és el descrit en àrees rurals on les soques de malalts geogràficament dispersos i amb poca probabilitat d'haver tingut contacte previ presenten patrons moleculars idèntics (Braden i cols.,1997, Picard,2000). Aquest fet es pot relacionar amb l'esmentat en l'apartat anterior respecte a la presència de soques més prevalents o endèmiques característiques dels diferents indrets. En aquesta mateixa línia, alguns estudis suggereixen que en zones d'elevada incidència i on la població viu en condicions de pobresa, –el cas de molts països africans o, fins i tot, àrees concretes de ciutats del primer món–, la dificultat en practicar l'ECC està relacionat amb la

complexitat de les estructures familiars i veïnals (Classen i cols.,1999, Solsona i cols.,2001). En aquestes indrets altres factors, tant importants i característics de la població, com són els hàbits socials i els costums culturals podrien influir decisivament en la investigació i determinació de les cadenes de transmissió.

Així, les discrepàncies entre ambdues tècniques són producte de la pròpia dinàmica de la transmissió, de les característiques de les poblacions estudiades i de la tecnologia emprada, però, per conèixer millor el/s mecanisme/s de transmissió, les poblacions de més risc i els factors associats, i a l'hora poder establir les mesures indicades per controlar la infecció és imprescindible l'ús combinat d'ambdues metodologies.

---

### **III. EFECTE DEL TRACTAMENT EN LA CONTAGIOSITAT DELS MALALTS**

La contagiositat dels malalts tuberculosos és multifactorial i depèn de moltes variables inherents al propi malalt i a les característiques de la malaltia. El valor de la bacil·loscòpia, –positiva o negativa –, el nombre de bacils presents en aquesta, la localització i la extensió de la malaltia, –un o dos pulmons, amb o sense cavitació–, i fins i tot, la variabilitat en les diferents lesions pulmonars presents en un mateix malalt són factors que influeixen en la transmissió. A més, no s'han d'oblidar els diferents mecanismes físics, –tos, esternuts, parlar, entre altres–, que faciliten la disseminació de les partícules infectives i que poden ser més o menys importants segons el malalt.

En aquest mateix context, la capacitat per transmetre la TB que pot tenir un malalt també es veu influenciada segons si està rebent o no tractament. En la pràctica clínica habitual es considera suficient un període de dues setmanes de tractament perquè el malalt deixi de ser contagiós. Aquest criteri d'actuació està fonamentat en els resultats obtinguts en els estudis desenvolupats durant la dècada dels seixanta a Madràs, Índia (Ramakrishnan i cols.,1961, Kamat i cols.,1966), i en altres posteriors realitzats als Estats Units (Devadatta i cols.,1970, Eddison i Farmer,1971, Brooks i cols.,1973, Abeles,1973, Gunnels i cols.,1974, Riley i Moodie,1974). L'objectiu comú de tots ells és avaluar la transmissió de la infecció, –emprant la prova de la tuberculina–, des d'un cas índex tractat, –ingressat o bé en règim ambulatori–, als seus contactes més propers. En resum, tots suggereixen que la transmissió té lloc abans de l'inici del tractament del primer i que és segur donar-lo d'alta pocs dies després d'iniciar la teràpia.

Ara bé, les conclusions a les quals arriben els estudis esmentats són com a mínim bastant circumstancials i cal considerar-ne alguns aspectes alhora d'interpretar els resultats:



a) només l'estudi de l'Índia (Kamat i col.,1966) i el de Nova York (Eddison i Farmer, 1971) van ser controlats estadísticament. Així, és molt possible que la resta de treballs tinguin un cert biaix en la selecció dels malalts,

b) el lloc geogràfic on es va desenvolupar el primer estudi podria haver condicionat el resultat, en el sentit que les taxes de prevalença d'infecció i malaltia de la ciutat de Madràs són força elevades. En aquest cas la transmissió en la comunitat juga un paper molt important i, a més: fins a quin punt és diferent el contacte, entre el cas índex i els seus familiars, segons estigui o no ingressat?. En el nostre entorn la diferència és clara, però, en països africans i també en alguns asiàtics les pautes de conducta són molt semblants tant si el malalt està hospitalitzat com si està a casa. És fàcil trobar molts membres de la família passant hores al costat del malalt i, fins i tot, en alguns casos poden arribar a instal·lar-s'hi per fer els àpats i dormir. Possiblement, en aquestes poblacions no hi hagi tanta diferència entre el fet d'estar ingressat o de romandre a casa,

c) és important reconèixer que les pautes terapèutiques emprades en els estudis esmentats, -INH, PAS, SM, ET -, no corresponen a les pautes actual que contenen RIF i PZA dos fàrmacs amb una ràpida acció esterilitzant,

d) tots els estudis presenten elevades taxes d'infecció prèvia al diagnòstic i inici del tractament amb valors que oscil·len del 29% al 67% (Gunnels i cols.,1974, Kamat i cols.,1966) i, finalment

e) donat que la transmissió de la TB depèn de nombrosos factors, és molt probable, que la exposició dels contactes als casos índexs tingués un cert biaix.

La susceptibilitat del contacte a la infecció i les característiques pròpies del bacil són també aspectes a tenir en compte.

Totes aquestes esmenes no invaliden els resultats observats en els diferents treballs, però, no aporten evidències epidemiològiques clares a les preguntes concretes de: els malalts tractats poden transmetre la TB? i, quants dies de tractament són necessaris per a què el malalt deixi de ser contagiós? Les respostes a aquestes qüestions són, ara per ara, una incògnita.

D'altre banda, és cert que quan un malalt comença un tractament correcte i efectiu la concentració de bacils en el seu esput disminueix ràpidament, encara que alguns d'ells puguin ser detectats després de setmanes o fins i tot mesos de tractament. La evidència *in vitro* d'aquest fet va demostrar que en dues setmanes de tractament amb INH o RIF el nombre de bacils disminuïa en un 90% i, amb una combinació de tres o quatre fàrmacs la disminució hauria de ser de 1000 vegades menys (Jindani i cols.,1980). Així, en malalts que inicialment presentin esputs amb bacil·loscòpia negativa i cultiu positiu, -amb menys de  $10^5$  bacils/ml d'esput-, i després de dues setmanes de tractament amb tres o quatre fàrmacs serà quasi

impossible detectar els bacils, –el nombre d’ells s’haurà reduït a menys de 100 bacils/ml d’esput–. Conseqüentment, aquests malalts podrien ser considerats no contagiosos. En contraposició, en malalts amb bacil·loscòpia i cultiu positiu, –amb  $10^5$ - $10^7$  bacils/ml d’esput–, l’acció dels antibiòtics provocarà una reducció bacil·lar important però no suficient, encara serà possible detectar els bacils i, per tant, podrien ser considerats com a contagiosos. A més, hi ha força variabilitat en la rapidesa de la resposta bacteriològica. Entre el 30% i el 50% dels malalts amb bacil·loscòpia positiva i bacils sensibles negativitzen els seus cultius en un mes quan són tractats amb pautes de tres o quatre fàrmacs. Només d’un 5% a un 10% del total presenten bacil·loscòpia i cultiu positiu als tres mesos de tractament (EA/BMRC,1972, Tousek i Votruba, 1974, TRC,1983). La situació és molt diferent quan es tracta de bacils resistents a alguns dels antibiòtics de manera que la negativització de la bacil·loscòpia i cultiu és més lenta.

Un altre aspecte que cal considerar és que passa amb els bacils quan el malalt ja ha començat a rebre tractament. En aquestes circumstàncies les partícules infectives emeses pel malalt contenen bacils més fàrmacs antituberculosos. En el treball de Sultan i cols., (1960) es suggereix que la concentració d’INH en l’esput és aproximadament la mateixa que en sang. Davant aquest fet es pot considerar que els bacils són viables? L’experiment *in vitro* dut a terme per Loudon i cols., (1969b) ho afirma. La viabilitat del bacil es manté i es poden obtenir cultius positius després de què els bacils hagin estat exposats dotze hores a INH dintre de les partícules infectives. A més, les evidències experimentals corroboren aquest fet. Un conjunt de conills d’índia van ser inoculats a nivell intraperitoneal amb esputs procedents de malalts tuberculosos que després d’un mes de tractament encara tenien bacil·loscòpia i cultiu positiu. Malgrat el tractament tots els animals van desenvolupar lesions tuberculosos (Clancy i cols.,1990). La qüestió ara és: la resposta en els humans seria igual? És important destacar que els sistema d’inoculació emprat en l’experiment va ser molt directe, –intraperitoneal–, i no és el mecanisme convencional de la transmissió entre les persones. Prèviament, però, l’experiment de Riley i cols., (1962) havia demostrat infecció per via aèria, entre malalts tuberculosos en tractament i conills d’índia connectats mitjançant els sistema de ventilació, tot i que en menor proporció respecte als animals exposats a l’aire de malalts sense teràpia. Malgrat que en aquest estudi no queda clara la pauta terapèutica emprada i el temps que feia que els malalts estaven en tractament.

L’avaluació global del tema en discussió assenyala que les evidències *in vitro*, experimentals i epidemiològiques comentades suggereixen que els malalts en tractament poden transmetre la TB, tot i que de manera reduïda i, no es pot determinar, amb claredat, el moment concret en què un malalt amb teràpia esdevé no contagiós.

#### IV. TRANSMISSIÓ DE SOQUES RESISTENTS RESPECTE A LES SENSIBLES

El potencial de transmissió de les soques resistents respecte a les sensibles sempre ha estat una font intensa de discussió, especialment incrementada, després dels nombrosos brots de TB MDR localitzats als Estats Units durant la dècada dels noranta (Edlin i cols.,1992, Coronado i cols.,1993, Frieden i cols.,1996). De fet, la capacitat de transmissió dels micobacteris resistents respecte als sensibles no té perquè ser diferent. La transmissió és, essencialment, un fet físic on el tipus de soca de *Mycobacterium tuberculosis* i el seu patró de susceptibilitat no hi juga cap paper actiu. Com ja s'ha comentat extensament en la introducció, els mecanismes que poden generar partícules contagioses, –tossir, parlar, cantar i altres–, així com la duració i la intensitat de l'exposició al malalt són els primers factors en influir en la dinàmica de transmissió (Loudon i Spohn,1969a, Loudon i Roberts,1968, Nardell i cols.,1991), però, és clar, que cap d'aquests factors ni s'altera, ni es modifica, ni tampoc es potencia en funció del patró de susceptibilitat antibiòtica de la soca, conseqüentment, la capacitat de transmissió de les soques resistent i sensibles ha de ser la mateixa.

Una forma d'estimar la diferència en el grau de transmissibilitat de les soques sensibles i resistents és mesurar i comparar les freqüències d'infecció, –prova de la tuberculina positiva–, i/o TB clíniques entre contactes de casos índexs amb els dos fenotipus. En aquesta línia d'estudi, s'han observat proporcions d'infecció similars entre contactes de casos amb soques sensibles i resistent (Snider i cols.,1985). A Brasil, Teixeira i cols., (2001) va estudiar la infecció i la progressió a malaltia entre els contactes de malalts amb soques MDR. Ni la prevalença d'infecció ni la freqüència de TB clíniques va ser associada a malalts amb una soca resistent, malgrat que els casos MDR van ser, com és força lògic, contagiosos durant un període de temps més llarg. No trobar diferències en les taxes d'infecció entre malalts sensibles o resistents tampoc no és un fet estrany. S'ha de tenir en compte que la infecció és el resultat d'un contacte entre el bacil i el sistema immune de l'hoste, –macròfags i limfòcits T–, és una reacció immunològica que es produeix independent del tipus de patró de susceptibilitat que té la soca. És només quan la infecció progressi cap a malaltia que la resposta immune de la persona i, de forma destacada, l'agressivitat del bacil hi tindran un paper actiu i determinant.

Amb la introducció de l'epidemiologia molecular s'ha pogut avaluar la transmissió relativa dels dos fenotipus comparant la freqüència i la mida de les agrupacions generades per malalts amb soques de *M. tuberculosis* sensibles i resistents. Malgrat que, en els darrers anys, s'han publicat una gran quantitat d'estudis d'epidemiologia molecular només en un nombre reduït d'ells s'ha avaluat explícitament la proporció de soques resistents i sensibles en les agrupacions (Alland i cols.,1994, Marttila i cols.,1998, van Soolingen i cols.,1999, Godfrey-Faussett i

cols.,2000, van Rie i cols.,2000, Kruuner i cols.,2001, Toungousova i cols.,2002, Vukovic i cols.,2003). En general, les dades aportades per aquests estudis indiquen que la transmissió i producció de malaltia de les soques resistents i sensibles és força similar. Davant d'aquesta situació pot l'epidemiologia molecular estar subestimant o sobreestimant la transmissió de les soques resistents? Probablement sí, exactament igual que si s'estudiés només la transmissió de les soques sensibles i, possiblement, per raons semblants a les suggerides en l'apartat I d'aquesta discussió.

Els avenços en el coneixement i detecció de les mutacions associades a la resistència dels diferents fàrmacs antituberculosos (Ramaswamy i Musser,1998), ha fet que l'estudi del tema sigui més precís malgrat que això no ha significat poder resoldre la qüestió. En aquest context, diferents treballs han analitzat el nombre de soques agrupades segons el tipus d'antibiòtic pel qual són resistents distingint les monoresistències i les MDR (van Soolingen i cols.,1999, Godfrey-Faussett i cols.,2000, van Rie i cols.,2000, Toungousova i cols.,2002, Vukovic i cols.,2003, Burgos i cols.,2003) i, més encara, han avaluat les soques tenint en compte el lloc concret de mutació (Marttila i cols.,1998, van Soolingen i cols.,2000). La importància d'aquest últim aspecte és especialment interessant en el cas de la resistència a la INH.

En la dècada dels cinquanta, experiments en models animals i *in vitro* van demostrar que les soques INH resistents inoculades en conills d'índia creixien amb més dificultat, produïen menys lesions i mataven en menor quantitat respecte a les soques sensibles (Middlebrook i Cohn,1953, Middlebrook,1954, Cohn i cols.,1954a,1954b). Les troballes dels diferents treballs van permetre relacionar resistència a INH i producció de l'enzim catalasa-peroxidasa amb virulència. Des d'aquest moment, es va assumir que els bacils resistents a la INH perdien la capacitat de produir l'enzim catalasa-peroxidasa i, conseqüentment, disminuïen la seva agressivitat esdevenint no patògens. Uns anys més tard, es va descobrir que l'enzim catalasa-peroxidasa estava sintetitzat pel gen *katG*, i que la presència de mutacions en aquest gen provocava la pèrdua de l'activitat enzimàtica fet que evitava la transformació de la INH a la seva forma activa i allargava la presència intracel·lular del micobacteri (Zang i cols.,1992). S'ha calculat que entre el 50% i el 60% de les soques INH resistents estudiades presenten alguna/es alteració/ns en aquest gen (Ramaswamy i Musser,1998). La mutació més freqüent, d'un 32% a un 92%, és la que afecta al c315 i comporta un canvi d'aa (Haas i cols.,1997, Marttila i cols.,1998, Verdú i cols.,2002). Amb la idea d'avaluar la importància i l'efecte en l'agressivitat de les soques amb alteracions en el gen *katG*, Li i cols., (1998) van comparar la capacitat de creixement de soques micobacterianes amb l'esmentat gen deletat i, posteriorment, restaurat. Com s'esperava les soques sense gen perdien la capacitat de créixer però aquesta es recuperava quan es reintroduïa una altra vegada el gen. Aquest fenomen evidenciava que el



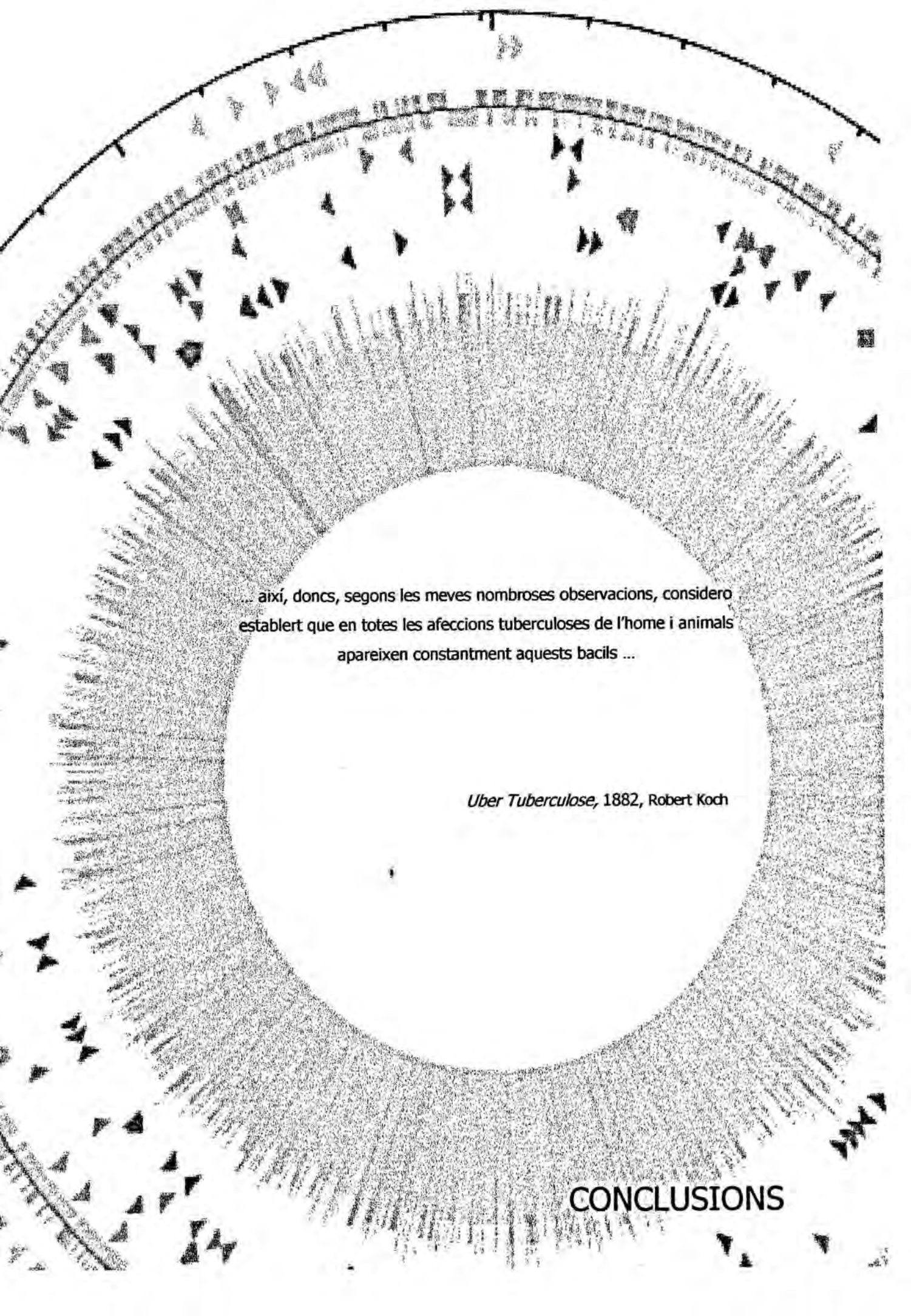
gen *katG* és un factor de virulència per *M. tuberculosis*. A més, quan els bacils van ser transformats amb gens *katG* que presentaven mutacions puntuals el nivell original de creixement detectat variava depenent del lloc de la mutació suggerint la presència de diferents fenotipus de soques INH resistents pel que fa al creixement i la virulència. Aquesta observació reforça la idea de la heterogeneïtat de les soques resistents, –en termes de resistència i patogenicitat–, esgrimida en els primers treballs de Middlebrook i Cohn i en altres posteriors (Ordway i cols.,1995). En aquest context, van Soolingen i cols., (2000), mesurant el grau d'agrupació de soques INH resistents amb el gen *katG* mutat en el c315, suggereix que el tipus de mutació determina diferències en la transmissibilitat, –mesurada segons la freqüència d'agrupació–, evidència que recolza, encara més, els arguments exposats pels autors esmentats anteriorment.

La resistència a la INH també implica a altres gens com, la zona intergènica *oxyR-ahpC*, *kasA*, *furA*, el *ndh*, i especialment el *locus inhA* (Ramaswamy i Musser,1998, Lee i cols.,2001). La distribució geogràfica de les mutacions associades a aquests gens és variable i en menor freqüència que la calculada pel gen *katG*. Un altres aspecte a destacar és que les observacions experimentals mostren una forta correlació entre el tipus de mutació i les CMI's, associant alteracions en el gen *katG* amb resistència a concentracions elevades de la INH, –superiors a 1µg/ml–, i mutacions en el gen *inhA* amb CMI's baixes (Banerjee i cols.,1994, Lonca i cols.,2002). Així, les soques resistents a INH amb el gen *katG* mutat, sense activitat enzimàtica detectable o molt disminuïda i amb CMI's elevades presentarien virulència atenuada donat que les alteracions afecten a dos enzims fonamentals per la vida i el manteniment intracel·lular del bacil. En aquestes circumstàncies es reproduirien els models experimentals de Middlebrook i Cohn. Però, en aquest punt no s'ha d'oblidar el paper actiu de les mutacions compensatòries que poden fer recuperar les funcions perdudes i amb elles tota l'agressivitat dels bacils. Aquest seria el cas de les soques amb una sobreexpressió de l'enzim AhpC, –per mutació en el promotor del gen *AhpC*–, compensant la mutació del gen *katG* (Sherman i cols.,1996, Springer i cols.,2001). En contraposició, les soques on la resistència ve determinada per alteracions en el gen *inhA* o bé en qualsevol dels altres, amb activitat catalasa-peroxidasa conservada i CMI's baixes mantindrien intacte la seva transmissibilitat. Aquest tipus de situació explicaria aquells casos on la resistència a INH és petita i on no hi ha cap sospita clínica d'ella, com el cas de les soques guineanes resistents descrites en l'article II.

La influència dels altres fàrmacs sobre la capacitat de transmissió de les soques resistents és poc important i, en general, les alteracions dels gens implicats no tenen un efecte directe sobre la viabilitat metabòlica del bacil i són ràpidament compensades per altres mutacions (Billington i cols.,1999, Böttger i cols.,1998). D'altra banda, la resistència simultània

a més d'un fàrmac, la MDR, no és més que l'acumulació de les resistències individuals dels antibiòtics generades pel mateix tipus de mutacions (Morris i cols.,1995). Sembla ser que en aquest tipus de soques la suma de totes les mutacions parcials podria disminuir considerablement la viabilitat metabòlica de la soca (Davies i cols.,2000). Així, es pot assumir que els malalts amb TB MDR mantindrien la capacitat de transmissió com si es tractés d'una soca sensible, però, disminuirien la possibilitat de desenvolupar un TB activa donat que l'elevat nombre de mutacions tindria un cost important en la viabilitat metabòlica del bacil tot i les mutacions compensatòries produïdes (Böttger i cols.,1998).

Avaluar la transmissibilitat i agressivitat de les soques resistents significa considerar molts aspectes de forma individual però també de forma global. És probable que sigui l'efecte sinèrgic de molts factors: la resposta immune de la persona, les característiques pròpies del bacil, la seva viabilitat metabòlica, entre altres, independents del fenomen de la resistència, el que determini que una soca sigui més o menys transmissible en concepte de virulència i patogenicitat.



... així, doncs, segons les meves nombroses observacions, considero establert que en totes les afeccions tubercloses de l'home i animals apareixen constantment aquests bacils ...

*Über Tuberculose, 1882, Robert Koch*

**CONCLUSIONS**

En relació a la transmissió nosocomial de la TB:

- I. No s'ha demostrat evidència de transmissió nosocomial de malaltia tuberculosa entre 151 (57.6% VIH positius) malalts tuberculosos ingressats i 109 (38% VIH positius) malalts companys d'habitació en estudiar la seva evolució durant un període mínim 18 mesos.
- II. La elevada mortalitat a curt termini (el 68.3% dels malalts VIH positius i el 26.4% dels malalts VIH negatius van morir el primer any) entre els malalts companys d'habitació no permet excloure la possibilitat de contagi ni de desenvolupament de malaltia.


En relació a la descripció de les resistència i a la transmissió poblacional:

- I. La taxa global de resistències entre casos nous observada, 16.9%, és similar a la determina en altres països propers a l'àrea geogràfica estudiada.
- II. Entre els factors de risc de resistència estudiats, la variable *dona* s'ha associat significativament amb resistència en casos nous. No s'ha trobat una explicació clara a aquesta associació tot i que s'ha descrit en altres poblacions africanes i europees i que podria estar relacionada amb comportaments socioculturals.
- III. En caracteritzar genèticament les mutacions associades a la resistència a la INH, s'ha trobat, tant en casos de resistència casos nous i prèviament tractats, que en el 80% es detectaven mutacions a la zona reguladora del gen *inhA*, i no s'ha detectat cap mutació en el c315 del gen *katG*.
- IV. El 78% de les soques resistents a la INH presenten resistència de baix nivell ( $CMI \leq 1 \mu\text{m/ml}$ ).
- V. El 75% de les soques resistents a la RIF presenten mutacions en la zona *regió determinant de la resistència a la rifampicina* del gen *rpoB*. En el 25% restant no s'ha trobat cap mutació.



### Conclusions

- VI. Cap dels malalts amb monoresistència a la INH de baix nivell ha evidenciat sospita clínica de resistència durant el període de tractament estàndard i han tingut una bona evolució després d'un mínim de 14 mesos de seguiment.
- VII. El nivell d'agrupació del 61.6%, determinat als districtes de Bata i Malabo a Guinea Equatorial, suggereix un elevat grau de transmissió recent o la presència de soques endèmiques característiques de la regió degut a l'elevada prevalença de TB en el país.
- VIII. Els factors de risc *resistència als fàrmacs antituberculosos* i *bacil·loscòpia intensament positiva* (grau quatre), s'han associat estadísticament amb pertànyer a una agrupació.
- IX. El 81% (30 soques) de soques resistents pertanyen a alguna de les agrupacions determinades.
- X. La resistència a la INH amb mutació en el gen *inhA* no s'ha associat amb una disminució de la capacitat de transmissió de la soca.
- XI. L'aplicació de la tècnica de tipificació molecular RFLP associada a la IS6110 és una eina útil en la vigilància de transmissió nosocomial i en l'estudi de la transmissió a nivell poblacional.



*... protestava contra l'escala de Gaffky, d'aquell sistema d'examen segons el qual es deduïa i fixava en el laboratori, en el "labo", com s'anomenava ordinàriament, el grau d'infecció d'un malalt, pels bacils, segons si aquests es descobrien aïllats o en grans quantitats en el teixit analitzat. D'aquesta manera, el número de l'escala de Gaffky era més o menys elevat i tot depenia d'aquesta xifra, que expressava, sense cap error, les possibilitats de curació del malalt ...*

*La Muntanya Màgica, 1923, Thomas Mann*

**BIBLIOGRAFIA**

**Alcaide F**, Pfyffer GE, Telenti A. Role of *embB* in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemther* **1997**;41:2270-2273.

**Alcaide F**, Gali N, Dominguez J, Berlanga P, Blanco S, Orus P, Martín R. Usefulness of a new mycobacteriophage-based technique for rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* **2003**;41: 2867-2871.

**Alland D**, Kalkut G, Moss A, i cols. Transmission of tuberculosis in New York city. *N Engl J Med* **1994**; 330:1710-1716.

**Almeda J**, García A, González J, i cols. Clinical evaluation of in house IS6110 PCR in tuberculosis diagnosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2000**;19:859-867.

**Andrew OT**, Schoenfeld PY, Hopewell PC, Humphries MH. Tuberculosis in patients with end-stage renal disease. *Am J Med* **1980**; 68:59-65.

**Armstrong L & Garay SM**. Tuberculosis and Pregnancy and tuberculous mastitis. A: Rom WN & Gary SM editors. Tuberculosis. Boston: Little, Brown and company **1996**;689-698.

**ATS: American Thoracic Society** ([www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org)). Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* **2000a**;161:S221-S247.

**ATS: American Thoracic Society**. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respi Crit Care Med* **2000b**;161:1376-1395.

## A

**Abeles H**. Early hospital discharge of tuberculous patients with sputum containing acid-fast bacilli on microscopic examination. *Am Rev Respir Dis* **1973**;108:975-977.

**Abed Y**, Davin-Reglia A, Bollet C, De Micco P. Efficient discrimination of *M.tuberculosis* strains by 16S-23S spacer region-based random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* **1995**;33:1418-1420.

**ASP: Agencia de Salut Pública**. Ajuntament de Barcelona. ([www.imsb.bcn.es](http://www.imsb.bcn.es)). La tuberculosi a Barceloa. Informe 2001. Programa de Prevenció i Control de la Tuberculosi a Barcelona. Servei d'epidemiologia.

**Agerton TB**, Valway SE, Blinkhorn RJ, i cols. Spread of strain W, a highly drug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis* across the United States. *Clin Infec Dis* **1999**; 29:85-92.

**Alcaide J**, Altet MN, Plans I, i cols. Cigarette smoking as a risk factor for tuberculosis in young adults: a case-control study. *Tuber Lung Dis* **1996**;77:112-116.

## B

**Balagué M**, Orcau A, Sánchez P, Tortajada C, Caylà JA. Epidemiología actual de la tuberculosis en España: hacia una mejor vigilancia y control. Control de Calidad SEIMC, **2003**.

**Balcewicz-Sablinska MK**, Keane J, Kornfeld H, Remold HG. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF $\alpha$ . *J Immunol* **1998**; 161:2336-2641.

- Banerjee A**, Dubnau E, Quemard A, i cols. *InhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **1994**; 263: 227-30.
- Barnes PF**, El-Hajj H, Preston-Martin S, i cols. Transmission of tuberculosis among the urban homeless. *JAMA* **1996**;275:305-307.
- Bauer J**, Yang Z, Poulsen S, Andersen AB. Results from 5 years of nationwide DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in a country with a low incidence of *M. tuberculosis* infection. *J Clin Microbiol* **1998**;36:305-308.
- Bayer R & Wilkinson D**. Directly observed therapy for tuberculosis: history of an idea. *Lancet* **1995**;345:1545-1548.
- Behr MA**, Hopewell PC, Paz EA, Kawamura LM, Shecter GF, Small P. Predictive value of contact investigation for identifying recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med* **1998**;158:465-469.
- Behr MA**, Warren SA, Salamon H, i cols. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet* **1999**;353:444-449.
- Bellamy R**, Beyers N, McAdam KP, i cols. Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: a genome-wide scan. *Proc Natl Acad Sci USA* **2000**;97:8005-8009.
- Bellamy R**, Ruwende C, Corrah T, i cols. Variations in the *NRAMP1* gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N Engl J Med* **1998**;338:640-646.
- Berthet FX**, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology* **1998**;144: 3195-3203.
- Bhanu NV**, van Soolingen D, van Embden JDA, Dar L, Pandey RM, Seth P. Predominance of a novel *Mycobacterium tuberculosis* genotype in the Delhi region of India. *Tuberculosis* **2002**;82:105-112.
- Bifani PJ**, Plikaytis BB, kapur V, i cols. Origin and interstate spread of a New York City multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family. *JAMA* **1996**; 275: 452-457.
- Bifani PJ**, Mathema B, Kurepina NE, Kreiswith BN. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol* **2002**;10:45-52.
- Billington OJ**, McHugh TD, Gillespie SH. Physiological cost of rifampin resistance induced *in vitro* in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**;43:1866-1869.
- BMRC: British Medical Research Council**. Streptomycin treatment of pulmonary tuberculosis. A medical research council investigation. *BMJ* **1948**;2:769-782.
- BMRC: British Medical Research Council**. Treatment of pulmonary tuberculosis with streptomycin and para-aminosalicylic acid. *BMJ* **1950**;2:1073-1085.
- BMRC: British Medical Research Council**. Various combinations of isoniazid with streptomycin or with PAS in the treatment of pulmonary tuberculosis. *BMJ* **1955**;1:435-445.
- de Boer AS**, Borgdorff MW, de Haas PE, i cols. Analysis of rate of change of IS6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patients isolates. *J Infect Dis* **1999**;180:1238-1244.
- Borgdorff MW**, Nagelkerke N, van Soolingen D, de Haas PE, Veen J, van Embden JD. Analysis of tuberculosis transmission between nationalities in the Netherlands in the period 1993-1995 using DNA fingerprinting. *Am J Epidemiol* **1998**;147: 187-195.
- Borgdorff MW**, Behr MA, Nagelkerke N, Hopewell PC, Small PM. Transmission of tuberculosis in San Francisco and its association with immigration and ethnicity. *Int J Tuberc Lung Dis* **2000**;4:287-294.
- Borgdorff MW**, Nagelkerke NJD, de Haas P, van Soolingen D. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* depending on the age and sex of source cases. *Am J Epidemiol* **2001**;154 :934-943.
- Bothamley GH**, Beck JS, Schreuder GM, i cols. Association of tuberculosis and *M. tuberculosis* specific antibody levels with HLA. *J Infect Dis* **1989**;159:549-555.
- Böttger EC**, Springer B, Pletschette M, Sander P. Fitness of antibiotic-resistant microorganisms



- and compensatory mutations. *Nat Med* **1998**;4:1343-1344.
- Boyd JC & Marr JJ.** Decreasing reliability of acid-fast smear techniques for detection of tuberculosis. *Ann Intern Med* **1975**;82:489-492.
- Braden CR,** an Investigative Team. Infectiousness of university student with laryngeal and cavitory tuberculosis. *Clin Infect Dis* **1995**;21:565-570.
- Braden CR,** Templeton GL, Cave MD, i cols. Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a state with a large rural population. *J Infect Dis* **1997**;175:1446-1452.
- Brenan PJ.** Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* **2003**; 83:91-97.
- Brooks SM,** Lassiter N, Young E. A pilot study concerning the infection risk of sputum positive tuberculous patients on chemotherapy. *Am Rev Respir Dis* **1973**; 108:799-803.
- Bruchfeld J,** Aderaye G, Berggren Palme I, Bjorvant B, Ghebremichael S, Hoffner S, Lindquist L. Molecular epidemiology and drugs resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Ethiopian pulmonary tuberculosis patients with and without human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol* **2002**; 40: 1636-1643.
- Burgos M,** DeRiemer K, Small P, Hopewell P, Daley CL. Effect of drug resistance on the generation of secondary cases of TB. *J Infect Dis* **2003**;188:1878-1884.
- Burman WJ,** Reves RR, Hawkes AP. DNA fingerprinting with two probes decreases clustering of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med* **1997**;155:1140-1146.
- Burman WJ & Reves RR.** Review of false-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis* and recommendations for avoiding unnecessary treatment. *Clin Infect Dis* **2000**;31:1390-1395.
- Butler WR,** Jost KC, Kilburn JO. Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol* **1991**; 29: 2468-2472.
- C**
- 
- Caminero JA,** Pena MJ, Campos-Herrero MI, i cols. Exogenous reinfection with tuberculosis on a European island with a moderate incidence of disease. *Am J Respir Crit Care Med* **2001**;163:717-720.
- Caminero JA,** Caylà JA, Lara N, and the Working Group on the Current Status of Tuberculosis in Spain (SEPAR). Evaluation of tuberculosis trends in Spain, 1991-1999. *Int J Tuberc Lung Dis* **2003**;7:236-242.
- Camus JC,** Pyor MJ, Médigue C, Cole ST. Reannotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* **2002**;148:2967-2973.
- Canetti G & Grosset J.** Teneur des souches sauvages de *Mycobacterium tuberculosis* en variants résistants a la isoniazide et a variants résistants a la streptomycine sur milieu de Löwenstein-Jensen. *An Inst Pasteur* **1961**;101:28-46.
- Canetti G,** Froman S, Grosset J, i cols. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull, WHO* **1963**;29:565.
- Canetti G.** Host factors and chemotherapy of tuberculosis. A: VC Barry editors. Chemotherapy of tuberculosis. London: Butterworth **1964**;20-38.
- Canetti G,** Fox W, Khomenko A, i cols. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity and the use of sensitivity tests in tuberculosis programmes. *Bull, WHO* **1969**;41:21
- Cantwell MF,** Shehab ZM, Costello AM, i cols. Congenital tuberculosis. *N Engl J Med* **1994**;330:1051-1055.
- Cave MD,** Eisenach KD, Templeton G, Salfinger M, Mazurek G, Bat JH, Crawford JT. Stability of DNA fingerprint pattern produced with IS6110 in strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **1994**;32:262-266.
- Cave MD,** Eisenach KD, McDermott PF, Bates JH, Crawford JT. IS6110: conservation of

- sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. *Mol Cell Probes* **1991** ;5:73-80.
- CDC:** Centers for Disease Control and Prevention. ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)). Anergy skin testing and preventive therapy for HIV-infected persons: revised recommendations. *MMWR* **1997a**;46:1-10.
- CDC:** Centers for Disease Control and Prevention. Multiple misdiagnoses of tuberculosis resulting from laboratory error, Wisconsin 1996. *MMWR* **1997b**;46:797-801.
- CDC:** Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for using the QuantiFERON®-TB for diagnosing latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *MMWR* **2002**;51:1-5.
- Chan ED,** Heifets L, Iseman MD. Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review. *Tuber Lung Dis* **2000**;80:131-140.
- Chaves F,** Dronda F, Cave MD, i cols. A longitudinal study of transmission of tuberculosis in a large prison population. *Am J Respir Crit Care Med* **1997**;155:719-725.
- Chaves F,** Dronda F, Alonso-Sanz M, Noriega AR. Evidence of exogenous reinfection and mixed infection with more than one strain of *Mycobacterium tuberculosis* among Spanish HIV-infected inmates. *AIDS* **1999**;13:615-620.
- Chia S,** Karim M, Elwood RK, FitzGerald JM. Risk of tuberculosis in dialysis patients: a population-based study. *Int J Tuberc Lung Dis* **1998**;2:989-991.
- Clancy LJ,** Kelly P, O'Reilly L, Byrne C, Costello E. The pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* during chemotherapy. *Eur Respir J* **1990**;3:399-402.
- Classen CN,** Warren R, Richardson M, i cols. Impact of social interactions in the community on the transmission of tuberculosis in a high incidence area. *Thorax* **1999**;54:136-140.
- van Crevel R,** Ottenhoff THM, van der Meer JWM. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* **2002**;15:294-309.
- Cohn ML,** Oda U, Kovitz C, Middlebrook G. Studies on isoniazid and tubercle bacilli: the isolation of isoniazid-resistant mutants *in vitro*. *Am Rev Tuberc* **1954a**;70:465-475.
- Cohn ML,** Kovitz C, Oda U, Middlebrook G. Studies on isoniazid and tubercle bacilli: the growth requirements, catalase activities and pathogenic properties of isoniazid-resistant mutants. *Am Rev Tuberc* **1954b**;70:641-664.
- Colditz GA,** Brewer TF, Berkey CS, i cols. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA* **1994**;271:698-702.
- Colditz GA,** Berkey CS, Mosteller F, i cols. The efficacy of bacillus Calmette-Guérin vaccination of newborn and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analysis of the published literature. *Pediatrics* **1995**;96:29-35.
- Cole ST,** Brosch R, Parkhill J, i cols. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **1998**;393:537-544. Erratum; 396: 190.
- Cole ST.** Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology* **2002**;148 :2919-2928.
- Collins DM & de Lisle GW.** DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *J Gen Microbiol* **1984**;130:1019-1021.
- Comstock GW,** Livesay VT, Woolpert SF. The prognosis of a positive tuberculin reaction in childhood and adolescence. *Am J Epidemiol* **1974**;99:131-138.
- Comstock GW.** Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Proffit survey. *Am Rev Respir Dis* **1978**;117:621-624.
- Coronado VG,** Beck-Sague CM, Hutton MD, i cols. Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* i among persons with human immunodeficiency virus infection in a urban hospital: epidemiologic and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Infect Dis* **1993**; 168:1052-1055.
- Crowle AJ,** Ross EJ, May MH. Inhibition by 1.25 (OH) 2-vitamin D3 of the multiplication of virulent tubercle bacilli cultured in human macrophages. *Infect Immunity* **1987**;55:2945-2950.

## D

**D'Arcy HP & Sutherland I.** BCG and role bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life. Final report to the Medical Research Council. *Br Med J* **1977**;2:293-295.

**Dahle UR,** Sandven P, Heldal E, Caugant DA. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Norway. *J Clin Microbiol* **2001**;39:1802-1807.

**Dale JW.** Mobile genetic elements in mycobacteria. *Eur Respir J* **1995**; 8 (suppl. 20) 633s-648s.

**Dale JW,** Mat Nor R, Ramayah S, Tang TH, Zainuddin ZF. Molecular epidemiology of tuberculosis in Malaysia. *J Clin Microbiol* **1999**;37:1265-1268.

**Daley CL,** Small PM, Schecter GF, Schoolnik GK, McAdam RA, Jacobs WR Jr, Hopewell PC. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction fragment length polymorphisms. *N Engl J Med* **1992**; 326: 231-235.

**Dannenberg AM Jr & Sugimoto M.** Liquefaction of caseous foci in tuberculosis (editorial). *Am Rev Respir Dis* **1976**;113: 257-259.

**Dannenberg AM Jr.** Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Rev Infect Dis* **1989**;11(supp 2):S369-S378.

**Das S,** Chan SL, Allen BW, Mitchison DA, Lowrie DB. Application of DNA fingerprinting with IS986 to sequential mycobacterial isolates obtained from pulmonary tuberculosis in patients in Hong Kong before, during and after short-course chemotherapy. *Tuber Lung Dis* **1993**;74:47-51.

**David HL.** Probability distribution of drug-resistant mutants in unselected populations of *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl Microbiol* **1970**;20:810-814.

**Davies AP,** Billington OJ, Bannister BA, Weir WR, McHugh TD, Gillespie SH. Comparison of fitness of two isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, one of which had developed

multidrug resistance during the course of treatment. *J Infect* **2000**;41:184-187.

**Devadatta S,** Dawson JJ, Fow W, Janardhanam B, Radhakrishnan S, Ramakrishnan CV, Velu S. Attack rate of tuberculosis in a five year period among close family contacts of tuberculous patients under domiciliary treatment with INH plus PAS or INH alone. *Bull WHO* **1970**;42:337.

**Diaz R,** Kremer K, de Haas PE, cols. Molecular epidemiology of tuberculosis in Cuba outside of Havana, July 1994-June 1995: utility of spoligotyping versus IS6110 restriction fragment length polymorphism. *Int J Tuberc Lung Dis* **1998**;2:743-750.

**Diel R,** Schneider S, Meywald-Walter K, Ruf CM, Rusch-Gerdes S, Niemann S. Epidemiology of tuberculosis in Hamburg, Germany: long-term population-based analysis applying classical and molecular epidemiological techniques. *J Clin Microbiol* **2002**;40: 532 - 539.

**Dillaha JA,** Yang Z, Ijaz K, Eisenach KD, Cave MD, Wilson FJ, Stead WW, Bates JH. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in a rural community, Arkansas, 1945-2000. *Emerg Infect Dis* **2002**;8:1246-1248.

**Doster B,** Murray FJ, Newman R, Woolpert SF. Ethambutol in the initial treatment of pulmonary tuberculosis. US. Public Health Service Tuberculosis Therapy Trials. *Am Rev Respir Dis* **1973**;107:177-190.

**Dwyer B,** Jackson K, Raios K, Sievers A, Wilshire E, Ross B. DNA restriction fragment analysis to define an extended cluster of tuberculosis in homeless men and their associates. *J Infect Dis* **1993**;167:490-494.

## E

**EA/BMRC:** East African/British Medical Research Council. Controlled clinical trial of short-course (6 month) regimens of chemotherapy for treatment of pulmonary tuberculosis. *Lancet* **1972**;7760:1079-1085.

**EA/BMRC:** East African/British Medical Research Council. Second East African/British Medical Research Council study. Controlled clinical trial of four 6-month regimens of chemotherapy for pulmonary

- tuberculosis. Second Report. *Am Rev Respir Dis* **1976**;114:471-475.
- Eddison GG, & Farmer BM.** A control study of home versus hospital treatment of tuberculosis: three-year study results. *Am Rev Respir Dis* **1971**;103:886-887.
- Edlin BR, Tokars JI, Grieco MH, i cols.** An outbreak of multidrug-resistance tuberculosis among hospitalised patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* **1992**;326:1514-1421.
- Edwards LB, Foster B, Livesay VT, Ferebee SH.** Risk of tuberculosis among persons with 'not active- not treated' lesions. *Bull Int Union Tuberc* **1972**;47:151-156.
- Ehlers MR & Daffe M.** Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and host cell: are mycobacterial sugars the key? *Trends Microbiol* **1998**;6:328-335.
- Eisenach DK, Crawford JT, Bates JH.** Genetic relatedness among strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: Analysis of restriction fragment heterogeneity using cloned DNA probes. *Am Rev Respir Dis* **1986**;133:1065-1068.
- van Embden DJA, Cave MD, Crawford JT, i cols.** Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* **1993**;3: 406-409.
- Enarson DA.** Why not the elimination of tuberculosis? *Mayo Clin Proc* **1994**;69:85-95.
- Ernst JD.** Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **1998**;66:1277-81.
- Espasa M, González J, Alcaide F, i cols.** Use of Real time PCR for direct detection in clinical samples of genetic polymorphism causing resistance to isoniazid and rifampicin in *Mycobacterium tuberculosis*. XII European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease. Milano, Italia. *Clin Microbiol Infect* **2002**; 8 (suppl.1):15.
- Farga V.** The origins of DOTS. *Int J Tuberc Lung Dis* **1999**;3:175-176.
- Fauci AS, Dale DC, Balow JE.** Glucocorticosteroid therapy: Mechanisms of action and clinical considerations. *Ann Intern Med* **1976**;84: 304.
- Feld R, Bodey GP, Groschel D.** Mycobacteriosis in patients with malignant disease. *Arch Intern Med* **1976**;136:67-70.
- Fennelly KP.** The role of mabs in preventing nosocomial of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* **1998**;2(9 Suppl1):S103-109.
- Fenton MJ & Vermeulen MW.** Immunopathology of tuberculosis: Role of macrophages and monocytes. *Infect Immun* **1996**;64(3):683-690.
- Ferebee SH.** Controlled chemoprophylaxis trials in tuberculosis. A general review. *Adv Tuberc Res* **1969**;17:28-106.
- Fillioli I, Driscoll JR, van Soolingen D, i cols.** Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotyping. *Emerg Infect Dis* **2002**;8:1347-1349.
- Flynn JL & Chan J.** Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* **2001**;19:93-129.
- Frampton MW.** An outbreak of tuberculosis among hospital personnel caring for a patient with a skin ulcer. *Ann Intern Med* **1992**;117:312-313.
- French AL, Welbel SF, Dietrich SE, i cols.** Use of DNA fingerprinting to assess tuberculosis infection control. *Ann Intern Med* **1998**; 129:856-861.
- Frieden TR, Sherman LF, Maw KL, i cols.** A multi-institutional outbreak of highly drug-resistant tuberculosis. *JAMA* **1996**;276:1229-1235.
- Friedman CR, Stoeckle MY, Johnson WD, Riley LW Jr.** Double-repetitive-element PCR method for subtyping *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Clin Microbiol* **1995**;33:1383-1384.
- Frothingham R, Meeker-O'Connell WA.** Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* **1998**;144:1189-1196.



## G

- García L**, Alonso-Sanz M, Rebollo MJ, ercero JC, Chaves F. Mutations in the *rpoB* gene of rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Spain and their rapid detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* **2001**; 39:1813-1818.
- García San Miguel J & Agustí-Vidal A**. Tuberculosis. A: Doyma edicions. Medicina Interna Vol. II. **1992**;2297-2305.
- García-Quintanilla A**, García L, Tudó G, Navarro M, González J, Jiménez de Anta MT. A single-tube balanced heminested PCR for detecting *Mycobacterium tuberculosis* in smear-negative samples. *J Clin Microbiol* **2000**;38:1166-1169.
- García-Quintanilla A**, González-Martín J, Tudó G, Espasa M, Jiménez de Anta MT. Simultaneous identification of *Mycobacterium* genus and *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples by 5'-exonuclease fluorogenic PCR. *J Clin Microbiol* **2002**;40:4646-4651.
- García de Viedma D**, Martín M, Hernangómez S, Díaz M, Ruiz Serrano MJ, Alcalá L, Bouza E. Reinfection plays a role in a population whose clinical/epidemiological characteristics do not favour reinfection. *Arch Intern Med* **2002a**;162:1873-1879.
- García de Viedma D**, Díaz Infeantes MS, Lasala F, Chaves F, Alcalá L, Bouza E. New real time PCR able to detect in a single tube multiple rifampin resistance mutations and high level isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **2002b**;40:988-995.
- Garza E**, Guerreron M, Tijerina R, Viader J. Determination of drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* through mycolic acid analysis. *J Clin Microbiol* **1997**;35:1287-1289.
- Genewein A**, Telenti A, Bernasconi C, i cols. Molecular approach to identifying route of transmission of tuberculosis in the community. *Lancet* **1993**;342:841-844.
- GETRM: Grupo de Estudio de Tuberculosis Resistente en Madrid**. Peña JM y Ortega A, coordinadores. Estudio transversal multihospitalario de tuberculosis y resistencias en Madrid (octubre de 1993-abril de 1994). *Med Clin (Barc)* **1996**; 106:1-6.
- van Geuns HA**, Meijer J, Styblo K. Results of contact examination in Rotterdam, 1967-1969. *Bull Int Union Tuberc* **1975**;50:107-121.
- Glynn JR**, Bauer J, de Boer AS, Borgdorff MW, Fine PEM, Godfrey-Fausset P, Vynnycky E. Interpreting DNA fingerprinting clusters of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* **1999**; 3(12):1055-1060.
- Glynn JR**, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, van Soolingen D. World occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis* **2002**; 8:843-849.
- Godfrey-Faussett P & Stoker NG**. Aspects of tuberculosis in Africa. 3. Genetic fingerprinting for clues to the pathogenesis of tuberculosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1992**;86: 472-475.
- Godfrey-Faussett P**, Sonnenberg P, Shearer SC, Bruce MC, Mee C, Morris L, Murray J. Tuberculosis control and molecular epidemiology in a South Africa gold-mining community. *Lancet* **2000**;356:1066-1071.
- Gokce G**, Kilicarslan H, Ayan S, Tas F, Akar R, Kaya K, Gultekin EY. Genitourinary tuberculosis: a review of 174 cases. *Scand J Infect Dis* **2002**;34:338-340.
- Goldfeld AE**, Delgado JC, Thim S, i cols. Association of an HLA-DQ allele with clinical tuberculosis. *JAMA* **1998**;279:226-228.
- Goletti D**, Weissman D, Jackson RW, i cols. Effect of *Mycobacterium tuberculosis* on HIV replication. Role of immune activation. *J Immunol* **1996**;157:1271-1278.
- Golub JE**, Cronin WA, Obasanjo O, i cols. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* through casual contact with an infectious case. *Arch Intern Med* **2001**;161:2254-2258.
- González J**, Tudó G, Gómez J, García A, Navarro M, Jiménez de Anta MT. Use of the microscopic morphology in smears prepared from radiometric cultures for presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium avium* complex,

*Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium xenopi*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1998**; 17:593-600.

**Gordon AH**, D'Arcy Hart P, Young MR. Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature* **1980**;286: 79-80.

**Goren MB**, D'Arcy Hart P, Young MR, Armstrong JA. Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **1976**;73:2510-2514.

**Gottesdiener KM**. Transplanted infectious donor to host transmission with the allograft. *Ann Intern Med* **1989**;110:1001-1016.

**Goulding J**, Stanley J, Saunders N, Arnold C. Genome sequence based fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **2000**;38:1121-1126.

**Groenen PM**, van Bunschoten AE, van Soolingen D, van Emden JD. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *M.tuberculosis*, application for strain differentiation by a novel method. *Mol Microbiol* **1993**;10:1057-1065.

**Gruft H**, Johnson R, Claflin R, Lodeer A. Phage-typing and drug-resistance patterns as tools in mycobacterial epidemiology. *Am Rev Respir Dis* **1984**;130:96-97.

**Grzybowski S**, Banett GD, Styblo K. Contacts of cases of active pulmonary tuberculosis. *Bull Int Union Tuberc* **1975**;50:107-121.

**Gunnels JJ**, Bates JH, Swindoll H. Infectivity of sputum-positive tuberculous patients on chemotherapy. *Am Rev Respir Dis* **1974**; 109:323-330.

**Gutiérrez M**, Vincent V, Aubert D, i cols. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France and surrounding area. *J Clin Microbiol* **1998**; 36:486-492.

## H

**Haas F & Haas SS**. The origins of *Mycobacterium tuberculosis* and the notion of its contagiousness. A: Rom WN & Gary SM

editors. Tuberculosis. Boston: Little, Brown and company **1996**;3-19.

**Haas WH**, Butler WR, Woodley CL, Crawford JT. Mixed-linker polymerase chain reaction: a new method for rapid fingerprinting of isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* **1993**;31:1293-1298.

**Haas WH**, Schilke K, Brand J, i cols. Molecular analysis of *katG* gene mutations in strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. *Antimicrob Agents Chemother* **1997**; 41:1601-1603.

**Haas WH**, Engelmann G, Amthor B, i cols., Transmission dynamics of tuberculosis in a high-incidence country: prospective analysis by PCR DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* **1999**;37:3975-3979.

**Heiffets L**. Drug susceptibility test in the management of chemotherapy of tuberculosis. A: CRC Press Inc. Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections. Boca Raton, Florida **1991**;90-121.

**Heldwein KA & Fenton MJ**. The role of toll-like receptors in immunity against mycobacterial infection. *Microbes Infect* **2002**;4:937-944.

**Hermans PWM**, van Soolingen D, Bik EM, Haas PEW, Dale JW, van Embden JDA. The insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect Immun* **1991**;59:2695-2705.

**Hermans PW**, Messadi F, Guebrexabher H, i cols. Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia, and The Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. *J Infect Dis* **1995**;171:1504-1513.

**Hinshaw HC & Feldman WH**. Streptomycin in the treatment of clinical tuberculosis; a preliminary report. *Proc Staff Meet Mayo Clin* **1945**;20:313-318.

**HKCS/BMRC: Hong Kong Chest Service/BMR Council**. Controlled trial of 6-month and 8-month regimens in the treatment of pulmonary tuberculosis: The results up to 24 months. *Tubercle* **1979**; 60:201-210.

**HKCS/BMRC: Hong Kong Chest Service/BMR Council.** Controlled trial of 4 three-times weekly regimens and a daily regimen all given for 6 months for pulmonary tuberculosis. Second report: The results up to 24 months. *Tubercle* **1982**;63:89-98.

**Hobby GL, Holman AP, Iseman MD, Jones J.** Enumeration of tubercle bacilli in sputum of patients with pulmonary tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* **1973**;4:94-104.

**Holmes CB, Hausler H, Nunn P.** A review of sex differences in the epidemiology of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* **1998**; 2:96-104.

**Houk VN, Kent DC, Baker JH, Sorensen K, Hanzel GD.** The Byrd study. In-depth analysis of a micro-outbreak of tuberculosis in a closed environment. *Arch Environ Health* **1968**;16:4-6.

**de la Hoz R.** Tuberculosis and Silicosis. A: Rom WN & Gary SM editors. Tuberculosis. Boston: Little, Brown and company **1996**; 525-530.

## I

**Ijaz K, Yang Z, Matthews S, Bates JH, Caves M.** *Mycobacterium tuberculosis* transmission between cluster members with similar fingerprint patterns. *Emerg Infect Dis* **2002**; 8:1257-1259.

**IUAT: International Union Against Tuberculosis Committee on Prophylaxis.** Efficacy of various durations of isoniazid preventive therapy for tuberculosis: five years of follow-up in the IUAT trial. *Bull World Health Organ* **1982**;60:555-564.

## J

**Jansà JM, Serrano J, Caylà JA, Vidal R, Ocaña I, Español T.** Influence of the human immunodeficiency virus in the incidence of tuberculosis in a cohort of intravenous drug users: effectiveness of antituberculosis chemoprophylaxis. *Int J Tuberc Lung Dis* **1998**;2:140-146.

**Jasmer RM, Ponce de Leon A, Hopewell PC, i cols.** Tuberculosis in Mexican-born persons in

San Francisco: reactivation, acquired infection and transmission. *Int J Tuberc Lung Dis* **1997**;1:536-541.

**Jasmer RM, Hahn JA, Small PM, i cols.** A molecular epidemiologic analysis of tuberculosis trends in San Francisco, 1991-1997. *Ann Intern Med* **1999**;130:971-978.

**Jasmer RM & Daley CL.** Rifampin and pyrazinamide for treatment of latent tuberculosis infection. Is it safe?. *Am J Respir Crit Care Med* **2003**;167:809-812.

**Jereb JA, Burwen DR, Dooley SW, i cols.** Nosocomial outbreak of tuberculosis in a renal transplant unit: application of a new technique for restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Infect Dis* **1993**;168: 1219-1224.

**Jindani A, Aber VR, Edwards EA, Mitchison DA.** The early bacterial activity of drugs in patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* **1980**;121:939-949.

## K

**Kamat SR, Dawson JJY, Devadatta S, i cols.** A controlled study of the influence of segregation of tuberculous patients for one year on the attack rate of tuberculosis in a 5-year period in close family contacts in South India. *Bull World Health Organ* **1966**;34: 517-532.

**Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, i cols.** Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* **1997**;35:907-914.

**Kaplan MH, Armstrong D, Rosen P.** Tuberculosis complicating neoplastic disease. *Cancer* **1974**;33:850-858.

**Kapur V, Whittam TS, Musser JM.** Is *Mycobacterium tuberculosis* 15000 years old? *J infect Dis* **1994**;170:1348-1349.

**Kenyon TA, Valway SE, Ihke WW, Onorato IM, Castro KG.** Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* during a long airplane flight. *N Engl J Med* **1996**; 334:933-938.

- Kirk SM**, Schell RF, Moore AV, Callister SM, Mazurek GH. Flow cytometric testing of susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to ethambutol, isoniazid and rifampin in 24 hours. *J Clin Microbiol* **1998**;36:1568-1573.
- Kirscher P**, Springer B, Vogel U, i cols. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of 2-year experience in a clinical laboratory. *J Clin Microbiol* **1993**;31:2882-2889.
- Kline SE**, Hedemark LL, Davies SF. Outbreak of tuberculosis among regular patrons of a neighbourhood bar. *N Engl J Med* **1995**;333:222-227.
- Koziel H & Koziel MJ**. Pulmonary complications of diabetes mellitus. *Infect Dis Clin North Am* **1995**;9:65-96.
- Krasnow I**, Wayne LG. Comparison of methods for tuberculosis bacteriology. *Appl Microbiol* **1969**;18:915-917.
- Kremer K**, van Soolingen D, Frothingham R, i cols. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* **1999**;37:2607-2618.
- Kruuner A**, Hoffner SE, Sillastus H, i cols. Spread of drug resistant pulmonary tuberculosis in Estonia. *J Clin Microbiol* **2001**;39:3339-3345.
- Kruuner A**, Pehme L, Ghebremichael S, i cols. Use of molecular techniques to distinguish between treatment failure and exogenous reinfection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Infect Dis* **2002**;35:146-155.
- Kubin M**, Riley LW, Havelkova M, Poltoratskaia N, Kocova A. Molecular epidemiology of tuberculosis in Prague: analysis by restriction fragment length polymorphism. *Int J Infect Dis* **1998**;2:155-158.
- L**
- Lalvani A**, Brookes R, Wilkinson RJ, i cols. Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **1998**;95:270-275.
- Lawn SD**, Frimpong EH, Al-Gusein H, Acheampong JW, Uttley AH, Butcher PD, Griffin GE. Pulmonary tuberculosis in Kumasi, Ghana: presentation, drug resistance, molecular epidemiology and outcome of treatment. *West Afr J Med* **2001**;20(2):92-97.
- Lawn SD**, Butera ST, Shinnick TM. Tuberculosis unleashed: the impact of human immunodeficiency virus infection on the host granulomatous response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect* **2002**;4:635-646.
- Lee AS**, Teo AS, Wong SY. Novel mutations in *ndh* in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**;45:2157-2159.
- Lehmann KB & Neumann R**. Atlas und Grundriss der bakteriologie und lehrbuch der speziellen bakteriologische diagnostik. JF. Lehmann, Munich, **1896**.
- Lemaître N**, Sougakoff W, Truffot-Pernot C, i cols. Use of DNA fingerprinting for primary surveillance of nosocomial tuberculosis in a large urban hospital: detection of outbreaks in homeless people and migrant workers. *Int J Tuberc Lung Dis* **1998**;2:390-396.
- Lemaître N**, Sougakoff W, Truffot-Pernot C, Jarlier V. Characterization of new mutations in pyrazinamide resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* and identification of conserved regions important for the catalytic activity of the pyrazinamidase *pncA*. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**;43:1761-1763.
- Levy H**, Feldman C, Sancho H van der Meulen H, Kallenbach J, Koornhof H. A reevaluation of sputum microscopy and culture in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Chest* **1989**;95:1193-1197.
- Li Z**, Kelley C, Collins F, Rouse D, Morris S. Expression of *katG* in *Mycobacterium tuberculosis* is associated with its growth and persistence in mice and guinea pigs. *J Infect Dis* **1998**;177:1030-1035.
- Lichtenstein I & MacGregor RR**. Mycobacterial infections in renal transplant recipients: report of five cases and review of the literature. *Rev Infect Dis* **1983**;5:216-226.



- Lockman S**, Sheppard JD, Braden CR, i cols. Molecular and conventional epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Botswana: a population-based prospective study of 301 pulmonary tuberculosis patients. *J Clin Microbiol* **2001**; 39:1042-1047.
- Lonca J**, Manterola JM, Alcaide F, i cols. The relationship between the isoniazid resistant molecular mechanisms with the minimum inhibitory concentration and the catalase activity in *Mycobacterium tuberculosis*. XII European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Milano, Itàlia. *Clin Microbiol Infect* **2002**; 8 (suppl.1):95.
- Loudon RG & Roberts RM**. Droplet expulsion from the respiratory tract. *Am Rev Respir Dis* **1967**;95:435-442.
- Loudon RG & Roberts RM**. Singing and the dissemination of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* **1968**;98:297-300.
- Loudon RG & Spohn SK**. Cough frequency and infectivity in patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* **1969a**;99: 109-111.
- Loudon RG**, Burgarner LR, Coffman GK. Isoniazid and the survival of tubercle bacilli in airborne droplet nuclei. *Am Rev Respir Dis* **1969b**;100:172-176.
- Lucas SB & Nelson AM**. Pathogenesis of tuberculosis in human immunodeficiency virus-infected people. A: BR. Blomm editors AMS Press. Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control. Washington, DC. **1994**;503-513.
- Lundgren R**, Norman E, Asberg I. Tuberculosis infection transmitted at autopsy. *Tubercle* **1987**;68:147-150.
- Lurie MB**. Resistance to tuberculosis: experimental studies in native and acquired defensive mechanisms. Cambridge: Harvard University Press, **1964**.
- M**
- 
- Macallan DC**. Malnutrition in tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* **1999**; 34:153-157.
- March F**, Coll P, Costa R, Rodríguez P, Moreno C, Garrigó M, Prats G. Utilidad de DR, PGRS y spoligotyping en la tipificación de *Mycobacterium tuberculosis*. Comparación con IS6110. *Enf Inf Microbiol Clin* **1996**;14:160-166.
- March F**, Coll P, Guerrero RA, Busquets E, Caylà JA, Prats G, i cols. Predictors of tuberculosis transmission in prisons: an analysis using conventional and molecular methods. *AIDS* **2000**;14:525-35.
- de March P**. Resistencia a los fármacos antituberculosos en España. Evolución e influencia del virus de la inmunodeficiencia humana. *Med Clin (Barc)* **2001**;117:59-63.
- Martín-Casabona N**, Xairó-Mimó D, González T, Rosselló J, Arcalís L. Rapid method for test susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* by using DNA probes. *J Clin Microbiol* **1997**;35:2521-2525.
- Martín-Casabona N**, Alcaide F, Coll P, González J, Manterola JM, Savadó M, Caylà JA. Farmacoresistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. Estudio multicéntrico en el área de Barcelona. *Med Clin (Barc)* **2000**; 115: 493-498.
- Marttila HJ**, Soini H, Eerola E, i cols. A Ser315Thr substitution in *katG* is predominant in genetically heterogeneous multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates originating from the St.Petersburg area in Russia. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**;42:2443-2445.
- Mazars E**, Lesjean S, Banuls AL, i cols. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**;98:1901-1906.
- McAdam RA**, Hermans PWH, Van Soolingen D, Zainuddin ZF, Catty D, Van Embden JDA, Dale JW. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. *Mol Microbiol* **1990**;4:1607-1613.
- McClure WR & Cech CL**. On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. *J Biol Chem* **1978**;253:8949-8956.
- McDonough KA**, Kress Y, Bloom BR. Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infect Immun* **1993**; 61: 2763-2773.

- McHugh TD & Gillespie SH.** Nonrandom association of IS6110 and *Mycobacterium tuberculosis*: implications for molecular epidemiological studies. *J Clin Microbiol* **1998**;36:1410-1413.
- Meier A, Sander P, Schaper KJ, Scholz M, Bottger EC.** Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotyping resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **1996**;40:2452-2454.
- Mellencamp MA & Jerrells TR.** Effects of ethanol consumption on susceptibility to pulmonary and gastrointestinal infections. *Alcohol Clin Exp Res* **1996**;20(suppl): 192A-195A.
- Menzies D.** Interpretation of repeated tuberculin test. *Am J Respir Crit Care Med* **1991**; 159:15-21.
- Middlebrook G & Cohn ML.** Some observations on the pathogenicity of isoniazid-resistant variants of the tubercle bacilli. *Science* **1953**;118:297-299.
- Middlebrook G.** INH resistance and catalase activity of the tubercle bacilli. *Am Rev Tuberc* **1954**;69:471-472.
- Mikhailovich V, Lapa S, Gryadunov D, i cols.** Identification of rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by hybridisation, PCR, and ligase detection reaction on oligonucleotide microchips. *J Clin Microbiol* **2001**;39:2531-2540.
- Mitchison DA.** The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. *Tubercle* **1985**;66:219-225.
- Mitchison DA & Sbarbaro J.** The origins of DOT. *Int J Tuberc Lung Dis* **1998**;2:863-865.
- Mole RJ & Maskell TW.** Phage as diagnostic- the use of phage in TB diagnosis. *J Chem Technol Biotechnol* **2001**;76:683-688.
- Morris S, Bai GH, Suffly P, i cols.** Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* **1995**;171:954-960.
- Moro M, Salamina G, Gori A, i cols.** Two-year population-based molecular epidemiological study of tuberculosis transmission in the metropolitan area of Milan, Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2002**;21:114-122.
- Murray MB & Alland DA.** Methodological problems in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Am J Epidemiol* **2002a**;155: 565-571.
- Murray MB.** Determinants of cluster distribution in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002b**; 99:1538-1543.

## N

**Narayanan S, Das S, Garg R, Hari L, Rao VB, Friden TR, Narayanan PR.** Molecular epidemiology of tuberculosis in a rural area of high prevalence in South India: implications for disease control and prevention. *J Clin Microbiol* **2002**;40: 4785-4788.

**Nardell EA, Keegan J, Cheney SA, Etkind SC.** Airborne infection: Theoretical limits of protection achievable by building ventilation. *Am Rev Respir Dis* **1991**;144: 302-306.

## O

**OMS: Organització Mundial de la Salut.** ([www.who.int/](http://www.who.int/)). Tuberculosis, a global emergency: WHO report on the TB epidemic. Geneva, Switzerland, WHO **1994**.

**OMS: Organització Mundial de la Salut.** World Health Organization. Global Tuberculosis Programme. TB/HIV: A clinical manual, **1996**. Geneva, Switzerland, WHO/TB/1996.200.

**OMS/UICTMR: Organització Mundial de la Salut/Unió Internacional Contra la Tuberculosi i Malalties Respiratòries** ([www.uiatld.org](http://www.uiatld.org)). Antituberculosis drug resistance in the world. Report nº 1. The WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. **1997**. Geneva, Switzerland, WHO/TB/1997. 229.

**OMS.** Laboratory services in tuberculosis control. Edition I. Geneva, Switzerland, WHO **1998**.

- OMS.** Guidelines for prevention of tuberculosis in health care facilities in resource-limited settings, **1999a**. Geneva, Switzerland, WHO/CDS/TB/1999.269.
- OMS.** What is DOTS? A guide to understanding the WHO-recommended TB control strategy known as DOTS, **1999b**. Geneva, Switzerland, WHO/CDS/CPC/TB/1999.270.
- OMS/UICTMR.** Organització Mundial de la Salut /Unió Internacional Contra la Tuberculosi i Malalties Respiratòries. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report nº 2. Prevalence and Trends. The WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance, **2000**. Geneva, Switzerland, WHO/CDS/TB/2000.278.
- OMS.** Tuberculosis control in prisons. A manual for programme managers, **2001**. Geneva, Switzerland, WHO/CDS/TB/2001.281.
- OMS.** Treatment of tuberculosis. Guidelines for national programmes, **2003a**. Geneva, Switzerland, WHO/CDS/TB/2003.313.
- OMS.** WHO Report 2003. Global Tuberculosis Control. Surveillance, planning, financing, **2003b**. Geneva, Switzerland, WHO/CDS/TB/2003.316.
- OMS.** Procurement manual for the DOTS-plus projects approved by the green light committee, **2003c**. Geneva, Switzerland, WHO/HTM/TB/2003.328.
- OMS.** Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. **2003d**. Geneva, Switzerland, WHO/CDS/TB/2003.320.
- ONUSIDA/OMS** ([www.unaids.org](http://www.unaids.org)). Programa conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA. Resumen mundial de la epidemia de VIH/SIDA **2002**. ONUSIDA/2002.46S.
- Ordway DJ,** Sonnenberg MG, Donahue SA, Belisle JT, Orme IM. Drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* exhibit a range of virulence for mice. *Infect Immun* **1995**; 63:741-743.
- Otal I,** Samper S, Asensio MP, Victoria MA, Rubio MC, Gómez-Lus R, Martín C. Use of a PCR method based on IS6110 polymorphism for typing *Mycobacterium tuberculosis* strains from BACTEC cultures. *J Clin Microbiol* **1997**;35:273-277.
- Patel S,** Wale S, Saunders N. Hemi-nested inverse PCR for IS6110 fingerprinting of *M.tuberculosis* strains. *J Clin Microbiol* **1996**; 34:1686-1690.
- Parrish NM,** Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* **1998**;6:107-112.
- Park Young-Kil,** Gill-Han Bai, Sang-Jae Kim. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from countries in the Western Pacific Region. *J Clin Microbiol* **2000**;38:191-197.
- Pearson NL,** Jereb JA, Frieden TR, i cols. Nosocomial transmission of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. A risk to patients and health care workers. *Am Intern Med* **1992**;117:191-196.
- Pena MJ,** Caminero JA, Campos-Herrero MI, I cols. Epidemiology of tuberculosis on Gran Canaria: a 4 year population study using traditional and molecular approaches. *Thorax* **2003**;58:618-622.
- di Perri G,** Cruciani M, Danzi MC, i cols. Nosocomial epidemic of active tuberculosis among HIV-infected patients. *Lancet* **1989**; 2:1502-1504.
- Pfyffer GE,** Strässle, Brändli O, Shang H. Three episodes of tuberculosis-To multidrug resistance and back to susceptibility. *Clin Infect Dis* **1998**;26:219-220.
- Picard B.** Molecular epidemiology of large bacterial endemics in sub-Saharan Africa. *Bull Soc Pathol Exot* **2000**;93:219-223.
- Plikaytis BB,** Crawford JT, Woodley CL, Butler WR, Eisenach KD, Cave MD, Shinnick TM. Rapid, amplification-based fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **1993**;139 :1537-1542.
- Porcelli SA & Modlin RL.** The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol* **1999**;17:297-329.

**Prod'hom G**, Guilhot C, Gutierrez MC i cols. Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by ligation-mediated PCR fingerprint analysis. *J Clin Microbiol* **1997**; 35:3331-3334.

## R

- Ramakrishnan CV**, Andrews RH, Devadatta S, i cols. Influence of segregation of tuberculous patients for one year on the attack rate of tuberculosis in a 2-year period in close family contacts in South India. *Bull World Health Organ* **1961**;24:129-148.
- Ramaswamy S & Musser JM**. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. 1998 update. *Tubercle Lung Dis* **1998**; 79:3-29.
- Ramaswamy S**, Amin A, Göksel S, i cols. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**;44:326-336.
- Ratcliffe HL & Palladino VS**. Tuberculosis induced by droplet nuclei infection. Initial homogenous response of small mammals (rats, mice, guinea pigs, and hamsters) to human and to bovine bacilli, and the rate and pattern of tubercle development. *J Exp Med* **1953**;97:61-68.
- Ravins M**, Bercovier H, Chemtob D, Fishman Y, Rahav G. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* infection in Israel. *J Clin Microbiol* **2001**;39:1175-1177.
- Reichman LB**, Felton ChP, Edsall JR. Drug dependence: a possible new risk factor for tuberculosis disease. *Arch Intern Med* **1979**; 139:337-339.
- van Rie A**, Warren R, Richardson M, i cols. Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Med* **1999a**;341:1174-1179.
- van Rie A**, Warren RM, Beyers N, i cols. Transmission of a multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain resembling "strain W" among noninstitutionalized, human immunodeficiency virus seronegative patients. *J Infect Dis* **1999b**;180:1608-1615.
- van Rie A**, Warren R, Richardson M, i cols. Classification of drug-resistant tuberculosis in an epidemic area. *Lancet* **2000**;356:22-25.
- Rieder HL**, Cauthern G, Comstock G, Snider DE. Epidemiology of tuberculosis in the United States. *Epidem Rev* **1989**;11:79-98.
- Riley RL**, Wills WF, Mill CM, i cols. Air hygiene in tuberculosis: Quantitative studies of infectivity and control in a pilot ward. *Am Rev Tub Pulm Dis* **1957**;75:420-431.
- Riley RL**, Mills CC, Nyka W, i cols. Aerial dissemination of tuberculosis. A two-year study of contagion in a tuberculosis ward. *Am J Hyg* **1959**;70:185-196.
- Riley RL & O'Grady FO**. Airborne Infection: Transmission and control, Macmillan Co., New York, **1961**: p.180.
- Riley RL**, Mills CC, O'Grady FO, Sultan LU, Wittstadt F, Shivpuri DN. Infectiousness of air from a tuberculosis ward: ultraviolet irradiation of infected air-comparative infectiousness of different patients. *Am Rev Respir Dis* **1962**; 85:511-525.
- Riley RL & Moodie AS**. Infectivity of patients with pulmonary tuberculosis in inner-city homes. *Am Rev Respir Dis* **1974**;110:810-812.
- Riley RL & Nardell EA**. Clearing the air. *Am Rev Respir Dis* **1989**;139:1286-1294.
- Rinder H**, Mieskes KT, Löscher T. Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* **2001**; 5:339-345.
- Rossau R**, Traore H, de Beenhouwer H, Mijs W, Jannes G, De Rijk P, Portaels F. Evaluation of the INNO-LIPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* **1997**;41: 2093-2098.
- Rosner D & Markowitz G**. Consumption, silicosis and the construction of industrial disease. *Yale J Biol Med* **1991**;64:481-498.



- Ross BC**, Raios K, Jackson K, Dwyer B. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J Clin Microbiol* **1992**;30 :942-946.
- Rozwarski DA**, Grant GA, Barton DHR, i cols. Modification of the NADH of isoniazid target (*inhA*) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **1998**;279:98-102.
- Rufi G**, García Rodríguez JA, Solera J, Moreno S. Coordinador: Aguado JM. Protocolos Clínicos de la SEIMC: Sociedad Española de Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica ([www.seimc.org](http://www.seimc.org)). A: Tuberculosis. **2000**.
- Rullan JV**, Herrera D, Cano R, i cols. Nosocomial transmission of multi drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Spain. *Emerging Infect Dis* **1996**;2:125-129.
- 
- S**
- 
- Sacks JJ**, Brenner ER, Breeden DC, Anders HM, Parker RL. Epidemiology of a tuberculosis outbreak in a South Carolina junior high school. *Am J Public Health* **1985**;75:361-365.
- Safi H**, Aznar J, Palomares JC. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated during a 3-year period (1993 to 1995) in Seville. *J Clin Microbiol* **1997**;35:2472-2476.
- Sahadevan R**, Narayanan S, Paramisivan CN, Prabhakar R, Narayanan PR. Restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, India, by use of direct-repeat probe. *J Clin Microbiol* **1995**;33:3037-3039.
- Samper S**, Iglesias MJ, Rabanaque MJ, i cols. The molecular epidemiology of tuberculosis in Zaragoza, Spain: a retrospective epidemiological study in 1993. *Int J Tuberc Lung Dis* **1997**;2:281-287.
- Saukkonen JJ**, Bazydlo B, Thomas M, Strieter RM, Keane J, Kornfeld H.  $\beta$ -Chemokines are induced by *Mycobacterium tuberculosis* and inhibit its growth. *Infect Immun* **2002**;70:1684-1693.
- Schluger NW & Rom WN**. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **1998**;157:679-691.
- Schwoebel V**, Lambregts-van Weezenbeek CSB, Moro ML, Drobniowski F, Hoffner SE, Raviglione MC, Rieder HL. Standardization of antituberculosis drug resistance surveillance in Europe. *Eur Respir J* **2000**;15:364-371.
- Sebek M**. DNA fingerprinting and contact investigation. *Int J Tuberc Lung Dis* **2000**;4 (2 Suppl1):S45-S48.
- Selwyn PA**, Hartel VA, Lewis EE, i cols. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* **1989**;320:545-550.
- Selwyn PA**, Sckell BM, Alcabes P, Friedland GH, Klein RS, and Schoenbaum EE. High risk of active tuberculosis in HIV-infected drug users with cutaneous anergy. *JAMA* **1992**;268:504-509.
- Shafer RW**, Singh SP, Larkin C, Small PM. Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in an immunocompetent patient. *Tuberc Lung Dis* **1995**;76: 575-577.
- Sharma MK**, Al-Azem A, Wolfe J, Hershfield E, Kabani A. Identification of a predominant isolate of *Mycobacterium tuberculosis* using molecular and clinical epidemiology tools and *in vitro* cytokine responses. *BMC infectious Diseases* **2003**;3:3-13.
- Shaw JB & Wynn-Williams N**. Infectivity of pulmonary tuberculosis in relation to sputum status. *Am Rev Tuberc* **1954**;69: 724-732.
- Sherman DR**, Mdluli K, Hickey MJ, i cols. Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **1996**;272:1641-1643.
- Shinnick TM & Good RC**. Mycobacterial Taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1994**;13:884-901.
- Siddiqi SH**, Libonati JP, Middlebrook G. Evaluation of rapid radiometric method for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **1981**;13:908-912.
- Siddiqi SH**, Hawkins JE, Iaszlo A. Interlaboratory drug susceptibility testing *Mycobacterium*

- tuberculosis* by a radiometric procedure and two conventional methods. *J Clin Microbiol* **1985**;22:919-923.
- Small PM**, Shafer RW, Hopewell PC, i cols. Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. *N Engl J Med* **1993**;328:1137-1144.
- Small PM**, Hopewell PC, Singh SP, i cols. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. *N Engl J Med* **1994**;330:1703-1709.
- Snider DE Jr.** Jejunoileal bypass for obesity. A risk factor for tuberculosis. (Editorial). *Chest* **1982**;81:531-532.
- Snider DE Jr.** Pregnancy and tuberculosis. (Editorial). *Chest* **1984**; 86 (suppl):10s-3s.
- Snider DE Jr**, Kelly GD, Cauthen GM, Thompson NJ, Kilburn JO. Infection and disease among contacts of tuberculosis cases with drug-resistant and drug-susceptible bacilli. *Am Rev Respir Dis* **1985**;13:125-132.
- Solsona J**, Caylà JA, Verdú E, i cols. Molecular and conventional epidemiology of tuberculosis in an inner city district. The cooperative group for contact study of tuberculosis patients in Ciutat Vella. *Int J Tuberc Lung Dis* **2001**;5:724-731.
- Sonkin LS.** The role of particle size in experimental air-borne infection. *Am J Hyg* **1951**;53:337-354.
- van Soolingen D**, Hermans PWM, De Haas PEW, i cols. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: Evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* **1991**;29: 2578-2586.
- van Soolingen D**, De Haas PE, Hermans PW, Groenen PM, van Embden JD. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strains differentiation and epidemiology of *M. tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **1993**;31:1987-1995.
- van Soolingen D**, Qian L, de Haas PE, i cols. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol* **1995**;33:3234-3238.
- van Soolingen D**, Borgdorff MW, de Haas PE, i cols. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nation-wide study from 1993 through 1997. *J Infect Dis* **1999**; 180:726-736.
- van Soolingen D**, de Haas PEW, van Doorn HR, Kuijper E, Rinder H, Borgdorff MW. Mutations at amino acid position 315 of the *katG* gene associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in The Netherlands. *J Infect Dis* **2000**;182:1788-1790.
- Springer B**, Master S, Sander P, i cols. Silencing of oxidative stress response in *Mycobacterium tuberculosis*: expression patterns of *aphC* in virulent and avirulent strains and effect of *ahpC* inactivation. *Infect Immun* **2001**;69:5967-5973.
- Sreevatsan S**, Pan X, Stockbauer KE, i cols. Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrob Agents Chemother* **1996**;40:1024-1026.
- Sreevatsan S**, Pan X, Zhang Y, Kreiswirth B, Musser J. Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Antimicrob Agents Chemother* **1997**;41:636-640.
- Stenger S**, Mazzaccaro RJ, Uyemura K, i cols. An antimicrobial activity of cytolytic cells mediated by granulysin. *Science* **1998**; 282:121-125.
- Strachan DP**, Powell KJ, Thaker a, Millard FJC, Maxwell JD. Vegetarian diet as a risk factor for tuberculosis in immigrant south London Asians. *Thorax* **1995**;50:175-180.
- Strumpf IJ**, Tsang AY, Sayre JW. Reevaluation of sputum staining for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* **1979**;119:559-602.
- STS/BMRC: Singapore Tuberculosis Service/ BMR Council.** Long-term follow-up of a clinical trial of six-month and four-month regimens of chemotherapy in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* **1986**;133:779-783.

**Sultan LU**, Nyka W, Mills CC, O'Grady F, Wells WF, Riley RL. Tuberculosis disseminators: a study of the variability of aerial infectivity of tuberculosis patients. *Am Rev Respir Dis* **1960**;82:358.

**Supply P**, Magdalena J, Himpens S, Loch C. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Mol Microbiol* **1997**;26:991-1003.

**Supply P**, Lesjean S, Savine E, i cols. High-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* **2001**;39:3563-3571.

**Styblo K**. Epidemiology of tuberculosis. Selected papers. The Netherlands: *KNCV* **1991**;24:1-136.

## T

**Tan JS**, Canaday DH, Boom WH, Balaji KN, Schwander SK, Rich EA. Human alveolar T lymphocyte responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens: roles for CD4+ and CD8+ cytotoxic T cells and relative resistance of alveolar macrophages to lysis. *J Immunol* **2000**;159:290-297.

**Tabet SR**, Goldbaum GH, Hooton TH, i cols. Restriction fragment length polymorphism analysis detecting a community-based tuberculosis outbreak among persons infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* **1994**;169:189-192.

**TB/VIH**. Strategic framework to decrease the burden of TB/HIV. **2002**. WHO/CDS/TB/2002.296. WHO/HIV\_AIDS/2002.2.

**TB/VIH**. Interim policy on collaborative TB/HIV activities. Stop TB Department and Department of HIV/AIDS. **2004**. WHO/HTM/TB/2004.330. WHO/HTM/HIV/2004.1.

**Teixeira L**, Perkins MD, Johnson JL, i cols. Infection and disease among household contacts of patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* **2001**;5:321-328.

**Telenti A**, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger E, Bodmer T. Rapid identification of

Mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* **1993a**;31:175-178.

**Telenti A**, Imboden P, Marchesi F, i cols. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* **1993b**;341:647-650.

**Telenti A**, Imboden P, Marchesi F, Schmidheini T, Bodmer T. Direct, automated detection of rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism. *Antimicrob Agents Chemother* **1993c**;37:2054-2058.

**Telenti A**, Philipp W, Sreevatsan S, i cols. The *emb* operon, a unique gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nature Medicine* **1997a**;3:567-570.

**Telenti A**, Honoré N, Bernasconi C, i cols. Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a blind study at reference laboratory level. *J Clin Microbiol* **1997b**;35:719-723.

**Thierry D**, Brisson-Nöel A, Vincent-Lévy-Frébault VM, Nguyen S, Guedon J, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence IS6110 and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol* **1990**;28:2668-2673.

**Tisdall PA**, Roberts GD, Anhalt JP. Identification of clinical isolates of mycobacteria with gas-liquid chromatography alone. *J Clin Microbiol* **1979**;10:506-514.

**Toossi Z & Ellner JJ**. Host response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Biosci* **1998**;25:E133-E140.

**Torres MJ**, Criado A, Palomares JC, Aznar J. Use of real time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **2000**;38:3194-3199.

**Toungoussova OS**, Sandven P, Mariandyshv AO, Nizovtseva NI, Bjune G, Caugant DA. Spread of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype in the Archangel Oblast, Russia. *J Clin Microbiol* **2002**;40:1930-1937.

**Tousek J & Votruba R.** Rifampicin plus isoniazid, rifampicin plus PAS, and isoniazid plus PAS in the initial treatment of pulmonary tuberculosis. *Chemotherapy* **1974**;20:183-200.

**TRC: Tuberculosis Research Center.** Study of Chemotherapy regimens of 5 and 7 months' duration and the role of corticosteroids in the treatment of sputum-positive patients with pulmonary tuberculosis in South India. *Tubercle* **1983**;64:73-91.

**Tuset M.** Interacciones medicamentosas entre los antiretrovirales y los antiutberculosos. *Enf Emerg* **2000**;3:164-173.

## U

**UITB:** Unitat d'Investigació en Tuberculosi de Barcelona ([www.imsb.bcn.es/uitb](http://www.imsb.bcn.es/uitb)). Documento de consenso sobre el estudio de contactos en los pacientes tuberculosos. *Med Clin (Barc)* **1999**; 112:151-156.

**UITB:** Unitat d'Investigació en Tuberculosi de Barcelona. Documento de consenso sobre tratamientos directamente observados en tuberculosis. *Med Clin (Barc)* **2000**; 115:749-757.

**UICTMR: Unió Internacional Contra la Tuberculosi i Malalties Respiratòries.** ([www.ihatld.org](http://www.ihatld.org)). Antituberculosis regimens of chemotherapy. Recommendations from committee on treatment of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis* **1988**;63:6064.

**UICTMR: Unió Internacional Contra la Tuberculosi i Malalties Respiratòries.** Manejo de la tuberculosis. Guía para los países con escasos recursos económicos. *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, **2000**.

## V

**Valway SE, Richards SB, Kovacovich J, Greifinger RB, Crawford JT, Dooley SW.** Outbreak of multidrug resistant tuberculosis in New York state prison, 1991. *Am J Epidemiol* **1994**;140:113-122.

**Veen J.** Microepidemics of tuberculosis: the stone-in-the-pond principle. *Tubercle Lung Dis* **1992**;73:73-76.

**Verdú E, March F, Cortés P, i cols.** Molecular mechanism of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* from Barcelona. XII European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease. Milano, Itàlia. *Clin Microbiol Infect* **2002**; 8 (suppl.1): 94-95.

**Vidal R, Miravittles M, Caylà JA, Torrella M, Martín N, De Gracia J.** Estudio del contagio en 3071 contactos familiares de enfermos con tuberculosis. *Med Clin (Barc)* **1997**; 108:361-365.

**Visitin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM.** Regulation of toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* **2001**;166:249-255.

**Vukovic D, Rüsich-Gerdes S, Savic B, Niemann S.** Molecular epidemiology of pulmonary tuberculosis in Belgrade, Central Serbia. *J Clin Microbiol* **2003**;41:4372-4377.

**Vynnycky E, Nagelkerke N, Borgdorff MW, van Soolingen D, van Embden JDA.** The effect of age and study duration on the relationship between "clustering" of DNA fingerprinting patterns and the proportion of tuberculosis disease attributable to recent transmission. *Epidemiology and Infection* **2001**;126:43-62.

## W

**Warren RM, Richardson M, Sampson S i cols.** Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* with additional markers enhances accuracy in epidemiologic studies. *J Clin Microbiol* **1996**; 34:2219-2224.

**Warren RM, van der Spuy GD, Richardson M, Beyers N, Booysen C, Berh MA, van Helden PD.** Evolution of the IS6110-based restriction fragment length polymorphism pattern during the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **2002**;40: 1277-1282.

**Watson JM.** BCG – mass or selective vaccination? *J Hosp Infect* **1995**; 30 (Suppl): 508-513.



- Wayne LG.** Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1994**;13:908-914.
- Wells WF.** On air-borne infection. Study II. Droplets and droplet nuclei. *Am J Hyg* **1934**; 20:611-619.
- Wells WF & Lurie MB.** Experimental airborne disease: Quantitative natural respiratory contagion of tuberculosis. *Am J Hyg* **1941**; 34:21-40.
- Wells WF, Ratcliffe HL, Crumb C.** On the mechanism of droplet nuclei infection. *Am J Hyg* **1948**;47:11-28.
- Williams DL, Spring L, Gillis TP, Salfinger M, Persing DH.** Evaluation of a polymerase chain reaction-based universal heteroduplex generator assay for direct detection of rifampin susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. *Clin Infect Dis* **1998**;26:446-450.
- Willkinson D, Pillay M, Crump J, Lombard C, Davies GR, Sturm AW.** Molecular epidemiology and transmission dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in rural Africa. *Trop Med Int Health* **1997**;2:747-753.
- Willkinson RJ, Llewellyn M, Toossi Z, i cols.** Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphism on tuberculosis among Gujarati Assians in West London: a case-control study. *Lancet* **2000**;355:618-621.
- 
- Y**
- 
- Yamamura Y.** The pathogenesis of tuberculosis cavities. *Adv Tuberc Res* **1958**;9:13-37.
- Yang ZH, Mtoni I, Chonde M, i cols.** DNA fingerprinting and phenotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and HIV-seronegative patients in Tanzania. *J Clin Microbiol* **1995a**;33:1064-1069.
- Yang ZH, de Haas PE, Wachmann CH, van Soolingen D, van Embden J, Andersen AB.** Molecular epidemiology of tuberculosis in Denmark in 1992. *J Clin Microbiol* **1995b**; 33:2077-2081.
- Yates DM, Drobniewski AF, Wilson SM.** Evaluation of a rapid PCR-based epidemiological typing method for routine studies of *M. tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **2002**;40:712-714.
- Yeager H Jr, Lacy J, Smith LR, LeMaistre CA.** Quantitative studies of mycobacterial populations in sputum and saliva. *Am Rev Respir Dis* **1967**;95:998-1004.
- Yeh RW, Ponce de Leon A, Agasino CB, i cols.** Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA genotypes. *J Infect Dis* **1998**;177:1107-1111.
- Yu G, Hsieh C, Peng J.** Risk factors associated with the prevalence of pulmonary tuberculosis among sanitary workers in Shanghai. *Tubercle* **1988**;69:105-112.
- Yuen LKW, Ross BC, Jackson KM, Dwyer B.** Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from vietnamese patients by Southern blot hybridization. *J Clin microbiol* **1993**;31:1615-1618.
- Yuen KY, Chan CM, Chan KS, Yam WC, Ho PL, Chau PY.** IS6110 based amplotyping assay and RFLP fingerprinting of clinical isolates of *M. tuberculosis* *J Clin Microbiol* **1995**;48: 924-928.
- 
- Z**
- 
- Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole ST.** The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* **1992**;358:591-593.
- Zhang Y, Nakata K, Weiden M, Rom W.** *Mycobacterium tuberculosis* enhances HIV-1 replication by transcriptional activation at the long terminal repeat. *J Clin Invest* **1995**;95:2324-2331.
- Zhang M, Gong J, Yang Z, Samten B, Cave MD, Barnes PF.** Enhanced capacity of a widespread strain of *Mycobacterium tuberculosis* to grow in human macrophages. *J Infect Dis* **1999**;179 :1213-1217.