



Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Ciències
Departament de Genètica i de Microbiologia

Diagnòstic microbiològic de la tuberculosi i altres micobacteriosis a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau: 1995–2007



Tesi Doctoral
Montserrat Garrigó i Fullola
Sota la direcció del Dr. Pere Coll i Figa
Barcelona, 2009



Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Ciències
Departament de Genètica i de Microbiologia

**Diagnòstic microbiològic de la tuberculosi i altres
micobacteriosis a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau:
1995-2007**

Memòria presentada per

Montserrat Garrigó i Fullola

Per optar al grau de Doctora en Ciències Biològiques

Tesi doctoral realitzada sota la direcció del Dr. Pere Coll i Figa a l'Hospital
de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona.

Tesi doctoral adscrita al Departament de Genètica i de Microbiologia,
Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2009

Pere COLL I FIGA, Doctor en Medicina i Professor Titular del Departament de Genètica i de Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFICA:

Que la present tesi doctoral que porta per títol “Diagnòstic microbiològic de la tuberculosi i altres micobacteriosis a l’Hospital de la Santa Creu i Sant Pau: 1995–2007” presentada per Na Montserrat Garrigó i Fullola per optar al grau de Doctora en Ciències Biològiques, ha estat elaborada sota la meva direcció i compleix els requisits necessaris per a la seva tramitació i posterior defensa davant el tribunal corresponent.

Per tant, per tal que així consti i per als efectes oportuns, signo aquest certificat a Barcelona, 20 de Març de 2009.

Dr. Pere Coll i Figa

Al Norbert per fer-me sempre costat.

Als meus pares Joan i Margarida
per... tot.

A la Queralt i al Roc.

Agraïments

La Tesí. Escriure-la ha suposat anar enrere, força enrere. Fer l'exercíci de recuperar dades, resultat rere resultat, i també alhora, reviure a través del record moments personals importants. En aquest moment, ja amb tot el treball sobre la taula se'm fa difícil expressar en poques paraules i com caldria el que té de més personal la tesi, el profund agraïment a amics, companys i familiars que m'han acompanyat durant aquest llarg camí.

De forma oficial al Dr. Pere Coll, afectuosament al Pere. T'agraeixo moltíssim la confiança dipositada en mí, el consells, la perseverança, la paciència infinita. T'agraeixo no només l'esforç, sinó també la humanitat que has dipositat en aquest treball. Gràcies Pere.

Esmentar de forma particular a les meves companyes de la secció de Mícobacteris, la Carme Moreno i l'Elena García, sense el seu acurat treball, suport emocional i, sobretot, la seva amístat aquesta tesi no hauria arribat enlloc. Gràcies de tot cor.

També agrair als de "recerca", a la Paquíta, la Montse i el Michel el suport tècnic, el seu treball i les seves paraules d'ànim.

Agrair també a **tots** els companys del laboratori per tot el que hem compartit, jornades de feina amenitzades amb l'estoneta de l'esmorzar, amb els canvis de parers, rialles, i en alguns casos una amístat que, espero, durí per sempre.

Al Grup de Treball de Mícobacteris de Barcelona per permetre'm utilitzar alguns dels seus resultats.

Tot plegat no tindria cap sentit per a mí sense el suport i l'estíma dels meus pares, Joan i Margarida i de la meva germana Margot. Per la seva incondicionalitat, per guiar-me i recolzar-me en tot el que m'he proposat.

Moltíssimes gràcies a tu, Norbert. Per la teva paciència i comprensió. Per ser sempre allà on jo no he arribat durant tot aquest temps. I demanar disculpes als meus dos tresors, la Queralt i el Roc, que han crescut alhora que aquest treball i espero que algun dia arribin a entendre el perquè de les hores perdudes. Us prometo que a partir d'ara em desenganxo de l'ordinador.

“Succeeix aquí el que diuen els metges de la tisi, en un principi és fàcil de curar i difícil de reconèixer, però amb el temps, si no se l’ha identificat ni aplicat la medicina convenient, passa a ser fàcil de reconèixer i difícil de curar. El mateix succeeix amb els assumptes d’estat”

El Príncep

Nicolas Maquiavelo, 1513

Índex

1. Introducció	1
1.1 Gènere <i>Mycobacterium</i>	3
1.2 Diagnòstic de les infeccions per micobacteris	9
1.2.1 Mostres per l'estudi micobacteriològic	11
1.2.2 Descontaminació i Homogeneització	13
1.2.3 Examen directe	15
1.2.4 Detecció d'àcids nucleics directament en la mostra clínica	18
1.2.5. Aïllament per cultiu	23
1.2.6 Identificació dels micobacteris	26
1.2.6.1 Identificació fenotípica	26
1.2.6.2 Identificació per tècniques basades en la detecció d'àcids nucleics	27
1.2.7 Característiques dels fàrmacs antituberculosos. Estudis de sensibilitat	31
1.2.7.1 Fàrmacs antituberculosos	31
1.2.7.1.1 Fàrmacs de primera línia	32
1.2.7.1.2 Fàrmacs de segona línia	39
1.2.7.1.3 Noves molècules en estudi	45
1.2.7.2 Estudis de sensibilitat als fàrmacs antituberculosos	48
1.2.7.2.1 Estudis fenotípics	48
1.2.7.1.2 Detecció dels mecanismes moleculars de la resistència als antituberculosos	51
1.3 La tuberculosi	53
1.3.1 Situació global de la tuberculosi	55
1.3.2 Transmissió de la tuberculosi	57
1.3.2.1 Transmissió de les soques resistents als fàrmacs antituberculosos	58

1.3.2.2 Detecció de cadenes de transmissió	60
1.3.2.2.1 Estudi convencional de contactes	60
1.3.2.2.2 Epidemiologia molecular	62
1.3.2.2.2.1 Tècniques de tipificació molecular	65
1.3.3 Evolució del complex <i>M. tuberculosis</i>	73
1.3.4 Patogènia de la tuberculosi	79
1.3.5 Infecció tuberculosa latent	82
1.3.6 Tuberculosi activa	84
1.3.6.1 Diagnòstic clínic	84
1.3.6.1.1 Tuberculosi pulmonar	85
1.3.6.1.2 Tuberculosi extrapulmonar	88
1.3.6.2 Diagnòstic microbiològic	89
1.3.6.3 Diagnòstic serològic	89
1.3.6.4 Diagnòstic per la imatge	90
1.3.6.5 Diagnòstic anatomopatològic	91
1.3.7 Tractament de la tuberculosi	91
1.3.7.1 Bases bacteriològiques del tractament antituberculós.	91
1.3.7.2 Resistència als antituberculosos.	93
1.3.7.2.1 Programes de control. Estratègia DOTS i DOTS-plus	95
1.3.7.3 Pautes de tractament actuals	97
1.3.7.3.1 Tractament de la infecció tuberculosa latent	97
1.3.7.3.2 Tractament de la malaltia	98
2. Objectius	101

3. Material i mètodes	105
3.1 Població de referència	107
3.2 Digestió i descontaminació	109
3.3 Examen directe	110
3.4 Medis de cultiu, incubació i lectura	111
3.5 Detecció d'àcids nucleics directament en la mostra clínica	112
3.6 Identificació dels micobacteris	113
3.6.1 Identificació per sondes de hibridació	115
3.6.2 Estudi de velocitat, temperatura òptima de creixement i pigmentació	115
3.6.3 Anàlisi del polimorfisme dels fragments de restricció associats al gen <i>hsp65</i> (PCR-RFLP <i>hsp65</i>)	116
3.6.4 Anàlisi de les regions de diferenciació (RDs) a <i>M. tuberculosis</i> complex	121
3.6.5 Seqüenciació del gen que codifica per la 16s rRNA i per la <i>hsp65</i>	123
3.7 Estudis de sensibilitat a <i>M. tuberculosis</i> complex	124
3.7.1 Mètode radiomètric BACTEC 460TB®	124
3.7.1.1 Antibiograma als antituberculosos de primera línia	124
3.7.1.2 Antibiograma als antituberculosos de segona línia	125
3.7.1.3 CIM a la Isoniazida	127
3.7.2 Estudi de sensibilitat amb el sistema MBacT/ALERT® S.I.R.E KIT	128
3.7.3 Estudi de sensibilitat amb el sistema BACTEC MGIT 960®	129
3.8 Detecció dels mecanismes genètics associats a la resistència de la isoniazida, rifampicina, estreptomina i pirazinamida en soques prèviament aïllades en cultiu	130
3.9 Tipificació molecular del complex <i>M. tuberculosis</i> mitjançant la tècnica de l'oligonucleòtid separador (<i>Spoligotyping</i>)	132
3.10 Conservació de soques	134

4. Resultats i discussió	137
4.1 Mostres per malalt (estudis seriatos)	139
4.2 Espècies aïllades. Identificació	140
4.3 Distribució de les diferents espècies aïllades per localització anatòmica	146
4.4 <i>M. tuberculosis</i> complex. Període 1995–2007	149
4.5 Rendiment de l'examen directe	155
4.6 Aïllament per cultiu	160
4.6.1 Taxa de contaminació	160
4.6.2 Rendiment dels medis de cultiu	161
4.7 Detecció d'àcids nucleics de <i>M. tuberculosis</i> complex directament en la mostra clínica	166
4.8 Seguiment prospectiu de les resistències en malalts tuberculosos sense tractament previ i amb tractament previ als fàrmacs de primera línia	173
4.8.1 Resistència combinada	173
4.8.2 Resistència en casos nous	176
4.8.3 Resistència en pacients prèviament tractats	180
4.8.4 Tendències en els percentatges de resistència	182
4.9 Comparació del sistema MB/Bact ALERT i BACTEC MGIT 960 amb el sistema radiomètric BACTEC 460TB per l'estudi de la sensibilitat de <i>M. tuberculosis</i> a la INH, la RIF, l'ETB i l'STR	185
4.10 Avaluació del sistema MB/BacT per a l'estudi de sensibilitat a la PZA amb el sistema BACTEC 460TB com a sistema de referència	192
4.11 Estudi de resistència als fàrmacs de segona línia	194
4.12 Caracterització molecular dels mecanismes de resistència a la INH, RIF, STR i PZA	198
4.13 Estudi dels llinatges de les soques resistents aïllades a l'HSCiSP	201

5. Conclusions	205
6. Bibliografia	213

1. Introducció



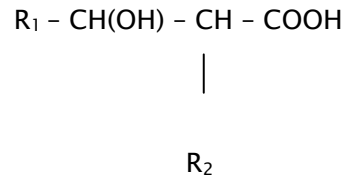
1.1 Gènere *Mycobacterium*

És l'únic gènere de la família *Mycobacteriaceae*, de l'ordre dels *Actinomycetales*. El gènere compren al voltant d'un centenar d'espècies, de les que només *M. tuberculosis* i *M. leprae* són patògens primaris. La resta de micobacteris poden comportar-se com a patògens oportunistes en pacients amb una malaltia de base, especialment els infectats pel virus de la immunodeficiència humana (HIV) (60).

La classificació dins del gènere s'ha realitzat tenint en compte propietats generals, objectivament comparables i, segons el contingut en GC% (GC>55%). Per a incloure un microorganisme al gènere *Mycobacterium*, segons el **Comitè Internacional de Bacteriologia Sistemàtica** (136), aquest ha d'acomplir tres criteris mínims:

- àcid-alcohol resistència: els micobacteris després de ser tenyits en calent per la fucsina fenicada de Ziehl o en fred per la fucsina fenicada de Kinyoun, o per l'auramina, retenen els colorants després de ser tractats per l'acció successiva o simultània d'un àcid i d'un alcohol. Aquesta propietat els la confereix els àcids micòlics de la paret
- contingut en GC% (GC=61–71%),
- presència d'àcids micòlics a nivell de la paret cel·lular (figura 1): àcids grassos de cadena llarga formada per 60–90 àtoms de carboni, alfa-ramificats i beta-hidroxilats, la seva piròlisi allibera èsters de 22 a 26 àtoms de carboni. Constitueixen la major part de la paret i són lligats al peptidoglicà pels arabinogalactans. Constitueixen una barrera hidròfoba al voltant del bacteri que els dóna una resistència als agents químics útils a l'hora de l'aïllament d'aquests gèrmens en un context plurimicrobià (mètodes de descontaminació). Algunes espècies del gènere *Mycobacterium* sintetitzen àcids micòlics portadors de radicals amb funcions oxigenades suplementàries: metoxil, cetona, epòxid o carboxílica (136).

figura 1: Fórmula general dels àcids micòlics, on R₂ és una cadena alquil (C_nH_{2n+1}). R₁ i R₂ són cadenes amb un nombre variable d'àtoms de carboni (60-90).



Altres marcadors taxonòmics suplementaris per a la inclusió d'espècies dins del gènere *Mycobacterium* són: l'homologia rRNA 16S (valors > 95%), valors d'homologia >98,5% a nivell de l'hèlix 39 del rRNA 16S (nucleòtids 1408-1491 d'*Escherichia coli*) (80) i l'anàlisi de l'espai intergènic 16S-23S rDNA (130).

Cal la definició de dos períodes en taxonomia de procariotes, un caracteritzat per la utilització d'estudis fenotípics i l'altre centrat en les característiques genotípiques. En micobacteriologia el primer període s'inicia cap el 1880 i finalitza a la dècada dels 80 del segle XX. L'aparició de les tècniques de genotipat i la seqüenciació ha permès la redefinició de espècies definides fenotípicament i així descriure'n de noves. La taxonomia genotípica està lligada a la detecció dins del genoma de regions altament conservades específiques de gènere que flanquegen seqüències hipervariables amb deleccions, insercions o reemplaçaments de nucleòtids específics d'espècie.

La nomenclatura dels bacteris està controlada per *l'Internacional Code of Nomenclature of Bacteria* i des de l'u de gener de 1980 regeix la *Approved Lists of Bacterial Names*. S'han definit ja més d'un centenar d'espècies que pertanyen al gènere *Mycobacterium*.

S'han proposat diverses classificacions per als micobacteris en els últims 50 anys. La proposada per Runyon, basada en les característiques fenotípiques més evidents com són la velocitat de creixement i pigmentació, és encara la més estesa. En la taula 1 s'han classificat les espècies micobacterianes en dos grups segons la velocitat de creixement i també en funció del seu reservori natural i la significació clínica.

Taula 1: Espècies del gènere *Mycobacterium* adaptat de www.bacterio.cict.fr.

Micobacteris de creixement lent	Micobacteris de creixement ràpid
Espècies amb reservori en mamífers infectats Patògenes per a l'home	Espècies amb reservori al medi ambient
<i>M. africanum</i> (1969)	Associades a malalties humanes
<i>M. bovis</i> (1970)	<i>M. abscessus</i> (1953)
<i>M. canettii</i> (1969–1997)	<i>M. chelonae</i> (1923)
<i>M. caprae</i> (1999)	<i>M. fortuitum</i> (1938)
<i>M. leprae</i> (1880)	<i>M. immunogenum</i> (2001)
<i>M. microti</i> (1957)	<i>M. mucogenicum</i> (1995)
<i>M. tuberculosis</i> (1883)	<i>M. novocastrense</i> (1997)
Patògenes per altres animals	<i>M. peregrinum</i> (1962)
<i>M. pinnipedii</i> (2003)	<i>M. wolinskyi</i> (1999)
<i>M. lepraemurium</i> (1912)	Associades a malalties en animals
<i>M. avium</i> subespècie <i>paratuberculosis</i> (1923)*	<i>M. elephantis</i> (2000)
Espècies amb reservori al medi ambient associades a malalties humanes	<i>M. porcinuum</i> (1983)
<i>M. asiaticum</i> (1971)	Mai o rarament associades a malalties humanes
<i>M. avium</i> (1901)	<i>M. agri</i> (1972)
<i>M. bohemicum</i> (1998)	<i>M. aichiense</i> (1973)
<i>M. branderi</i> (1995)	<i>M. alvei</i> (1992)
<i>M. celatum</i> (1993)	<i>M. aubagnense</i> (2006)
<i>M. colombiense</i> (2006)	<i>M. aurum</i> (1966)
<i>M. conspicuum</i> (1996)	<i>M. austroafricanum</i> (1983)
<i>M. genavense</i> (1993)	<i>M. boenickei</i> (2004)
<i>M. haemophilum</i> (1962)	<i>M. bolletii</i> (2006)
<i>M. heidelbergense</i> (1998)	<i>M. conceptionense</i> (2006)
<i>M. interjectum</i> (1993)	<i>M. brisbanense</i> (2004)
<i>M. intermedium</i> (1993)	<i>M. brumae</i> (1993)
<i>M. intracellulare</i> (1949)	<i>M. canariasense</i> (2004)
<i>M. kansasii</i> (1979)	<i>M. chitae</i> (1967)
<i>M. malmoense</i> (1977)	<i>M. chlorophenolicum</i> (1986)
<i>M. marinum</i> (1926)	<i>M. chubuense</i> (1973)
<i>M. nebraskense</i> (2004)	<i>M. confluentis</i> (1992)
<i>M. parascrofulaceum</i> (2004)	<i>M. cosmeticum</i> (2004)
<i>M. parmense</i> (2004)	<i>M. diernhoferi</i> (1965)
<i>M. saskatchewanense</i> (2004)	<i>M. duvalii</i> (1971)
<i>M. scrofulaceum</i> (1956)	<i>M. fallax</i> (1983)
<i>M. shimoidi</i> (1975)	<i>M. flavescens</i> (1962)
<i>M. simiae</i> (1965)	<i>M. frederiksbergense</i> (2001)
<i>M. szulgai</i> (1972)	<i>M. gadium</i> (1974)
<i>M. triplex</i> (1997)	<i>M. gilvum</i> (1971)
<i>M. ulcerans</i> (1950)	<i>M. goodii</i> (1999)
<i>M. xenopi</i> (1959)	<i>M. hassiacum</i> (1997)
Associades a malalties en animals	<i>M. hodleri</i> (1996)
<i>M. farcinogenes</i> (1973)	<i>M. holsaticum</i> (2002)
<i>M. pseudoshottsii</i> (2005)	<i>M. houstonense</i> (2004)
<i>M. shottsii</i> (2003)	<i>M. komossense</i> (1979)
Mai o rarament associades a malalties humanes	<i>M. massiliense</i> (2006)
<i>M. arupense</i> (2006)	<i>M. madagascariense</i> (1992)
<i>M. botniense</i> (2000)	<i>M. mageritense</i> (1997)
<i>M. cooki</i> (1990)	<i>M. monacense</i> (2006)
<i>M. chimaera</i> (2004)	<i>M. moriokaense</i> (1986)
<i>M. doricum</i> (2001)	<i>M. murale</i> (1999)
<i>M. florentinum</i> (2005)	<i>M. neoaurum</i> (1972)
<i>M. gastris</i> (1966)	<i>M. neworleansense</i> (2004)
<i>M. gordonae</i> (1962)	<i>M. obuense</i> (1971)
<i>M. heckeshornense</i> (2001)	<i>M. parafortuitum</i> (1965)
<i>M. hiberniae</i> (1993)	<i>M. phlei</i> (1899)
<i>M. kubicae</i> (2000)	<i>M. phocaicum</i> (2006)
<i>M. kumamotoense</i> (2007)	<i>M. poriferae</i> (1987)
<i>M. lacus</i> (2002)	<i>M. psychrotolerans</i> (2004)
<i>M. lentiflavum</i> (1996)	<i>M. pulveris</i> (1983)
<i>M. montefiorensis</i> (2003)	<i>M. pyrenivorans</i> (2004)
<i>M. nonchromogenicum</i> (1965)	<i>M. rhodesiae</i> (1971)
<i>M. palustre</i> (2002)	<i>M. senegalense</i> (1973)
<i>M. senuense</i> (2008)	<i>M. septicum</i> (2000)
<i>M. seoluense</i> (2007)	<i>M. setense</i> (2008)
<i>M. terrae</i> (1966)	<i>M. smegmatis</i> (1889)
<i>M. triviale</i> (1970)	<i>M. sphagni</i> (1980)
<i>M. tusciae</i> (1999)	<i>M. thermoresistibile</i> (1966)
	<i>M. tokaiense</i> (1973)
	<i>M. vaccae</i> (1964)
	<i>M. vanbaalenii</i> (2002)

* relacionada amb el desenvolupament de la malaltia de Crohn

Introducció.

1.2 Diagnòstic etiològic de les infeccions per micobacteris

Introducció. Diagnòstic etiològic de les infeccions per micobacteris.

1.2.1 Mostres per a l'estudi micobacteriològic

Les mostres que arriben al laboratori de micobacteriologia han d'acomplir una sèrie de condicions generals de les quals dependrà la qualitat i l'eficiència dels resultats microbiològics. És important la selecció de la mostra més representativa i rentable, recollida en quantitat suficient per tal de minimitzar la possibilitat de falsos negatius degut a un cultiu de mostra insuficient. Cal obtenir la mostra de la forma més asèptica possible per minimitzar la contaminació amb flora comensal i, a ser possible, abans d'iniciar el tractament antimicobacterià.

Pel seu transport cal utilitzar contenidors de plàstic estèrils, en general degut a la naturalesa resistent dels micobacteris no cal la utilització de medis de transport. La tramesa al laboratori ha de ser el més ràpid possible, fet que és crític en els mostres obtingudes amb broncofibroscop (cal neutralitzar ràpidament l'efecte antimicobacterià dels anestèsics), i en els aspirats gàstrics (cal neutralitzar l'àcid gàstric).

Les mostres contaminades amb flora sapròfita requereixen una homogeneïtzació, descontaminació i posterior concentració (apartat 1.2.2). En les mostres procedents de territoris estèrils no cal fer el procés de descontaminació i sempre que hi hagi mostra suficient s'ha de concentrar.

Processar mostres inapropiades suposa un cost en temps i econòmic, cal doncs rebutjar les mostres no aptes amb la seva corresponent explicació al metge que en sol·licita l'estudi. En qualsevol dels processos que intervenen, des de l'extracció fins al resultat final, s'han de seguir sempre seguir les recomanacions de bioseguretat de nivell III (139). En la taula 2 queden reflectits els requeriments per a una bona obtenció de mostres pel cultiu micobacteriològic.

Les mostres congelades disminueixen considerablement el rendiment del cultiu.

Taula 2. Obtenció de mostres per a l'estudi micobacteriològic.

MOSTRA	REQUERIMENTS	INSTRUCCIONS ESPECIALS	MOSTRES INACCEPTABLES
Abscés	Aspiració amb una xeringa	Netejar la superfície amb alcohol abans d'aspirar la mostra. Només utilitzar escovillons en cas que el volum de mostra sigui insuficient per aspirar amb una xeringa.	Escovillons secs
Adenopaties i biòpsies de teixits	Una porció en un contenidor estèril sense conservants	Extreure asèpticament. Seleccionar la porció més caseosa. No submergir en cap líquid ni embolicar amb gasses.	Mostres en formol
Aspirat gàstric	Entre 5 i 10 ml en un contenidor estèril	Recollir les mostres a primera hora del matí durant tres dies consecutius. Utilitzar solució salina estèril, la mostra ha de ser neutralitzada a pH neutre pel que ha de ser remesa immediatament al laboratori.	
Aspirat traqueal	Recollir en un contenidor estèril		
Rentada broncoalveolar (BAL) i broncoaspirat (BAS)	Més de 5 ml en un contenidor estèril	En cas d'utilitzar anestèsia per fer la broncoscòpia cal remetre la mostra immediatament al laboratori per neutralitzar el seu efecte bacteriostàtic.	
Esputs	Recollir mostres de primera hora del matí, de 5 a 10 ml en un contenidor estèril.	Instruir al pacient de com produir l'esput sense saliva ni descàrrega nasofaríngia. Netejar-se la boca abans de recollir l'esput per minimitzar la presència de contaminants, restes de menjar, pasta dental o antibiòtics orals. Per esputs induïts utilitzar solució salina estèril hipotònica.	Saliva Pool de 24h.
Líquids orgànics	De 5 a 10 ml en un tub estèril. En mostres hemàtiques utilitzar tubs amb SDS	Netejar la zona amb alcohol i aspirar amb una xeringa. Recollir el màxim de volum possible.	
Líquid cefaloraquidi (LCR)	Un volum igual o superior a 2ml en un tub estèril	Recollir el màxim de volum possible.	
Material de ferides	Procedir com en un biòpsia o aspirat d'abscés	Acceptar només els escovillons en cas de no ser possible obtenir una biòpsia o un aspirat.	Escovillons secs
Material de lesions cutànies	Les biòpsies cal col·locar-les en un contenidor estèril sense conservant. Els aspirats recollir-los amb una xeringa	Acceptar només els escovillons, amb medi de transport, si no és possible obtenir una biòpsia o un aspirat. Per les úlceres cutànies recollir la biòpsia de la perifèria de la lesió o aspirar material de sota els marges de la lesió.	
Medul·la òssia	Inocular tanta mostra com sigui possible	Recollir asèpticament.	Mostres en EDTA Mostres coagulades
Orina	Tanta com sigui possible, d'una sola micció.	Preferentment recollir tota la primera micció matinal.	Orines de 24 h Orina de la bossa de sondatge
Sang	Inocular 5 ml en un vial de medi líquid	Procedir com en un hemocultiu.	Mostres en EDTA Mostres coagulades

1.2.2 Descontaminació i Homogeneïtzació

Els micobacteris tenen un creixement lent i requereixen un temps llarg d'incubació. Les mostres que no procedeixen de localitzacions estèrils s'han de sotmetre a un pretractament per evitar el sobrecreixement d'altres microorganismes. L'elevat contingut lipídic de la paret els fa resistents a àcids i bases fortes, i poden ser utilitzats com a descontaminants de la flora que els acompanya. Cal homogeneïtzar, descontaminar i posteriorment concentrar abans de la seva inoculació en els medis de cultiu apropiats. El pretractament de les mostres s'ha de fer amb cura per tal que no afecti la viabilitat dels micobacteris.

Cada laboratori ha d'utilitzar el mètode que millor s'adapti a les seves necessitats en funció dels mètodes de cultiu i d'identificació que utilitzi. Per tal d'optimitzar al màxim l'aïllament de micobacteris cal conèixer les limitacions de cadascun dels mètodes (taula 3).

Per a optimitzar i controlar el procediment utilitzat cada laboratori ha de conèixer el percentatge de cultius que s'acaben descartant per contaminació. Es recomana com a òptim entre un 2 i 3 % (5, 58, 69, 171), xifres que tot i ser aconsellables poden variar en funció del tipus de medis utilitzats i del tipus de mostra que es processa.

Taula 3: Mètodes de digestió i descontaminació de les mostres clíniques (5).

Mètode	Agent	Observacions
Kubica	N-acetil-cisteïna(NALC) i hidròxid sòdic (NaOH) al 2 %	Descontaminació suau. La N-acetil cisteïna és una bona substància mucolítica i permet treballar a concentracions baixes d'hidròxid sòdic menys perjudicials pels micobacteris, suficients per eliminar la flora acompanyant. Cal preparar-la diàriament. Límit de temps d'actuació 15 minuts. Es pot augmentar la concentració de NaOH al 3% en mostres excessivament contaminades.
Tacquet i Tison	Laurilsulfat sòdic al 3% i NaOH a l'1%	Descontaminació suau. Per neutralitzar les restes de detergent és aconsellable utilitzar medis de cultiu amb ou. Incompatible amb els medis de cultiu automàtics i semiautomàtics.
Petroff	NaOH al 4%	Descontaminació agressiva amb efecte homogeneïtzant . Requereix un control rigorós del temps d'exposició (≤ 15 min).
Karlson	Fosfat trisòdic al 13% i Clorur de benzalconi (Zefiran)	Ideal quan no es pot controlar els temps d'exposició. Cal sembrar les mostres amb medi amb ou o neutralitzar el zefiran amb lecitina. No es pot utilitzar en sistemes automàtics i pot resultar nociu per al complex <i>M. avium</i> (MAC).
Löwenstein-Suimiyoshi	Àcid sulfúric al 4-5%	Útil en mostres que només necessitin descontaminació.
Corper i Uyei	Àcid oxàlic al 5%	El més efectiu en mostres contaminades amb <i>Pseudomonas</i> i per a la recuperació de MAC en femta.
Smithwick	Clorur de cetil-piridini a l'1% i ClNa al 2%	Descontaminació suau. Útil per al transport de mostres. Mínim d'exposició 24 h. Cal sembrar en medis amb ou o neutralitzar l'amoni quaternari.

1.2.3 Examen directe

L'examen directe, tot i ser relativament poc sensible, es manté com l'únic test de diagnòstic diari en molts laboratoris, independentment del seu pressupost i sofisticació.

El límit de detecció de micobacteris es situa aproximadament en $5-10 \times 10^3$ bacils/ml de mostra i la sensibilitat depèn de varis factors; tipus de mostra, espècie implicada, eficiència en la descontaminació, concentració de la mostra i preparació de les extensions, així com de l'experiència de l'observador.

L'examen microscòpic permet valorar la qualitat de les mostres rebudes i identificar els pacients més contagiosos. També és útil a l'hora de monitoritzar la resposta dels pacients al tractament antimicobacterià.

Per les seves característiques, cal aplicar microscopia sistemàticament sobre qualsevol mostra clínica en la que calgui descartar patògens, excepte en sang. Un examen directe negatiu no descarta una possible infecció.

L'alt contingut de lípids de la paret dels micobacteris, especialment els àcids grassos de cadena llarga, fa que siguin difícils de tenyir amb colorants habituals. Cal utilitzar tècniques que permetin la penetració del colorant a l'interior de la paret, per escalfor o per l'acció de determinats detergents. Un cop el colorant és retingut ja no es possible la seva decoloració amb l'exposició a l'àcid-alcohol o àcids minerals. A aquesta propietat se l'anomena àcid-alcohol resistència.

Els mètodes més utilitzats per a determinar l'àcid-alcohol resistència són:

❖ Tècnica de Zhiel-Neelsen (ZN)

L'any 1882 Koch utilitzà blau de metilè alcalí calent com a primer colorant i marró de Bismarck com a decolorant i contracolorant. Ehrlich (1882) fou el primer en utilitzar la fucsina com a colorant, una anilina de mordent, i un àcid mineral com a decolorant. Ziehl (1882), utilitzà el fenol com a mordent i Rindfleisch (1882) escalfà la preparació amb aigua calenta. Finalment Neelsen (1883) combinà la fucsina d'Ehrlich amb el mordent de Neelsen. Així apareix la tinció tal i com és ara, en la

qual els bacils s'observen vermells i contrasten amb el fons contracolorat en blau (figura 2).

❖ Tècnica de fluorescència

En aquesta tinció s'utilitza l'auramina com a fluorocrom, complementada o no amb rhodamina, les extensions s'observen amb el microscopi de fluorescència a 100 o 400 augments. Els bacils s'observaran groc-taronges (figura 3). En la tinció amb auramina les espècies pertanyents al complex de *M. fortuitum* es tenyeixen de manera molt tènue. Quan es sospita la presència d'aquestes espècies cal fer la tinció amb la tècnica de Zhiel-Neelsen.

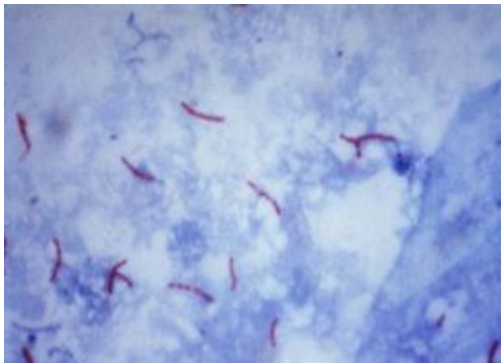


Figura 2. *M. tuberculosis* tenyit amb la tècnica de ZN.

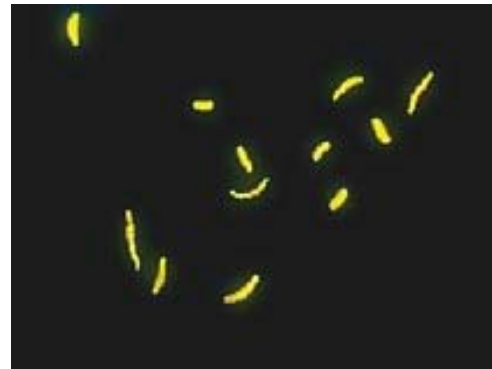


Figura 3. *M. tuberculosis* tenyit amb Auramina.

En general l'aspecte dels bacils no dóna cap informació de l'espècie que s'observa, no obstant, en medi de cultiu líquid algunes espècies adopten certes morfologies que es poden utilitzar a l'hora d'orientar la identificació de certes espècies. És característica l'agrupació en "cordes" (*cord factor* (CF)) de *M. tuberculosis* complex, els nius de *M. xenopi*, les formes tigrades petites de *M. kansasii* (figura 4 a, b i c) i les tigrades gruixudes i més llargues de *M. gordonae*. La resta de micobacteris no presenten un estructura característica, tot i que algunes imatges directament en la mostra clínica poden suggerir la presència d'espècies com *M. genavense* (figura 4 d) (159).

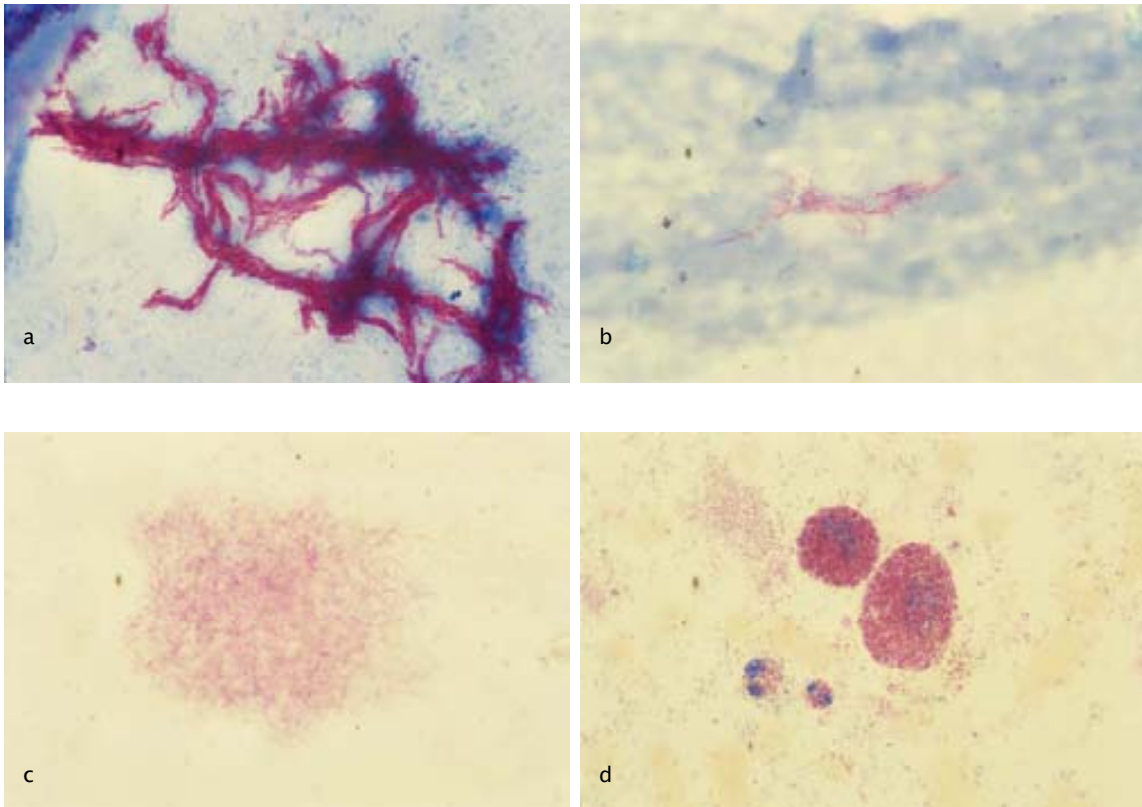


Figura 4: Tinció de ZN de micobacteris en cultiu líquid : a) *M. tuberculosis* complex; b) *M. kansasii*; c) *M. xenopi*; d) biopsia hepàtica amb *M. genavense*.

També en lesions compatibles amb lepra lepromatosa l'observació d'agrupacions en forma de globus s'accepta que són específiques i diagnòstiques de *M. leprae* (figura 5) (135).

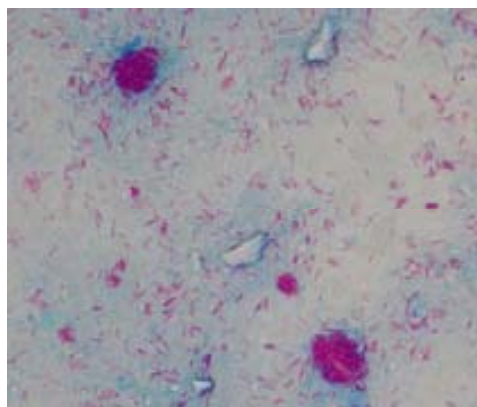


Figura 5.: Biopsia de pell amb *M. leprae* tenyit amb la tècnica de ZN.

L'aplicació de tècniques que utilitzen la fluorescència ha augmentat la sensibilitat respecte a la tinció clàssica de Ziehl-Neelsen.

Per optimitzar el més possible el control de la transmissió de la tuberculosi, el resultat de l'examen directe s'hauria d'informar, al menys en les mostres respiratòries, durant les primeres 24 h des de l'arribada de la mostra al laboratori (59, 104, 228).

1.2.4 Detecció d'àcids nucleics directament en la mostra clínica

Durant les dues últimes dècades s'han desenvolupat varis mètodes moleculars per a la detecció directa i la identificació de *M. tuberculosis* complex directament a la mostra clínica. Aquests mètodes són capaços, potencialment, de reduir el temps de diagnòstic de setmanes a hores, i han anat adquirint rellevància dins el laboratori de micobacteriologia.

El principi bàsic de qualsevol tècnica de diagnòstic molecular és la detecció d'una seqüència específica d'àcid nucleic per hibridació amb una seqüència complementària (sonda), seguida de la detecció de l'híbrid. L'any 1985 aparegué al món científic la reacció en cadena de la polimerasa (PCR), aquesta tècnica permet sintetitzar per via enzimàtica milions de còpies d'un fragment específic de DNA o RNA. Les tècniques que inclouen aquesta amplificació prèvia del material genètic, són suficientment sensibles com per a ser emprades directament per a la detecció en mostra clínica.

S'han proposat nombroses tècniques per a la detecció de *M. tuberculosis* complex. Es recomana la utilització de sistemes comercials que comptin amb l'aprovació de diferents organismes internacionals com la FDA (*Food and Drug Administration*), la CDC (*Centers for disease Control and Prevention*). Aquestes tècniques no poden substituir el cultiu, que segueix essent la tècnica de referència per al diagnòstic de tuberculosi.

1.2.4.1 Amplified *M tuberculosis* Direct assay (AMTD2) (bioMerieux. Gen-Probe, Inc., San Diego, Calif)

La tècnica consisteix en una amplificació isotèrmica (42°C) mitjançant una transcripció inversa (TMA). La seqüència diana és un fragment de 16S rRNA, amplificada mitjançant intermediaris de DNA. Els amplicons de RNA s'identifiquen mitjançant una reacció d'hibridació en solució que utilitza sondes específiques complementaries al fragment amplificat marcades amb esters d'acridina. El revelat es fa mitjançant la tècnica coneguda com a protecció pels híbrids. En cas de produir-se hibridació les sondes marcades estaran formant seqüències bicatenàries que protegiran l'ester d'acridina de l'acció catalítica del reactiu de rentat. Es tracta d'un procés autocatalític i manual. Presenta el desavantatge de no utilitzar control intern per a la detecció de inhibicions de la reacció. Els resultats s'obtenen en dues hores i mitja.

La FDA ha aprovat aquesta tècnica per a la seva utilització en mostres respiratòries, independentment del resultat de la bacil·loscòpia. La sensibilitat en mostres respiratòries es troba en un rang entre 85,7% i 92,9%, arribant al 100% en mostres bacil·loscòpia positiva, i disminuint fins al 62,5 % en alguna sèrie de mostres amb la bacil·loscòpia negativa (179). En l'avaluació de mostres extrarrespiratòries, la sensibilitat continua essent molt bona en mostres amb la bacil·loscòpia positiva (88-100%) i baixa ostensiblement en mostres amb l'examen directe negatiu.

L'especificitat oscil·la entre el 92,1% i el 100%. S'han descrit falsos positius, que es relacionen amb el valor de punt de tall i la zona gris establerta per la casa comercial. També s'han descrit algunes reaccions creuades amb micobacteris no tuberculosos. Tot i no estar aprovada per la FDA per a mostres extrarrespiratòries, la gran quantitat de mostres avaluades en diferents estudis fa que es pugui recomanar el seu ús de manera assenyada, sempre tenint en compte les dades clínico-microbiològiques del malalt (57).

1.2.4.2 AMPLICOR *M. tuberculosis* assay (Roche Molecular System, Branchburg, N.J.)

Aquesta tècnica es basa en l'amplificació mitjançant una PCR qualitativa d'un fragment de 584 pb del gen que codifica pel 16S rRNA, present a totes les espècies del gènere *Mycobacterium*. Posteriorment, es realitza una hibridació del producte amplificat amb sondes marcades, que es detectaran mitjançant una reacció colorimètrica en l'aparell AMPLICOR. L'extracció dels àcids nucleics pot fer-se de forma manual o automatitzada (AMPLIPREP). La inclusió d'un control intern permet la detecció de la presència d'inhibidors de la polimerasa (1–20%). Els resultats s'obtenen entre 6 i 7 hores. La FDA l'ha aprovat per a mostres respiratòries amb bacil·loscòpia positiva. Presenta una bona sensibilitat en les mostres recomanades (91,3%–100%), mentre que al utilitzar-la en mostres respiratòries amb bacil·loscòpia negativa i en mostres extrarespiratòries la sensibilitat decreix (50%–71,7%) (178). S'han descrit falsos positius relacionats amb reaccions creuades amb micobacteris no tuberculosos (25).

1.2.4.3 Sistemes basats en l'amplificació a temps real

- ❖ **BD ProbeTec energy transfer (ET) system DTB** (Becton Dickinson Biosciences Microbiology Products, Sparks, Md.)

Basada en un amplificació isoterma (52,5°C) mitjançant el sistema anomenat de desplaçament de cadena (SDA) amb un sistema de detecció fluorimètric a temps real. Es coamplifiquen dues seqüències, una de la seqüència d'inserció *IS6110* específica del complex *M. tuberculosis* i una altra específica de gènere. El procés s'inicia amb un tall en una seqüència diana d'una de les dues cadenes de DNA mitjançant una endonucleasa de restricció i posteriorment una extensió en aquesta zona on es sintetitzarà una nova cadena de DNA que desplaçarà a l'inicial. El DNA replicat i les cadenes desplaçades faran de substrat per a repetits cicles d'anellament, trencament i desplaçament de cadenes. Les sondes de detecció estan

marcades amb un colorant fluorescent i un extintor de fluorescència (*quencher*), que impedeix l'emissió de qualsevol senyal fluorescent. A l'augmentar la quantitat de producte amplificat i a l'hibridar amb les sondes de detecció s'obtenen productes de doble cadena susceptibles de l'acció de les endonucleases, que portarà a un increment del senyal fluorescent que es detectarà mitjançant un sistema cinètic de lectura fluorimètrica en temps real. El procés és del tot automatitzat, amb una durada de 3 a 4 hores. Inclou un control intern per a detectar les inhibicions de la reacció d'amplificació (0,3–14%). Es recomana la utilització en mostres respiratòries. La sensibilitat és elevada en mostres amb bacil·loscòpia positiva (98,5–100%), i amb moltes variacions en funció de la sèrie en mostres bacil·loscòpia negativa i extrarespiratòries (33,3–85,7 %), l'especificitat és elevada (98,9–100%). No s'han descrit reaccions creuades amb altres micobacteris (178). Inicialment està dissenyada per a la detecció a partir de cultiu de *M. tuberculosis* complex, *M. kansasii* i *M. avium* complex i directament de mostra per a *M. tuberculosis* complex en mostres respiratòries.

❖ **RealArt *M. tuberculosis* TM PCR kit** (Abbott Laboratories. Illinois, U.S.A)

Basada en una amplificació mitjançant una PCR en temps real d'una regió de 163 pb del gen que codifica pel 16S rRNA, específica del complex *M. tuberculosis*. L'amplificat es detecta amb fluorocroms acoblats a sondes d'oligonucleòtids que hibriden específicament amb la seqüència diana. La mesura del senyal fluorescent al llarg de la reacció fa possible la seva detecció i quantificació. Aquest tipus de reacció pot determinar el nombre de còpies/ml en la mostra inicial. El procediment està automatitzat (ABIPRISM) i inclou un control intern.

1.2.4.4 INNO-LIPA RIF.TB *line probe assay* (Innogenetics NV, Zwijndrech, Belgium.)

Consisteix en un amplificació mitjançant una PCR interna (*nested-PCR*) d'una regió de 70pb del gen *rpoB* que codifica a la subunitat *beta* de la RNA-polimerasa present a

tots els membres del complex *M. tuberculosis*, i posteriorment segueix amb una hibridació inversa. Durant la fase d'amplificació s'incorpora la biotina que actua de marcador, així el producte biotinilat es desnaturalitzarà hibridant amb 10 sondes immobilitzades en línies paral·leles en una tira reactiva. La hibridació es detecta mitjançant una reacció colorimètrica semiautomatitzada (AUTOLIPA). L'assaig dura unes 12 hores. A més de detectar la presència de *M. tuberculosis* complex a la mostra, també en detecta la seva resistència o no a la rifampicina. No presenta control intern. La majoria de treballs han utilitzat aquesta tècnica per a la detecció de resistències en soques i es disposa de poques dades de sensibilitat (58,8%–98,3%) i especificitat en mostra clínica.

A l'hora de triar una o altra tècnica cal tenir en compte la prevalença de la malaltia en la població en estudi, ja que els valors predictius positius i negatius poden variar considerablement.

A diferència del cultiu, en les proves de detecció de *M. tuberculosis* complex directament en mostra clínica no és necessari que els bacteris siguin viables, complicant la interpretació dels resultats. En cas de resultats positius amb bacil·loscòpia positiva la interpretació no pot portar problemes, confirmant el diagnòstic de tuberculosi, però cal fer certes consideracions en el cas de mostres amb resultats diferents als esperats:

1. Detecció genètica positiva i cultiu negatiu:

- a. Detecció de bacteris inviubles per l'efecte del tractament. La FDA recomana que els estudis no es facin de mostres de malalts amb més de 7 dies de tractament i al menys fins a dos mesos després d'haver-lo finalitzat.
- b. Detecció de restes de material genètic d'un procés clínic anterior.
- c. Altres patologies pulmonars que destrueixen teixits que contenen bacteris provinents de granulomes.

- d. Excessiva descontaminació de la mostra que fes inviable el creixement dels bacteris al cultiu.
 - e. Falsos positius deguts a les contaminacions creuades entre mostres.
- 2. Detecció genètica positiva i examen directe negatiu, cultiu en curs:**
- En aquest cas el que ens aporta la tècnica és un augment en la sensibilitat diagnòstica i, en cas de una situació clínica compatible, caldrà considerar-ho diagnòstic de malaltia activa i adoptar les mesures adequades.
- 3. Detecció genètica negativa i examen directe positiu, cultiu en curs:**
- El més probable és que es tracti d'una infecció per un micobacteris no tuberculosos (MNT). La seva detecció precoç evita l'innecessari aïllament del malalt, l'estudi de contactes i el tractament preventiu d'aquests, així com l'inici del tractament específic per a *M. tuberculosis*. Ara bé, cal tenir en compte la possible presència d'inhibidors, que es poden detectar introduint controls d'inhibició. Els inhibidors són una característica de la mostra i no del pacient, pel que és aconsellable analitzar diferents mostres del mateix pacient.

Al fer l'anàlisi dels resultats, cal tenir sempre present la correlació clínico-patològica. Tanmateix és important que aquestes proves s'indiquin quan existeix una sospita clínica fonamentada, ja que la seva indicació indiscriminada disminueix notablement el seu rendiment. Cal tenir en compte que els resultats negatius no exclouen la malaltia.

1.2.5 Aïllament per cultiu

Els micobacteris es desenvolupen de forma adequada en medis que continguin una font de carboni (glucosa, glicerol, àcids orgànics especialment l'àcid pirúvic), una de nitrogen (amoníac, algunes amides i aminoàcids, ions nitrat) i ions de metalls essencials, entre ells ferro i magnesi. Algunes espècies com *M. genavense* i *M. haemophilum* requereixen

suplements pel seu creixement, com micobactina o hemina, i són extremadament dificultoses de cultivar, mentre d'altres no es poden cultivar *in vitro* com *M. leprae*.

Per satisfer els seus requeriments energètics, els micobacteris oxiden la font de carboni a diòxid de carboni i aigua, mitjançant la via d'Embden–Meyerhof. La catalasa i la peroxidasa, presents en tots els micobacteris, eliminen el peròxid d'hidrogen generat en la reacció final de la cadena respiratòria.

Taula 4. Medis de cultiu sòlids i bifàsics utilitzats en l'aïllament i els estudis de sensibilitat dels micobacteris.

Medis sòlids	
Orgànics	
Löwenstein–Jensen Petragani American Thoracic Society (Coletsos)	Basats en ou, patata, sals, glicerol i un agent inhibidor del creixement bacterià, el verd de malaquita. Bona recuperació d'espècies micobacterianes. Vida llarga. En les mostres amb restes d'inòcul són de difícil diferenciació amb el creixement micobacterià.
Sintètics	
Middlebrook 7H10 Middlebrook 7H11	Fabricats amb agar i compostos químicament definits. Transparents, permeten la detecció ràpida dels cultius en inici de creixement bacterià (10–12 dies). Tenen una caducitat curta i són sensiblement deteriorats per canvis de T ^a i exposició a la llum.
Medis bifàsics	
Septi–Check	Vials amb medi líquid 7H9 de Middlebrook complementat amb medis sòlids a la part superior. Útil per a la identificació sense la necessitat d'un subcultiu.

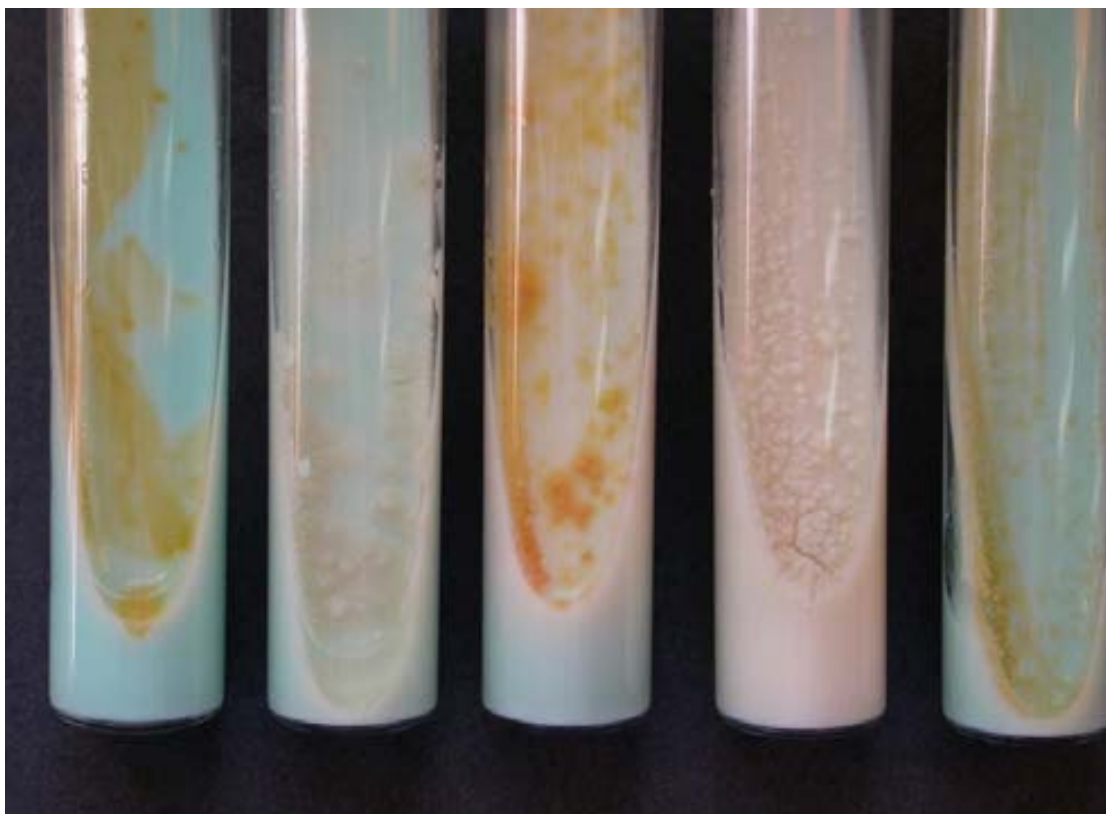


Fig 6: Cultius en Löwenstein–Jensen de *M. gordonae*, *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. abscessus* i *M. xenopi*.

Taula 5. Medis de cultiu líquids utilitzats en l'aïllament i els estudis de sensibilitat dels Micobacteris.

Medis líquids

Detecció manual

Middlebrook 7H9, Dubos, Youmans, Proskauer-Beck.	Medis clàssics, base per la resta de medis líquids.
MGIT® (Mycobacterial growth Indicator Tube)	Medi basat en 7H9 de Middlebrook amb un component fluorimètric (pentahidrat de ruteni) fixat en silicona. La depleció d'O ₂ com a conseqüència del creixement es detecta sota la llum ultraviolada amb una emissió ataronjada. Cal complementar amb enriquiments i antibiòtics en el moment de la sembra
MB Redox®	Basat en el medi de Kirchner complementat amb antibiòtic i enriquiments. Incorpora sal de tetrazole com indicador redox, que es redueix i precipita a la paret bacteriana detectable directament a simple vista

Detecció automàtica o semiautomàtica

BACTEC 460TB®	Medi semiautomàtic. Tot tipus de mostres, incloses les hemàtiques. Utilitza 7H12, brou base de 7H9 amb àcid palmític marcat amb C ¹⁴ la seva metabolització és detectada per la presència de ¹⁴ CO ₂ . La detecció és quantitativa. Es complementa amb antibiòtics i enriquiments prèviament a la inoculació. Permet estudis de sensibilitat. Té com a desavantatge la utilització d'isòtops radioactius, no ser automatitzat, contaminacions creuades potencials, preu elevat.
Esp culture system II®	Sistema automatitzat de monitorització contínua. Medi base 7H9 de Middlebrook complementat amb antibiòtic i enriquiment i unes esponges de cel·lulosa que ofereixen un hàbitat natural. Es detecta el consum d'oxigen mitjançant sensors detectors de pressió. Admet qualsevol mètode de descontaminació i per a tot tipus de mostres, incloent les hemàtiques. Permet estudis de sensibilitat per a isoniazida, rifampicina i etambutol.
MB/BacT ALERT® 3D system (MB/BacT)	Automatitzat de cultiu colorimètric, detecta la producció de CO ₂ com indicador de creixement bacterià. Medi bàsic 7H9 complementat, incorporació d'antibiòtic previ a la inoculació. Per a tot tipus de mostra, incloent les sanguínies. Limitat a l'ús de NaOH-NALC com a descontaminant. Gran capacitat.
MGIT 960®	Utilitza el medi MGIT detectant el consum d'O ₂ amb sensors fluorimètrics. Gran capacitat, limitat a l'ús de NaOH-NALC com a descontaminant. Permet estudis de sensibilitat
BACTEC9000 MB®	Sistema automatitzat d'hemocultius per a la recuperació de micobacteris en mostres hemàtiques. Lectura colorimètrica

1.2.6. Identificació dels micobacteris

Tal com ja s'ha comentat anteriorment, la combinació entre les tècniques basades en les característiques fenotípiques i genotípiques ha permès la redefinició d'espècies ja existents, així com la descripció de noves espècies. Els dos tipus de tècniques es complementen en la identificació d'espècies micobacterianes.

1.2.6.1 Identificació fenotípica

1.2.6.1.1 Identificació basada en proves bioquímiques

La identificació convencional de *M. tuberculosis* i dels MNT s'ha basat en la probabilitat estadística de la soca de presentar un determinat patró en una certa bateria de test bioquímics, així com la seva resistència o sensibilitat a determinats antibiòtics. Han estat desenvolupades i estandarditzades un gran nombre de proves. Aquests mètodes, que tenen l'avantatge de estar ben establerts i ser relativament barats, per contra requereixen una gran experiència tècnica alhora que es troben variacions "soca dependent" dins la mateixa espècie i requereixen força temps fins a l'obtenció dels resultats. Els patrons de les diferents espècies estan ben recollits a la bibliografia (5, 58, 133, 171). Abans de realitzar qualsevol prova és convenient saber la velocitat i temperatura òptima de creixement i pigmentació per a poder establir una bateria reduïda de proves en funció del grup taxonòmic al que, segons les característiques esmentades, podria pertanyer el micobacteri que estem identificant.

1.2.6.1.2 Identificació basada l'anàlisi dels àcids micòlics de la paret

La composició lipídica de la paret cel·lular dels micobacteris, en concret dels àcids micòlics, té valor taxonòmic. La seva anàlisi ha estat àmpliament utilitzada per a la

seva identificació. Actualment es coneixen set tipus d'àcids micòlics que es combinen de forma diferent en la paret de diferents espècies del gènere *Mycobacterium* (37, 171). El pas previ pel seu anàlisi és la seva extracció, que variarà en funció de la tècnica que s'utilitzi. La interpretació sempre és fa mitjançant la comparació amb patrons estàndards.

Estan descrites tres tècniques (5):

1. Cromatografia en capa fina (TLC): amb poc poder de discriminació, sobretot per les espècies de creixement lent, diferents espècies comparteixen el mateix patró. És una tècnica de fàcil estandardització.
2. Cromatografia de gasos (GLC). Detecció qualitativa d'èsters metílics d'àcids grassos dels àcids micòlics. La majoria de les espècies tenen un patró inespecífic que només té valor d'exclusió. Al voltant d'una dotzena d'espècies presenten un patró específic. És una tècnica de difícil estandardització i equipament costós.
3. Cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC). Detecció d'èsters de bromofenacil dels àcids grassos. És una tècnica de difícil estandardització i equipament costós.

1.2.6.2 Identificació per tècniques basades en la detecció d'àcids nucleics. Identificació molecular

El principal avantatge dels mètodes de detecció d'àcids nucleics és la seva rapidesa en la identificació, ja que la majoria de les vegades es poden dur a terme directament en cultius primaris sense requerir subcultius, i es poden aplicar a cultius en medi líquid. D'altra banda són tècniques d'alt cost, complexitat tècnica i no es disposa de sistemes comercials de detecció per a totes les espècies de micobacteris que es poden trobar en mostres clíniques.

1.2.6.2.1 Sondes d'àcids nucleics (132, 159).

Es basen en l'ús de sondes de DNA marcades amb èsters d'acridina quimioluminiscents, complementàries a fragments de rRNA específics d'espècie. És una tècnica senzilla, ràpida i que s'adapta a qualsevol laboratori. L'experiència demostra que són reaccions específiques i sensibles. Actualment estan comercialitzades sondes específiques per a *M. tuberculosis* complex, *M. avium* complex, *M. intracellulare*, *M. avium*, *M. gordonae* i *M. kansasii*. Malgrat aquestes sondes cobreixen la majoria d'aïllaments amb importància clínica, són necessàries altres tècniques alternatives per a la identificació de la resta d'espècies.

1.2.6.2.2 Hibridació en fase sòlida

Es basa en sondes curtes de DNA específiques d'espècie en diferents suports, tires de nitrocel·lulosa, plaques de micropous, micromatriu (*microxips*). Actualment es disposa de dos productes comercials, INNO-LiPA® Mycobacteria (Innogenetics NV, Gante, Bèlgica) i GenoType® Mykobacterien (Hain Diagnostika, Nehren, Alemanya). Ambdós sistemes es basen en l'amplificació d'una zona genètica concreta, la regió intergènica del 16S-23S per INNOLiPA i el 23S rDNA per a GenoType. Un cop feta l'amplificació s'hibrida el producte obtingut sobre un tira de niló o nitrocel·lulosa on hi ha la diana específica per a la identificació *M. tuberculosis* complex i *M. avium* complex i altres 18 espècies més. Aquestes tècniques permeten la detecció de coinfeccions, i presenten l'inconvenient de ser força laborioses i cares.

1.2.6.2.3 Anàlisi del polimorfisme dels fragments de restricció (*PCR-restriction fragment length polymorphism analysis (PRA)*) (70, 224, 226)

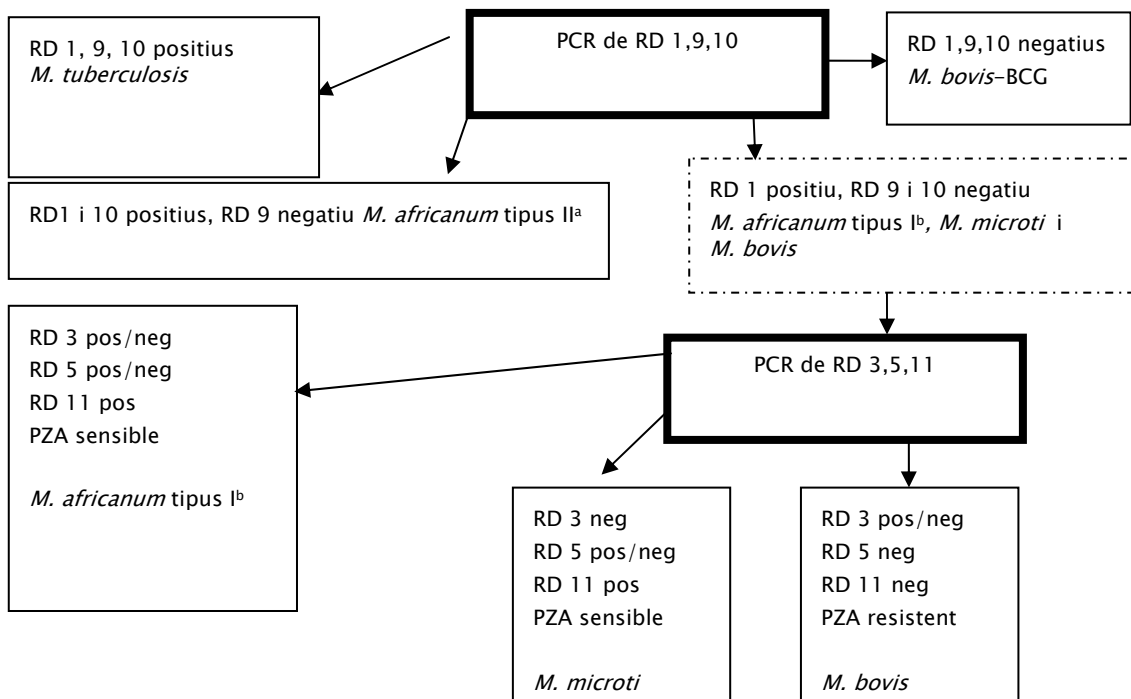
Aquesta tècnica es basa en l'amplificació per PCR d'un fragment de 440 pb que codifica per una proteïna de xoc tèrmic de 65kDa (*heat shock protein (hsp)*) present en tots els micobacteris i la posterior digestió de l'amplificat amb 2 enzims de restricció *BstE*I i *Hae*III. S'obtenen diversos fragments de restricció de diferents pesos moleculars, que són separats per electroforesi, donant un patró de restricció específic d'espècie. El patró de bandes es compara amb els algoritmes publicats que ofereixen la possibilitat d'identificar un gran nombre de les espècies aïllades. El PRA és especialment útil per a la identificació de micobacteris exigents que creixen malament en els medis de cultiu sòlids, com *M. genavense*. Inicialment va ser desenvolupada per Telenti i cols. (226), posteriorment els grups de Taylor i Devallois introduïren 5 i 11 patrons addicionals respectivament (70, 224), i les darreres actualitzacions han estat la de Brunello i cols. el 2001, i les aportacions més recents de Chimara i cols el 2008 (42, 52).

1.2.6.2.4 Seqüenciació del gen que codifica per la subunitat 16S rRNA i/o el *hsp65*

Es basa en la seqüenciació d'una part del gen que codifica per la subunitat 16S rRNA o el gen *hsp65*. La seqüència obtinguda es compara amb aquelles que estan incloses en bases de dades com Genbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) o RIDOM (<http://www.ridom-rdna.de>). És útil per a la identificació de totes les espècies de micobacteris, exceptuant la diferenciació entre *M. kansasii* i *M. gastri*, *M. malmoense* i *M. szulgai*, *M. marinum* i *M. ulcerans* i entre *M. abscessus* i *M. chelonae*. Es tracta d'una tècnica cara i laboriosa limitada a laboratoris de referència.

1.2.6.2.5 Anàlisi de les regions de diferenciació RD1, RD9, RD10, RD11

La gran homogeneïtat genètica entre les espècies del complex *M. tuberculosis* fa que no siguin útils les tècniques anteriorment descrites. Parsons va descriure un algoritme basat en la detecció per PCR de la presència o absència d'unes regions concretes, anomenades regions de diferenciació (RD) en el genoma (170). Aquestes seqüències estan deletades en alguns membres dels complex *M. tuberculosis* i això permet fer-ne la seva identificació específica. L'algoritme inicial publicat per Parsons no permet la diferenciació entre *M. bovis* i *M. caprae*, motiu pel qual cal recórrer a altres esquemes publicats (160)(35).



a: varietat més freqüent en l'est Africà
b: varietat més freqüent en l'oest Africà.

figura 7: Esquema de la identificació de les espècies de *M. tuberculosis* complex mitjançant l'amplificació de les regions de diferenciació (RD) (40, 170) .

1.2.6.2.6 Amplificació i detecció a temps real

Mètode basat en la realització simultània de l'amplificació d'una diana concreta i el seu reconeixement mitjançant una hibridació, que es detecta i quantifica mitjançant marcadors fluorogènics a temps real. Són tècniques ràpides i amb una perspectiva de futur cap a la detecció directament en la mostra clínica (apartat 1.2.4.3) i per a la identificació d'un ventall ampli d'espècies. S'han desenvolupat diversos sistemes d'amplificació i marcatge que utilitzen els sistemes de detecció LightCycler® (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemanya) o ABI Prism 7700® amb sondes TaqMan® (PE Applied Biosystems, Foster City, USA). Són mètodes que encara estan en desenvolupament i amb escassa experiència, però amb grans expectatives de futur.

El laboratori de micobacteris ha de procurar donar resultats fiables en el menor temps possible (228). Per això ha de combinar el diagnòstic microbiològic clàssic dels micobacteris, basat en l'examen directe, aïllament per cultiu i identificació fenotípica, amb un conjunt de tècniques moleculars. Aquestes tècniques permeten la detecció de *M. tuberculosis* directament en la mostra clínica i la identificació ràpida dels aïllaments. Cada laboratori haurà de definir les tècniques a utilitzar en funció de les seves possibilitats i les característiques epidemiològiques de les infeccions per micobacteris de la comunitat a la qual serveix.

1.2.7 Característiques dels fàrmacs antituberculosos. Estudis de sensibilitat

1.2.7.1 Fàrmacs antituberculosos

Els micobacteris presenten una resistència natural a nombrosos antibacterians pel fet de posseir una paret complexa, molt hidrofòbica, amb una permeabilitat reduïda per

un gran nombre de compostos (113). Això implica que el tractament antituberculós sigui amb antimicrobians específics.

1.2.7.1.1 Fàrmacs de primera línia

❖ Isoniazida (INH)

L'isoniazida és un fàrmac sintètic introduït en terapèutica al 1952. Els membres del complex tuberculós són generalment molt sensibles a la INH, mentre que el paper en el tractament d'altres micobacteris és molt limitat.

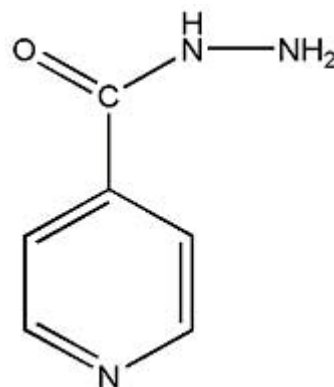


Fig 8: estructura química de la Isoniazida.

Mecanisme d'acció

La INH és un profàrmac que és convertida en àcid isonicotínic (principi actiu) mitjançant la participació de l'enzim catalasa-peroxidasa codificat per gen *katG*. Posteriorment, l'àcid isonicotínic és capaç d'oxidar o acilar grups proteics, bloquejant finalment la síntesi d'àcids micòlics de la paret de *M. tuberculosis* (214, 254).

En la síntesi dels àcids micòlics s'hi veuen involucrats diversos sistemes enzimàtics relacionats amb processos de desaturació–elongació–desaturació–formació de l'anell ciclopropà. Per una banda, la isoniazida pot inhibir aquesta cadena en el pas inicial de desaturació en la formació d'un àcid gras monosaturat. També pot inhibir l'elongació de cadenes d'àcids grassos i d'hidroxilípids on està involucrada la proteïna *InhA*. D'altra banda, interfereix en el metabolisme de NAD al formar-se un anell semblant d'àcid isonicotínic (metabòlit actiu) que pot afectar directament les reaccions catalitzades pel NAD en la síntesi de DNA.

La INH és activa només en front als bacils en replicació activa, essent el seu paper molt limitat en les poblacions latents com les que es troben dins dels macròfags.

La concentració inhibidora mínima (CIM) de les soques sensibles oscil·la entre 0,025 i 0,05 µg/ml. Les concentracions sèriques després de 2 hores d'una dosi oral de 300 mg són de 4,5 a 7 µg/ml.

Pot produir hepatotoxicitat i s'han descrit augments subclínic de les transaminases entre el 10% i el 15% dels pacients tractats. El risc de hepatitis clínica és molt baixa 0,1% abans dels 30 anys i s'incrementa progressivament fins el 4% en majors de 65 anys (155). També poden originar una polineuritis perifèrica per dèficit de piridoxina, que es pot prevenir amb una dosi diària entre 10 i 50 mg/dia de piridoxina.

Mecanisme de resistència

Després de la introducció al 1952 de la INH en el tractament de la tuberculosi, es va observar que les soques resistents freqüentment perdien l'activitat catalasa - peroxidasa. Al 1990, amb la introducció de la biologia molecular, es va associar l'enzim catalasa-peroxidasa amb la activació de la INH, i es va aconseguir clonar i seqüenciar el gen *katG* que el codifica. Entre el 50 i 60% de les soques resistents estudiades presenten alguna mutació puntual en aquest gen (184), petites delecions o insercions, que condueixen a la pèrdua o disminució de l'activitat de la catalasa i a un alt nivell de resistència a la INH (CIM > 2 mg/ml).

S'han descrit un nombre important de mutacions, la més freqüent és la Ser315Thr, que es troba en aproximadament el 40% de les soques resistents. L'enzim resultant és incapaç d'activar la INH, provocant una resistència d'alt nivell, però mantenint una certa activitat catalasa-peroxidasa, assegurant un nivell de protecció oxidativa suficient (193).

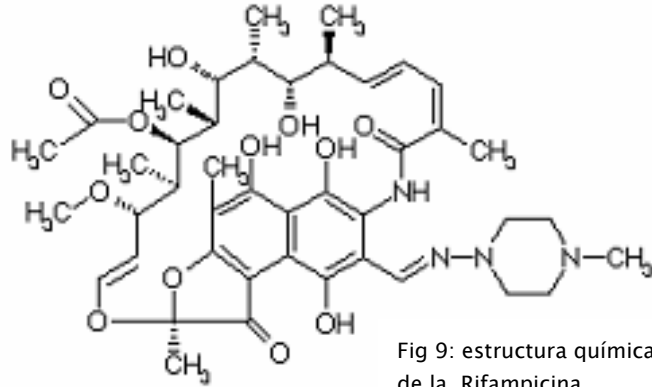
Una altra regió associada a la resistència a la INH és el locus *inhA*, que inclou el gen *mabA* (que codifica l'enzim 3-cetoacil-ACP-reductasa) i el gen *inhA* (que codifica l'enoil-ACP-reductasa). Ambdós participen en la síntesi de la paret bacteriana. Les mutacions associades a aquest locus, fonamentalment a la seva regió reguladora, expliquen el 25-30% de les resistències a la INH (22).

Del 10 al 20% de les soques resistents a la INH no presenten alteracions del gen *katG* ni de l'operó *mabA–inhA*. S'han investigat altres gens com *ahpC* (alquil hidroperòxid-reductasa), *kasA* (cetoàcid sintasa), *ceoA* (UDP galactopiranosid reductasa) i les deshidrogenasa del malat i nicotinamida-adenina dinucleòtid reduït (NADH) (225). El paper exacte de les alteracions trobades en aquests gens respecte a la resistència a la INH queda per determinar.

La mutació espontània que produeix la resistència es dona amb una freqüència de 10^{-5} a 10^{-6} (194).

❖ Rifampicina (RIF)

La RIF és un antimicrobià semisintètic introduït en la terapèutica l'any 1967.



Mecanisme d'acció

La RIF, tal com la resta de rifamicines, és un potent inhibidor de la síntesi de RNA missatger (mRNA), per tant de la transcripció genètica en procariotes pel fet d'unir-se a la polimerasa de RNA dependent de DNA. En *Escherichia coli* aquest enzim és un oligòmer compost per quatre subunitats distintes (α , β , β' i δ , que estan codificades pels gens *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* i *rpoD* respectivament). La inhibició de la transcripció té lloc per la fixació de la RIF a la subunitat β (153).

A més d'un efecte bactericida sobre les cèl·lules de *M. tuberculosis* metabòlicament actives, la RIF també posseeix una excel·lent acció esterilitzant de bacteris en estat de latència (que només presenten ocasionalment activitat metabòlica), tant en els focus necròtics com dins dels macròfags. Aquesta activitat de la RIF, junt amb la inclusió de la PZA en els esquemes terapèutics, ha permès escurçar el tractament de la tuberculosi no complicada a 6 mesos.

Les CIM de les soques sensibles de *M. tuberculosis* són molt baixes ($0,005-0,2 \mu\text{g/ml}$).

El pic sèric a les 2–4 h d'una dosi oral de 600 mg és de 5–10 µg/ml.

Pot produir molèsties gastrointestinals i afectació hepàtica (en menys del 1,1% dels pacients). És també el desencadenant de reaccions d'hipersensibilitat com febre, pruija, urticària, vasculitis cutània, eosinofília, trombocitopènia, hemòlisi o insuficiència renal per nefritis intersticial. Tenyeix l'orina, la suor i les llàgrimes de color taronja. És un potent inductor enzimàtic, podent disminuir les concentracions sèriques d'altres fàrmacs administrats concomitantment com, entre d'altres, els antirretrovirals inhibidors de la proteasa, anticonceptius orals, anticoagulants orals, corticoides i sulfonilurea.

Mecanisme de resistència

Els micobacteris, tal com altres gèneres bacterians, adquireixen resistència a la RIF mitjançant mutacions en una regió ben definida de 81 parells de bases (27 codons) de la regió central del gen que codifica per la subunitat β de la polimerasa de RNA (*rpoB*). Més del 96% de les soques resistents a la RIF presenten mutacions en aquesta regió (53, 162). Això facilita el desenvolupament de tècniques moleculars per a la detecció ràpida de la resistència a la RIF en la soca aïllada per cultiu o fins i tot directament en la mostra clínica (92, 231).

Tot i que s'han descrit 35 variants al·lèliques diferents, amb lleugeres variacions en la seva distribució geogràfica, les mutacions més comuns (65–86%) són les que afecten al codó 526 o al codó 531 que confereixen resistències d'alt nivell (CIM > 32 µg/ml) i resistència creuada a la resta de rifamicines, mentre que mutacions en altres codons determinen una resistència de menor nivell i es manté la sensibilitat a la resta de rifamicines. Cal assenyalar que en un 4% de les soques no es detecta cap mutació en aquests 81 parells de bases, la resistència es pot deure a mutacions a la regió aminoterminal (214).

La mutació espontània que origina la resistència s'observa amb una freqüència de 10⁻⁸ (64).

Mentre la resistència aïllada a la INH s'observa amb certa freqüència, la resistència a la RIF s'associa a la resistència a la INH, pel que la seva detecció constitueix un marcador de multiresistència. Ocasionalment s'ha descrit monoresistència a la RIF en malalts infectats per l'HIV (143).

❖ Pirazinamida (PZA)

És un derivat sintètic de la nicotinamida.

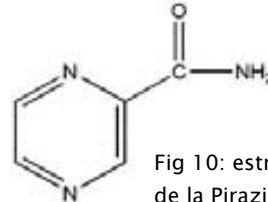


Fig 10: estructura química de la Pirazinamida.

Mecanisme d'acció

La PZA és un profàrmac que difon passivament a l'interior dels macròfags. Allà és convertit a la seva forma activa, l'àcid pirazinoic, per l'enzim micobacterià pirazinamidasa. S'acumula intercel·lularment per un deficient sistema de bombeig. Sembla que actua sobre la síntesi dels àcids micòlics de la paret, però el mecanisme concret es desconeix (256).

Mecanisme de resistència

S'ha observat que entre el 72 i el 97% de les soques de *M. tuberculosis* resistents a la PZA tenen mutacions disperses en el gen estructural *pcnA* o en el promotor de la pirazinamidasa (203). També s'han descrit soques resistents a la PZA, sense mutacions en el gen *pcnA*, en les quals aquesta resistència es deu a mecanismes relacionats amb la permeabilitat o amb les bombes d'expulsió activa (187). Dos membres del complex tuberculós, *M. bovis* i *M. bovis*-BCG (bacil Calmette-Guérin), són constitutivament resistents a la PZA degut a una mutació puntual, C → G en el codó 169, en el gen *pcnA*.

La PZA té un potent efecte esterilitzant sobre els bacils tuberculosos latents de dins dels macròfags. No obstant, li manca d'activitat en front la resta de micobacteris.

La CIM promig de les soques sensibles de *M. tuberculosis* és de 20 µg/ml a pH 5,6. Entre 1 i 4 h després d'una dosi oral d'1g s'obtenen pics sèrics aproximadament de 45 µg/ml.

Durant el tractament es pot observar hiperuricèmia pel bloqueig de la secreció tubular renal d'urats. Ocasionalment provoca alteracions gastrointestinals i hepatotoxicitat (255) tot i que els esquemes terapèutics actuals amb dosi de 20–35 mg/kg/dia són menys hepatotòxics. Excepcionalment poden aparèixer exantema i fotosensibilitat.

❖ Etambutol (ETB)

L'ETB, etilen–diamino–dibutanol, és un producte isòmer dextrogir derivat de l'etilendiamina.

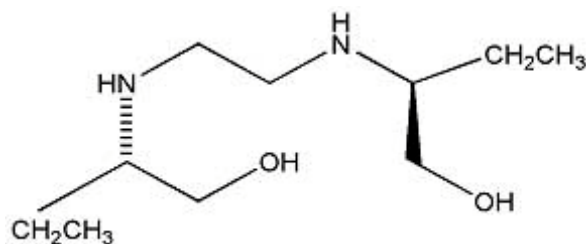


Fig 11: estructura química de l'Etambutol

Mecanisme d'acció

L'ETB inhibeix de forma específica la biosíntesi de la paret micobacteriana. Actuant sobre l'enzim arabinosiltransferasa, relacionat amb la síntesi de components de la paret cel·lular com l'arabinogalactà i el lipoarabinomanà (26).

És bacteriostàtic, actiu en front cèl·lules actives. Té una activitat variable sobre la resta d'espècies de micobacteris de creixement lent i molt menor en les espècies de creixement ràpid.

La CIM en soques sensibles va de 1 a 5 µg/ml.

El pic sèric a les 2–4 h d'una dosi oral de 1,5 g és de 5 µg/ml. Pot causar neuritis òptica, relacionada amb la dosi i la durada del tractament.

Cal donar instruccions al malalt per a què comuniqui immediatament qualsevol disminució de l'agudesia visual o dificultat per a distingir els colors vermell o verd. Degut a la dificultat per a monitoritzar l'agudesia visual no es recomana utilitzar etambutol pel tractament de la tuberculosi infantil.

Mecanisme de resistència

La resistència s'associa amb canvis en l'operó *emb*, constituït per tres gens, *embA*, *embB*, *embC*, que codifica arabinosiltransferasa. La resistència es produeix per una sobreexpressió de proteïnes *emb* (CIM baix nivell < 10 µgr/ml) i per mutacions al gen *embB* (CIM alt nivell >20 µgr/ml en més del 65% de les soques) (6, 216, 227).

La freqüència de mutació en *M. tuberculosis* és de 10^{-5}

❖ Estreptomicina (STR)

L'estreptomicina és un antibiòtic aminoglicòsid.

Mecanisme d'acció:

Interfereix en la síntesi proteica bloquejant la traducció del mRNA, tant en el seu inici com en la incorporació de nous aminoàcids a la cadena polipeptídica.

La CIM per a les soques sensibles oscil·la al voltant de 8 µg/ml. S'obtenen pics sèrics de 25 a 50 µg/ml a la 1-2 h d'una dosi intramuscular de 1g (250).

Els efectes secundaris més importants són les alteracions vestibulars i amb menys freqüència les auditives. Es relacionen amb la dosi i durada del tractament i poden ser irreversibles.

Mecanisme de resistència

Entre el 65-75% de soques resistents tenen alguna mutació als gens que codifiquen el 16S rRNA (*rrs*) i la proteïna ribosomal S12 (*rpsL*). *M. tuberculosis* només té una còpia de l'operó rRNA, el que fa que una mutació ja pot provocar resistència (comportament dominant) (162). Les mutacions que afecten al gen *rpsL* es donen en el 52-59% de les soques resistents, la més freqüent es produeix al codó 43 substituint una lisina per una arginina. En el gen *rrs* la major part de mutacions apareixen al *loop* 530 o a la regió 915. Hi ha diferents teories que relacionen l'estructura conformacional del *loop*

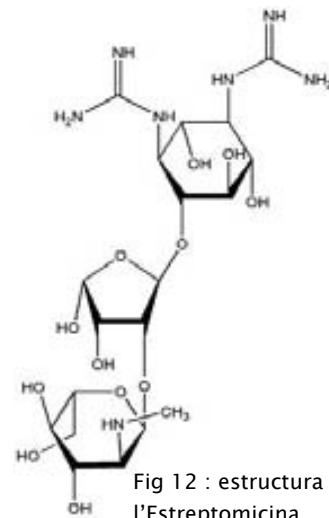


Fig 12 : estructura química de l'Estreptomicina

530 amb la fidelitat de la traducció (154). Les mutacions que afecten al gen *rrs* s'observen en el 8–21 % de les soques resistents i produeixen una resistència de nivell intermedi (CIM, 50–500 µg/ml) (154, 225). En aproximadament un terç de les soques resistents no s'hi detecten alteracions dels gens *rrs* o *rpsL* i tenen una resistència de baix nivell (CIM 25–50 µg/ml), en aquestes soques s'ha suggerit un mecanisme de permeabilitat per a justificar la resistència (154).

La freqüència amb la que apareixen mutants resistents en *M. tuberculosis* es de 10⁻⁶.

1.2.7.1.2. Fàrmacs de segona línia

❖ Àcid paraminosalicílic (PAS)

L'àcid paraminosalicílic és actiu front *M. tuberculosis* mentre que altres microorganismes, incloent la resta de micobacteris, en són resistents. No es coneix amb exactitud el seu mecanisme d'acció. Se li ha atribuït una inhibició de la síntesi de l'àcid fòlic, del metabolisme de l'àcid salicílic i del transport de ferro. És actiu en front la població de creixement extracel·lular. La CIM per a *M. tuberculosis* és de 1 µg/ml, obtenint pics sèrics de 7 a 8 µg/ml després de 1 a 2 h d'una dosi de 4 g (250).

El PAS s'absorbeix de forma incompleta en el tracte digestiu, pel que cal una dosi oral elevada (10–12 g/dia), fet que unit a una certa intolerància gastrointestinal, pot portar problemes d'adherència al tractament. El seu ús ha caigut amb l'aparició de la RIF i l'ETB, encara que degut al seu baix cost s'utilitza en països amb baixos recursos.

❖ Cicloserina

La D-cicloserina (4-amino-3-isoxazolidona) és un anàleg de la D-alanina. Aquest fàrmac inhibeix de forma competitiva els enzims D-alanil-D-alanina sintetasa, alanina racemasa i alanina permeasa, interferint en la síntesi de la paret micobacteriana (66). La resistència a cicloserina sembla que depèn d'alteracions en la D-alanil-D-alanina sintetasa (65).

És activa en front tots els micobacteris. La CIM per a *M. tuberculosis* oscil·la entre 5 i 20 µg/ml, obtenint pics sèrics al voltant de 10 µg/ml a les 4 h d'una dosi oral de 250 µg/ml (250).

La toxicitat és molt elevada incloent neuropatia perifèrica, alteracions dels sistema nerviós central com confusió, irritabilitat, cefalea, disàrtria, vertigen o convulsions i alteracions psicòtiques que inclouen depressió greu amb idees suïcides. Cal no utilitzar-la si hi ha alternatives.

❖ **Etionamida (ETH), protionamida**

L'ETH (etil-tio-isonicotinamida) i la protionamida (propil-tio-isonicotinamida) són derivats de l'àcid nicotínic, amb una potent activitat en front *M. tuberculosis* i altres micobacteris. L'ETH inhibeix la síntesi dels àcids micòlics i estimula les reaccions d'òxid-reducció. El seu mecanisme d'acció és semblant al de la INH. De fet les mutacions en l'operó *mabA-inhA* que donen baixa resistència a la INH també produeixen resistència a la ETH (22).

Cal destacar però que les soques amb resistència d'alt nivell a la INH per alteració del *katG* romanen sensibles a l'ETH. L'ETH també presenta resistència creuada amb la tiacetazona.

La CIM de l'ETH per a *M. tuberculosis* oscil·la entre 0,6 i 2,5 µg/ml, arribant-se a valors sèrics de 20 µg/ml a les 3-4 h d'una dosi oral de 0,5-1g (250).

Es donen efectes adversos que inclouen la intolerància digestiva, hepatitis tòxica i diversos tipus de neurotoxicitat.

❖ **Amikacina, kanamicina, capreomicina i viomicina**

L'amikacina i la kanamicina, junt amb l'estreptomina són aminoglicòsids similars estructuralment i tenen activitat antituberculosa. La tobramicina i la gentamicina, al contrari, no són efectives en el tractament de la tuberculosi a les dosis habituals.

La capreomicina i la viomicina són antibiòtics peptídics bàsics que comparteixen el mecanisme d'acció amb els aminoglicòsids. No s'absorbeixen per via oral, essent l'administració intramuscular.

No hi ha resistència creuada entre l'STR i la capreomicina fet pel qual la capreomicina és activa en front la majoria de soques resistents a l'STR (152). Algunes soques resistents a la capreomicina presenten resistència creuada amb l'amikacina i la kanamicina.

La CIM de la capreomicina en soques sensibles oscil·la al voltant de 10 µg/ml. Sol arribar a pics sèrics de 30 µgr/ml. És menys tòxica que la viomicina i l'amikacina i la kanamicina, fet pel qual se la considera una alternativa pel tractament de la tuberculosi resistent (85).

L'amikacina és l'antibiòtic més potent del grup, tant *in vitro* com en el model animal, amb una CIM en front *M. tuberculosis* d'1µg/ml. S'han obtingut concentracions sèriques de 10–30 µg/ml després de l'administració d'una dosi de 500 mg intramuscular. Hi ha poca experiència en el tractament de la tuberculosi, tant pel seu nivell de toxicitat, com pel seu alt cost. No obstant, donada la determinació més assequible de concentracions sèriques d'amikacina que d'estreptomycina o capreomicina, pot ser una alternativa en aquells malalts amb insuficiència renal o en pacients d'edat avançada amb alteracions auditives. Tots els antimicrobians del grup presenten efectes ototòxics (tant vestibulars com cloquears), i nefrotòxics.

La proporció de mutants resistents espontanis és elevada oscil·lant entre 10^{-3} i 10^{-5} .

❖ Tiosemicarbazona

És un dels fàrmacs antituberculosos menys potents i més tòxics. El seu mecanisme d'acció és desconegut. És actiu front *M. tuberculosis* amb una CIM promig de 1 µg/ml, obtenint pics sèrics de 1 a 4 µg/ml a les 1–2 h d'una dosi oral de 150 mg.

Entre altres reaccions adverses pot produir reaccions cutànies greus, hepatitis, anèmia hemolítica, granulocitopènia i trastorns de l'equilibri. En malalts infectats per l'HIV s'ha associat el tractament de la tuberculosi amb tiosemicarbazona amb l'aparició de la

síndrome de Stevens–Johnson i necrolísi epidèrmica greu pel que es desaconsella en el seu ús en aquest tipus de pacient (77, 165).

Pel seu baix cost, s'utilitza en alguns països en vies de desenvolupament. No es disposa del fàrmac ni a Europa ni a Estats Units.

❖ **Rifamicines: rifabutina, rifapentina i rifalazil**

La rifabutina és una espiro–piperidil rifamicina i la rifapentina és una ciclopentil rifamicina. Ambdues presenten activitat front *M. tuberculosis*. La rifabutina és més activa que la rifampicina *in vitro* i en el model múrid de tuberculosi. (166). El mecanisme d'acció i de resistència són idèntics als de la rifampicina. Les mutacions en els codons 513 i 531 del gen *rpoB* confereixen resistència per a totes les rifampicines, mentre que mutacions en el codó 526 difereix el seu espectre de resistència en funció del canvi amioacídic que es produeixi, i les mutacions al codons 511, 516, 518 i 522 mostren baix nivell de resistència a la rifampicina i rifapentina, mentre la soca segueix essent sensible a la rifabutina i el rifalazil (11, 31, 162, 198, 214, 252). Així doncs es troba una correlació entre la mutació concreta i l'espectre de resistència (184, 250).

La rifabutina s'absorbeix bé via oral i arriba a concentracions sèriques de 0,5 µg/ml a les 4 h d'una dosi de 300 mg. Els efectes adversos són similars als de la rifampicina, incloent les interaccions amb els fàrmacs antirretrovirals. Malgrat això, es recomana tractar als pacients infectats per l'HIV en tractament amb inhibidors de les proteases, amb 150 mg de rifabutina en lloc de 600 mg de rifampicina, el seu efecte és menor (47).

La rifapentina arriba a concentracions sèriques de 15 µg/ml a les 5 o 6 h d'una dosi de 600 mg. La seva vida mitja és més llarga (13h), per tant es pot administrar dos cops per setmana. Quan s'ha comparat el tractament amb rifapentina amb el tractament diari de la rifampicina, els resultats han estat similars, encara que el nombre de recaigudes en el grup de la rifapentina és superior (250).

❖ Fluoroquinolones

El nucli central de l'estructura de les molècules de quinolona és un anell de 4-oxo-1,4-dihidroquinoleïna. Des de la síntesi de l'àcid nalidíxic l'any 1962 s'ha anat modificant la seva estructura. El fet més destacable és la incorporació al carboni 6 d'un àtom de fluor (fluoroquinolones). L'activitat de les quinolones té lloc a nivell de les topoisomerases de tipus II i, fonamentalment, sobre la DNA-girasa composta de dues subunitats A i de dues subunitats B (codificades pel gens *gyrA* i *gyrB* respectivament). Una diana secundària d'actuació seria la topoisomerasa IV, codificada pels gens *parC* i *parE*. El desenvolupament de la resistència a les quinolones és un procés complex que generalment associa mutacions que afecten la DNA-girasa, la topoisomerasa IV i/o proteïnes de membrana que regulen la permeabilitat i l'expulsió activa del fàrmac. En *M. tuberculosis* s'han descrit mutacions en *gyrA* (222), que s'associen a resistència clínica a la ciprofloxacina, així com resistència creuada amb l'ofloxacina. També s'han descrit mutacions en el gen *gyrB* (122) així com una bomba d'expulsió activa (gen *lfrA*) que confereix una resistència de baix nivell (43, 221).

L'activitat de les noves quinolones sobre *M. tuberculosis*, la seva bona distribució tissular i cel·lular, així com els seus escassos efectes adversos, fan que les fluoroquinolones siguin considerades fàrmacs de segona elecció, generalment limitats al tractament d'infeccions per soques multiresistents (4). Tot i això una de les limitacions del tractament amb quinolones és el desenvolupament de resistències.

La ciprofloxacina, l'ofloxacina, l'esparfloxacina i la levofloxacina han estat eficaces terapèuticament en un model experimental de tuberculosi en el ratolí (115).

Hi ha també nombroses dades *in vitro* tant de CIM com en model de cultius de macròfags, sobre les activitats de les noves quinolones (115, 229, 230).

La CIM de ciprofloxacina en front *M. tuberculosis* oscil·la entre 0,25 i 3 µg/ml i la de l'ofloxacina entre 0,5 i 2,5 µg/ml, suggerint 2 µg/ml com a punt de tall per a la sensibilitat. S'obtenen pics sèrics de 2,4 i 4,3 µg/ml a la 1-2 h d'una dosi oral de ciprofloxacina de 500 o 750 mg respectivament. Per l'ofloxacina, la concentració sèrica després d'una hora d'una dosi oral de 400 mg és de 2,9 µg/ml (250).

Cal tenir en compte que la concentració en el teixit pulmonar de ciprofloxacina i ofloxacina és aproximadament 4 vegades la que es detecta en el sèrum (10).

S'han desenvolupat recentment dues noves molècules, moxifloxacina i gatifloxacina amb una vida mitja més llarga, i sembla que tenen una alta activitat *in vitro* en front *M. tuberculosis*. Sembla que la moxifloxacina actua sobre la població bacil·lar sobre la que no actua la RIF (250). Un estudi recent mostra que la moxifloxacina en combinació amb la RIF i la PZA és més efectiva que la combinació clàssica de INH, RIF i PZA (164). Sembla que la raó d'això podria ser que la moxifloxacina té activitat sobre la subpoblació de microorganismes que no són atacats pels altres antibiòtics, o per l'absència de l'antagonisme que hi ha entre la INH i la PZA (100, 110, 164, 250).

Sembla també que la gatifloxacina pot causar hipoglucèmia i hiperglucèmia el que suposa un obstacle pel seu ús (9).

❖ Oxazolidinones

Les oxazolidinones són una nova família d'antimicrobians que actuen inhibint la síntesi proteica al fixar-se a la subunitat ribosomal 50S. Dos oxazolidinones, PNU-100480 i linezolid, han demostrat una bona activitat en front *M. tuberculosis* en el model múrid de la malaltia. Després de l'administració a les rates d'una dosi de 50 mg/kg de PNU-100480, s'aconsegueixen concentracions sèriques de 7 µg/ml del metabòlit sulfòxid que té una potent activitat antimicobacteriana. En el cas del linezolid, i en el mateix model animal, s'aconsegueixen pics sèrics de 17,7 i 36,0 µg/ml després de l'administració d'una dosi oral única de 50 i 125 mg/kg respectivament. En el model múrid, l'activitat de PNU-100480 fou comparable a la de la INH, mentre que el linezolid fou una mica menys actiu. S'han descrit alteracions gastrointestinals, trombocitopènia i anèmia reversibles. Les oxazolidinones poden tenir un futur en el tractament de la tuberculosi.

1.2.7.1.3 Noves molècules en estudi

L'augment de la tuberculosi multi i extremadament resistent i la coinfecció amb l'HIV han posat de manifest la necessitat de desenvolupar nous fàrmacs pel tractament de la tuberculosi. Els fàrmacs ideals haurien d'escurçar el temps de tractament, actuar sobre la població bacil·lar persistent i ser actius en front les soques resistents. Inicialment s'ha treballat en el desenvolupament de fàrmacs anàlegs de molècules amb eficàcia coneguda, recerca que ha estat atractiva des del punt de vista econòmic, farmacèutic i clínic. Però la utilització d'aquests anàlegs té en contra la possible resistència creuada amb les seves molècules emparentades. Malgrat tot, algunes molècules han estat estudiades amb resultats prometedors.

En aquest sentit, l'estructura de l'etambutol és favorable a la preparació d'anàlegs amb tècniques químiques. Alguns compostos com el NIH 241 i SQ 109 tenen una eficàcia comparable o fins i tot superior a l'ETB (183).

Estudis *in vitro* mostren que la SQ109 interactua sinèrgicament amb la INH i la RIF, i en models animals els tractaments amb aquest fàrmac escurcen un 25% el temps necessari per a guarir la malaltia. Es troba en fase I en els assaigs clínics i podria substituir un o més dels antituberculosos de primera línia, simplificant la teràpia i escurçant el temps de tractament (51, 116).

La **Diarilquinolona** (DARQs) estructuralment diferent de les fluoroquinolones i les altres quinolones. La DARQ R207910 és activa en front les soques sensibles i resistents de *M. tuberculosis*. També tenen CIMs baixes per altres micobacteris, com *M. bovis*, *M. kansasii* i *M. ulcerans*, així com en front altres espècies naturalment resistents a molts dels antituberculosos coneguts com *M. avium* complex, *M. abscessus*, *M. fortuitum* i *M. marinum*. Sembla que té activitat específica per a micobacteris, fet que suggereix que potser es tracta d'un profàrmac que necessiti de l'activació per un enzim específic dels micobacteris. Els estudis moleculars han identificat la subunitat C de la ATP sintetasa com la diana de la R207910 (actualment se l'anomena TNC207) i està en fase II en els

assajos clínics pel tractament de la tuberculosi activa. En els estudis realitzats amb models murins sembla que pot reduir el temps de tractament (9).

Els **nitroimidazoxazols** utilitzats com a radiosensitius en la quimioteràpia del càncer, presenten activitat antimicrobiana *in vivo*. El component més actiu, el CGI-1734,1 té alhora acció mutagènica, fet pel qual no pot ser utilitzat en clínica. La PA-824 presenta activitat antituberculosa amb una CIM de 0,015-0,25 µg/ml amb activitat tant front la població en replicació com latent, i activitat en front soques multiresistents als fàrmacs habituals. Inhibeix la biosíntesi dels àcids nucleics, per un mecanisme depenent del factor F420 de *M. tuberculosis*. L'anàleg amídic PA-1343, amb una CIM de 0,015 µg/ml., es troba en fase d'estudis preclínics (68).

Taula 6: Característiques principals dels fàrmacs de primera i segona línia.

Fàrmac (any d'introducció)	Activitat	Mecanisme d'acció	Gen(s) involucrat en la resistència	Freqüència de mutació	CIM	Via d'administració	Toxicitat
Fàrmacs de primera línia							
Isoniazida (1952)	Bactericida; bacils metabòlicament actius	Inhibició de la síntesi dels àcids micòlics	<i>katG</i> (42–58%) <i>inhA</i> (21–34%)	10 ⁻⁵ – 10 ⁻⁶	0,05 – 0,2	Oral	Hepatitis clínica (0,1% <30 anys; 4% >65 anys) Polineuritis perifèrica
Rifampicina (1965)	Bactericida, bacils metabòlicament actius, en estat de latència i amb creixement intermitent	Inhibició de la transcripció	<i>rpoB</i> (96–98%)	10 ⁻⁵	<0,5	Oral	Molèsties gastrointestinals Afectació hepàtica
Pirazinamida (1970)	Bactericida, bacils en estat de latència a l'interior dels macròfags	Desconegut	<i>pncA</i> (72–97%)	10 ⁻³ – 10 ⁻⁴	20	Oral	Hiperuricèmia Hepatotoxicitat
Estreptomícina (1944)	Bacils metabòlicament actius	Inhibició de la síntesi proteica	<i>rpsL</i> (52–89%) <i>rrs</i> (8–21%)	10 ⁻⁶ – 10 ⁻⁸	8	Intramuscular	Ototoxicitat
Etambutol (1968)	Bacteriostàtic, bacils metabòlicament actius	Inhibició de la síntesi d'arabinogalactà i lipoarabinogalactà (paret cel·lular)	<i>embCAB</i> (47–65%)	10 ⁻⁵ – 10 ⁻⁷	1–5	Oral	Neuritis òptica
Fàrmacs de segona línia							
Etionamida (1966)	Bactericida, bacils metabòlicament actius	Inhibeix la síntesi dels àcids micòlics	<i>inhA</i> <i>mabA</i> <i>ethA</i>	10 ⁻³	0,6 –2,5	Oral	Intolerància digestiva Hepatotoxicitat Neurotoxicitat
Kanamícina/Amikacina (1957)	Bacils metabòlicament actius	Inhibició de la síntesi proteica	<i>rrs</i> <i>rpsL</i>	10 ⁻⁶	1	Intramuscular	Ototoxicitat (vestibular i coclear) Nefrotoxicitat
Cicloserina(1955)	Bactericida, bacils metabòlicament actius	Inhibeix la síntesi de la paret cel·lular, un pas abans que en la dels betalactàmics	Desconeguda	10 ⁻⁴	5–20	Oral	Neuropatia perifèrica Alteracions del SNC Reaccions psicòtiques
Capreomicina(1967)	Bacteriostàtic	Inhibició de la síntesi proteica	Desconeguda	10 ⁻³	1–50	Intramuscular	Toxicitat òtica i vestibular
PAS(1946)	Bacils metabòlicament actius	Antifòlic	Desconeguda	10 ⁻⁴	1	Oral	Intolerància gastrointestinal

1.2.7.2 Estudis de sensibilitat als fàrmacs antituberculosos

L'estudi de sensibilitat als antituberculosos planteja dos aspectes d'interès, l'individual per tal de poder implementar un tractament antituberculós efectiu en un malalt en concret, i l'epidemiològic que representa conèixer el percentatge de soques resistents que circulen en una població concreta. Darrerament han conviscut dos criteris diferents respecte a quan cal fer l'antibiograma. El primer defensa que només cal fer-lo quan hi ha una indicació clínica, en cas de fracàs terapèutic, en pacients prèviament tractats o en pacients que pertanyen a una població de risc d'estar infectats per soques resistents perquè procedeixen de poblacions amb taxes de resistència en nous casos elevada. L'altre postula la realització sistemàtica de l'antibiograma en tots els casos diagnosticats, per tal de detectar precoçment resistències en casos nous, així com monitoritzar les taxes de resistència inicial en una comunitat. Els resultats obtinguts influiran en les tractaments empírics que caldrà aplicar a la comunitat avaluada, així com per a la detecció de pacients amb soques resistents i prevenir-ne la seva transmissió. (146)

Segons les recomanacions de la OMS (248) la principal estratègia de control de la malaltia és la instauració d'una teràpia eficaç amb fàrmacs adequats, en funció del resultat de l'antibiograma. Així doncs actualment el segon criteri sembla que hauria de ser el predominant. També es recomana la repetició de l'estudi si el pacient segueix essent bacilífer als tres mesos de tractament o si hi ha una evidència clínica clara de fracàs terapèutic.

1.2.7.2.1 Estudis fenotípics

Els estudis fenotípics detecten de forma aïllada per cada fàrmac el percentatge de bacils resistents que hi ha en una població bacteriana concreta. A finals dels anys 50, per la varietat de mètodes existents, es va fer palesa la necessitat d'uniformitat i reproductivitat en les estudis de sensibilitat als antituberculosos. Durant la dècada dels

60, l'OMS, juntament amb la *International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases*, van definir tres mètodes vàlids per a la realització dels estudis fenotípics (75).

- ❖ mètode de les **concentracions absolutes**, desenvolupat per Meissner (1961), compara el creixement en medi suplementat amb antibiòtic respecte un tub testimoni sense antibiòtic.
- ❖ mètode del **quocient de resistències**, definit per Mitchison (1953), compara la CIM de la soca a estudiar amb una soca salvatge de referència.
- ❖ mètode de les **proporcions crítiques**, descrit per Canetti i Grosset (1963), compara les colònies crescudes en medis de cultiu amb diferents dilucions d'antibiòtic, amb les presents en medi sense antibiòtic, interpretant el resultat a través de la proporció de colònies capaces de créixer en presència dels fàrmacs. Aquest mètode és la base del mètodes més utilitzats actualment.

La realització dels estudis de sensibilitat i els criteris per interpretar els resultats tenen en compte dos factors:

- 1) la proporció crítica de mutants resistents al fàrmac.
- 2) la concentració crítica d'antibiòtic en el medi que s'utilitzi per a l'estudi.

Els mètodes fenotípics, basats en el cultiu de *M. tuberculosis* en presència d'antibiòtics foren descrits per a la seva execució en medi sòlid. Primer es varen descriure en Löwenstein-Jensen i posteriorment s'estandarditzaren per a 7H10 i 7H11 de Middlebrook. La dificultat en la seva execució, la lentitud en l'obtenció dels resultats i el cost elevat, ha fet que es busquessin alternatives.

En medi sòlid s'ha desenvolupat el mètode E-test (AB. bioMérieux. France.), basat en la utilització de tires impregnades amb un gradient de concentracions de l'antibiòtic en estudi aplicades sobre el medi de cultiu directament, que aporten l'avantatge de

determinar la CIM del fàrmac. És un mètode senzill de realitzar, encara que de difícil lectura i lent, amb un cost superior a la resta de tècniques en medi sòlid.

Amb el desenvolupament de les tècniques de cultiu en medi líquid apareixen els mètodes més utilitzats fins ara, que presenten l'avantatge de disminuir el temps d'incubació, la més fàcil estandardització de l'inòcul i la lectura automatitzada o semiautomatitzada. El mètode més utilitzat ha estat el radiomètric, BACTEC 460TB (Becton Dickinson Diagnostic Instruments, USA), que s'adapta al mètode de les proporcions, detectant el creixement bacterià mitjançant la utilització d'un isòtop radioactiu incorporat a l'àcid palmític del medi de cultiu. El resultat s'obté entre el 5è i 14è dies. El desavantatge de la utilització d'isòtops radioactius ha fet que es desenvolupessin altres sistemes no radiomètrics com ESP Myco II (Trek Diagnostic Systems, USA); MB/BacT (bioMérieux) i MGIT 960 (Becton Dickinson Diagnostic Instruments, USA). Els temps de resposta d'aquest sistemes són similars al sistema radiomètric BACTEC 460TB, però eviten els inconvenients d'utilitzar isòtops radioactius.

En l'estudi de sensibilitat a la PZA cal afegir l'inconvenient que el metabòlit actiu, l'àcid pirazinoic, actua a pH àcid (pH 5,5), pH al qual el 10% de soques de *M. tuberculosis* tenen dificultats per a créixer (5). El sistema radiomètric ha aconseguit adaptar les condicions del seu medi a un pH de 6, aconseguint el creixement de pràcticament totes les soques de *M. tuberculosis*. Actualment es considera mètode de referència. Darrerament s'ha desenvolupat el sistema MB/BacT (BioMérieux, France) amb resultats similars al mètode de referència (13).

Per a l'estudi de sensibilitat als fàrmacs de segona línia, indicat en soques resistents als de primera, s'ha descrit l'estudi en 7H10, tècnica difícil i lenta en la obtenció dels resultats. S'accepta també la realització en medi radiomètric amb criteris similars als utilitzats per als fàrmacs de primera línia, estudiant-se l'amikacina, ofloxacina, etionamida, rifabutina, clofacimina, kanamicina i capreomicina. No s'han obtingut resultats reproduïbles per a la cicloserina, pel que no s'aconsella el seu estudi. Altres

antibiòtics d'utilitat potencial com la moxifloxacina, linezolid i claritromicina encara no tenen un protocol clar desconeixent la concentració crítica que cal estudiar en cada cas (172).

S'han desenvolupat altres mètodes fenotípics no convencionals poc avaluats i d'utilització restringida com la detecció de l'activitat ATP, citometria de flux i d'utilització de fags (144).

1.2.7.1.2 Detecció dels mecanismes moleculars de la resistència als antituberculosos

La necessitat d'un diagnòstic dels mecanismes de resistència als antituberculosos ràpid, fiable i sensible, ha fet que en les últimes dècades es desenvolupessin nombroses tècniques moleculars. El pas previ obligat és la caracterització de les mutacions específiques responsables de la resistència per a cada fàrmac. El coneixement acumulat ha de permetre el desenvolupament de proves per a la seva detecció en les soques aïllades, així com en la mostra clínica directament.

Es disposa de diferents mètodes basats en l'anàlisi de restricció, en la seqüenciació i en la hibridació, normalment sobre tires de nitrocel·lulosa. La seqüenciació i la hibridació detecten directament les mutacions i, per tant, defineixen les alteracions genètiques implicades, mentre que la restricció-electroforesi és un mètode indirecte per a la detecció de mutacions que no té la capacitat de definir la substitució nucleotídica exacta (90).

Modificacions en la PCR basades en la incorporació de marcadors fluorescents i de termocicladors amb dispositius òptics, permeten monitoritzar la cinètica de la reacció (PCR en temps real), i per tant, quantificar la quantitat de DNA motlle i detectar la presència de variacions genètiques de forma simultània (249).

Recentment, s'han desenvolupat les micromatrius, dispositius amb oligonucleòtids sintetitzats i adherits a una placa de sílica capaços de detectar nombrosos segments

de DNA o RNA presents en la mostra de forma específica (61). Les micromatrius són doncs una variant de les tècniques d'hibridació. S'han utilitzat per analitzar expressions gèniques, identificar marcadors genètics i detectar mutacions a escala genòmica.

“L'antibiograma molecular” possible amb aquestes tècniques requereix, l'acompliment de certes condicions, a) conèixer les mutacions responsables de resistència pel disseny de la tècnica; b) desenvolupament del mètode; c) extracció dels àcids nucleics i d) ús de controls de qualitat per a la supervisió del procés.

Un pas crític en el desenvolupament i validació d'una tècnica ràpida és l'extracció del material genètic, ja que la gran varietat de mostres clíniques i cèl·lules microbianes amb diferents parets cel·lulars poden dificultar el procés d'extracció. Un procediment òptim ha de presentar una eficient alliberació dels àcids nucleics i la seva protecció en front a la degradació per nucleases, i eliminació o neutralització de substàncies presents en la mostra que poden portar a la inhibició de la transcripció, de l'amplificació molecular i/o la detecció dels àcids nucleics. Finalment han de tenir una alta sensibilitat en relació amb les dades clíniques (174).

1.3 La Tuberculosi

1.3.1 Situació global de la tuberculosi (81, 247, 248)

El constant declivi en el nombre de casos de tuberculosi en el món desenvolupat, així com en algunes parts dels països del tercer món, s'atura o s'inverteix a mitjans de la dècada dels 80, quan augmenten els casos a USA, particularment a Nova York, així com a tot Europa Occidental. Aquesta inversió de tendència reflecteix, entre d'altres causes, la migració de població de països amb alta incidència de tuberculosi, la pandèmia d'HIV, les bosses de pobresa a les grans ciutat i el desmantellament dels programes de control de la tuberculosi al món occidental donada la baixa incidència. Entre 1980 i 2005 es varen notificar a l'OMS més de 90 milions de casos.

Actualment a escala mundial la incidència de la tuberculosi per 100.000 habitants està disminuint lentament (-0,6% entre 2005 i 2006).

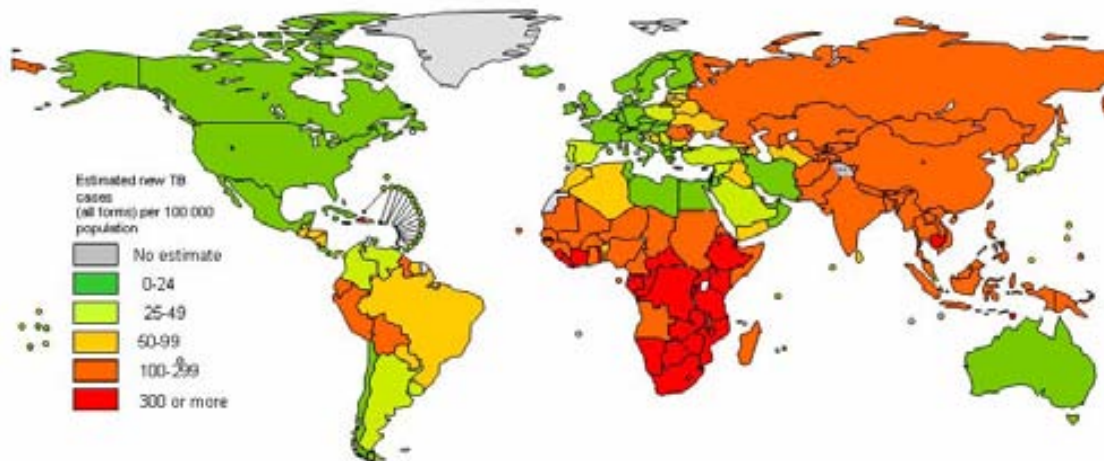
Al 2006 era més o menys estable a la regió europea i disminuïa lentament en tota la resta de regions de l'OMS. El nombre estimat de nous casos fou de 9,2 milions (139 per 100.000 habitants). Tot i la tendència descendent, s'ha detectat un increment en el nombre absolut de casos degut al creixement de la població. L'Índia, Xina, Indonèsia, Sud-àfrica i Nigèria ocupen els cinc primers llocs en xifres absolutes de casos. L'any 2006 la tuberculosi va causar la mort de 1,7 milions de persones, de les quals 200.000 estaven coinfectades amb l'HIV. L'OMS estima que el nombre de casos anuals de tuberculosi multiresistent (MDR-TB) és de 490.000 amb més de 110.000 morts. Cent vuitanta quatre països (abastant el 93% de la població mundial i el 99% de casos de tuberculosi) comptàvem amb la implantació del programa DOTS (apartat 1.3.7.2.1) (248). Els programes nacionals de lluita contra la tuberculosi en 2005-2006 han tingut una qualitat variable, dels 22 països amb alta càrrega de tuberculosi, set tenien plans de reduït abast o encara en desenvolupament.

Ahora, encara no hi ha una ampla disponibilitat de serveis que permetin diagnosticar i tractar la MDR-TB, incloent la extremadament resistent (XDR-TB). Segons dades publicades l'any 2008 per l'OMS s'estima que darrerament cada any apareixen

aproximadament 40.000 casos de pacients amb soques extremadament resistents (XDR) (247).

La pandèmia de l'HIV associada a tuberculosi continua en creixement, sobre tot en les poblacions amb una elevada prevalença de la tuberculosi entre adults joves. De totes les persones infectades de tuberculosi, 1/3 presenten coinfecció, el 70% viuen a l'Àfrica subsahariana i el 20% a l'Àsia. L'HIV és el factor de risc més poderós conegut de passar d'infecció latent a malaltia.

Fig 13: Incidència estimada de tuberculosi, 2005.



A Europa actualment es declaren el 7% dels casos de tuberculosi del món. El 73% de casos pertanyen a Europa de l'est, el 21% a Europa occidental i el 6% restant als Balcans. L'incidència global és 48/100.000, augmentant progressivament de l'oest cap a l'est. Als països industrialitzats les taxes de pacients immigrants augmenten respecte a les d'autòctons. A l'informe emès per *el European Centre for Disease and Control*, Espanya registra 18,3 casos de tuberculosi per cada 100.000 habitants. Amb aquesta taxa es situa en el novè lloc darrera Romania (126,9), Lituània (75,1), Letònia

(58), Bulgària (42), Estònia (34), Portugal (32,4), Polònia (22,5) i Hongria (18,8). Tot i això, l'OMS estima que una tercera part dels casos de tuberculosi a Espanya no es declaren i la taxa real estaria al voltant de 25/100.000 habitants. Segons dades del *Centro Nacional de Epidemiología*, Catalunya encapçala les declaracions en nombre absolut de casos el 2006, i amb una taxa de 21,6/100.000 ocupa el quart lloc darrera Ceuta, Melilla i Aragó. Per a la ciutat de Barcelona la xifra es situa a 27,7/100.000 (15, 76, 117).

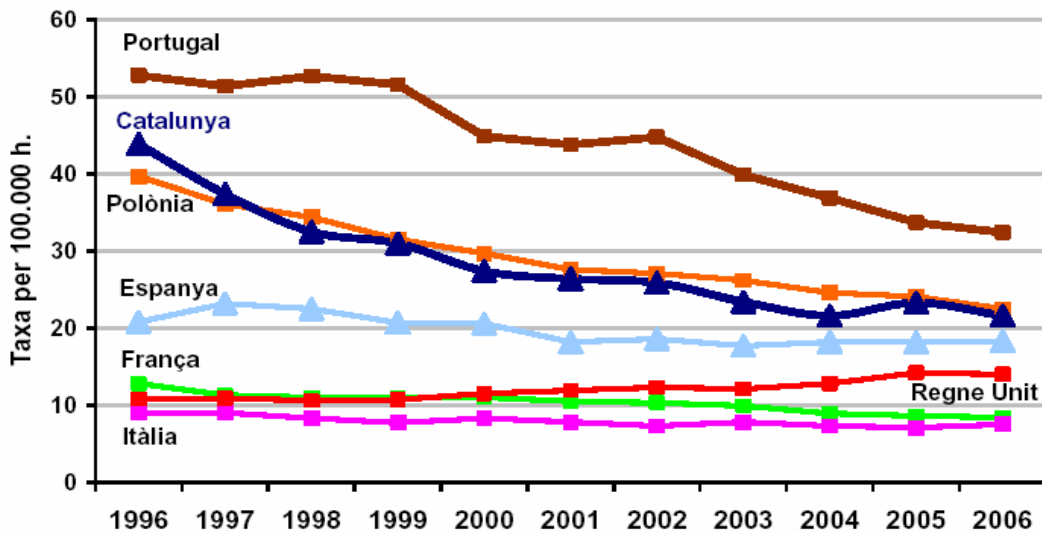


Fig 14: Evolució de la tuberculosi a Catalunya i als països de la Unió Europea (1996–2006)(15).

1.3.2 Transmissió de la tuberculosi

No va ser fins la segona meitat del segle XIX que es va acceptar la naturalesa infecciosa i transmissible de la tuberculosi, gràcies als treballs de Villemain i sobre tot al microbiòleg Robert Koch, descobridor del bacil causant de la malaltia.

Per tal que un agent infeccios sigui transmissible per via aèria cal que estigui suspès a l'aire. *M. tuberculosis* es transmet des d'un pacient amb tuberculosi pulmonar a altres individus susceptibles, a través de petites gotes respiratòries que contenen bacils tuberculosos, i que són aerosolitzades per la tos, l'esternut o la parla (140).



Segons les lleis físiques, una gota cau a terra a una velocitat que és proporcional a la seva superfície o al seu diàmetre quadrat. La velocitat de caiguda de les gotes depèn en gran part dels factors d'humitat i temperatura. En un aire saturat d'humitat totes les gotes, exceptuant les més petites, cauen a terra en menys de 10 segons des de l'altura de dos metres. Així doncs, el temps en que les gotes més grans estan a l'aire és molt curt per a que puguin ser inhalades per una altra persona. La característica més important de les gotes és la seva tendència a evaporar-se. Aquest fenomen provoca la disminució de la seva mida, i és més ràpid com més petites són. Així doncs, les gotes petites cauen lentament i s'evaporen gairebé a l'instant mentre les grans cauen més ràpidament i arriben a terra sense haver perdut aigua de forma apreciable. Aquestes s'evaporen ràpidament disminuint de mida, arribant entre 0,1 i 5 µm de diàmetre, fet pel qual poden romandre suspeses en l'aire durant hores. En cada episodi de tos es poden produir fins a 3500 gotes infeccioses, equivalent a 5 minuts de conversa, mentre que un esternut pot dispersar fins a 1.000.000 de partícules (190).

Per a que es produeixi transmissió és necessari que les partícules contagioses tinguin una mida justa per tal d'arribar als alvèols. Les partícules superiors a 5 µm de diàmetre queden atrapades al nas, contràriament amb el que passa amb les de 0,1 µm, les quals, a més de quedar suspeses a l'aire el temps suficient per a ser inhalades, són capaces d'arribar fins als alvèols.

Els factors determinants més importants de la transmissió són: 1) el grau d'intimitat i la durada del contacte amb un cas índex amb infecció pulmonar per *M. tuberculosis*; 2) el grau i capacitat infectant del cas; 3) l'ambient en el qual es produeix el contacte (82).

1.3.2.1 Transmissió de les soques resistents als fàrmacs antituberculosos

Encara no hi ha una resposta clara davant el dubte si les soques resistents tenen la capacitat disminuïda d'infectar o produir malaltia. Tradicionalment, i sobre tot després dels estudis de Cohn i Middlebrook als anys 50 (156), es pensava que les soques resistents tenien disminuïda la capacitat per a produir infecció, ja que les mutacions

que originen les resistències poden provocar alteracions en la viabilitat metabòlica del micobacteri (*fitness*: habilitat per sobreviure, reproduir-se i transmetre's), malgrat l'efecte de les mutacions compensatòries amb la finalitat de restaurar, o fins i tot, incrementar la viabilitat metabòlica inicial (33).

Inicialment, es va relacionar la pèrdua de la capacitat catalasa-peroxidasa, amb la resistència a la isoniazida i a la disminució de la capacitat de virulència (156). Més tard Zhang i cols. van demostrar que en una proporció significativa d'aquestes soques, la resistència a la INH estava associada a mutacions en el gen *katG* (apartat 1.2.7.1.1) i que la pèrdua de la activitat catalasa-peroxidasa era la responsable de la no transformació de la INH en la seva forma activa (254), associant-se també aquesta mutació a una CIM elevada i amb una disminució de la capacitat de transmissió. Posteriorment, s'han descrit soques sense activitat catalasa-peroxidasa i CIM elevada que no presenten mutacions al gen que codifica per la catalasa, el gen *katG*, suggerint la possibilitat que sigui el grau de resistència i no el lloc de la mutació el factor que determina la capacitat de transmissió de les soques (138).

En estudis fets amb epidemiologia convencional de contactes on es comparaven les proporcions d'infecció en contactes de persones amb soques sensibles i soques resistents, es va observar que la proporció de transmissió era similar. Això posava de manifest la complexitat de la transmissió, que es podria dividir en varies fases: 1) la primera de la transmissió física del bacteri, on el patró de susceptibilitat de la soca no tindria cap paper actiu; 2) una segona fase de latència del bacteri, de contenció per la immunitat local i els mediadors químics; 3) finalment la fase de manifestació de la malaltia. Només quan la infecció progressi, la resposta immune de l'individu i l'agressivitat del bacil hi tindran un paper actiu i determinant (212, 237).

Amb la introducció de l'epidemiologia molecular s'ha pogut avaluar la transmissió relativa dels dos fenotipus comparant, soques sensibles i resistents. Malgrat que en els darrers anys s'han publicat 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 (95, 125, 148, 235, 240, 242, 245). En general, les

dades aportades en aquests estudis indiquen que la transmissió i producció de la malaltia de les soques resistents i sensibles és força similar. Els avenços en el coneixement i detecció de les mutacions associades a la resistència dels fàrmacs antituberculosos, ha permès precisar més en l'estudi, sense arribar però a resoldre la qüestió (184).

1.3.2.2 Detecció de cadenes de transmissió

Identificar cadenes de transmissió és un tasca important per a la prevenció de nous casos. Per a la identificació i confirmació dels enllaços epidemiològics entre els pacients tuberculosos en un àrea determinada, actualment, es combinen eines com l'estudi convencional de contactes i els mètodes de tipificació molecular

1.3.2.2.1 Estudi convencional de contactes (ECC)

L'ECC pretén detectar les persones, contactes, que s'han pogut infectar i/o emmalaltir a partir d'un cas actiu de tuberculosi (cas índex). L'ECC està indicat en tots els malalts tuberculosos i cal que comenci immediatament després del diagnòstic de la malaltia. La finalitat de l'estudi és:

- ❖ Diagnosticar malalts o infectats secundaris al cas índex.
- ❖ Establir el més ràpid possible el tractament a uns i als altres.
- ❖ Reconstruir la cadena de transmissió per identificar, sempre que sigui possible, el cas índex inicial.

Es defineix com un contacte aquella persona que ha mantingut alguna relació amb un malalt tuberculós, independentment del tipus de contacte, que pot ser: 1) íntim: més de sis hores diàries; 2) freqüent: menys de 6 hores diàries; 3) esporàdic: no diari (243). En l'ECC s'aplica el sistema de cercles concèntrics (figura 15). L'estudi s'inicia en el primer cercle on s'investiguen les persones que tenen un risc més elevat, es a dir, aquelles que conviuen amb un contacte íntim amb el cas índex. Si es troben casos secundaris, l'estudi prossegueix en el segon cercle on s'estudien els contactes

freqüents, i finalment, en el tercer cercle s'estudiaran els contactes definits com esporàdics. Si en algun dels cercles es detecta un nou cas, cal tornar a començar un nou ECC agafant com a punt d'inici aquest nou cas.

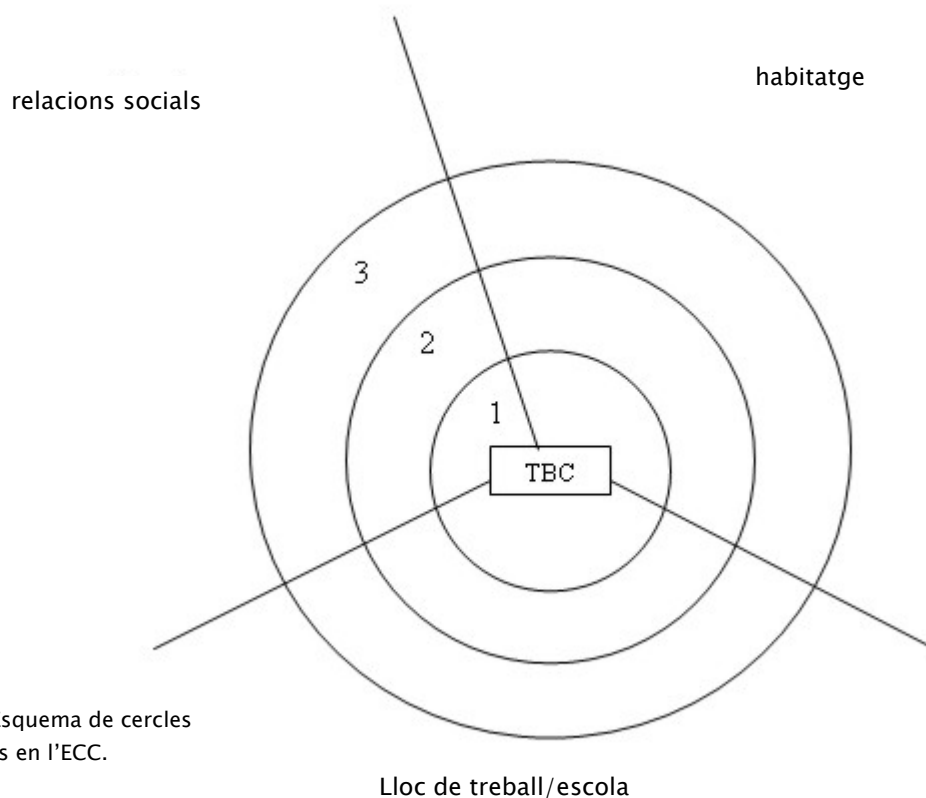


Fig 15: Esquema de cercles concèntrics en l'ECC.

El ECC està subdividit en cinc etapes:

- I. Conèixer les característiques dels malalts i els contactes, identificant els riscos d'infecció que han patit.
- II. Crivell tuberculínic dels contactes.
- III. Diagnòstic, tractament i seguiment dels contactes infectats o malalts.
- IV. Control de contactes i recuperació dels que han acabat el tractament.
- V. Finalització de l'estudi i avaluació.

1.3.2.2.2 Epidemiologia molecular (EM)

Els estudis epidemiològics pretenen detectar la disseminació de determinades soques de microorganismes, ja sigui en un període de temps curt (detecció de brots) o en un temps llarg (epidemiologia entre diferents zones geogràfiques o al llarg dels temps). Sorgeix en la integració de l'epidemiologia, la biologia molecular, la medicina clínica i l'estadística per establir els factors que condicionen la patogènia d'una infecció, la seva propagació i distribució en el temps i en l'espai (149).

La tècnica de tipificació ideal ha de ser ràpida i simple, amb un poder discriminatiu suficientment elevat com per a poder considerar com a idèntiques a aquelles soques amb un avantpassat recent i comú (clona), i diferents a aquelles que presenten un avantpassat comú però allunyat en el temps. Es a dir, el rellotge evolutiu d'un marcador ha de ser el suficient ràpid per a distingir entre els casos no relacionats epidemiològicament i el suficient lent per identificar els membres d'una cadena de transmissió activa. És important conèixer l'estructura genètica de la població per a poder interpretar de forma adequada els resultats obtinguts (141). En general, s'accepta que el poder discriminatiu d'una tècnica és adequat quan la probabilitat de què dues soques no relacionades siguin considerades idèntiques és inferior al 5%. L'eficàcia d'un marcador epidemiològic es mesura en funció de l'estabilitat, tipabilitat i reproductivitat.

Les tècniques moleculars més emprades per a determinar la clonalitat dels aïllaments simultanis estan basades en l'estudi de determinades regions del genoma amb una variabilitat elevada, la qual s'acumula evolutivament de forma molt ràpida i, en general, per raons desconegudes. Entre elles cal destacar la macrorestricció genòmica seguida d'electroforesi amb alternança de camps (PFEG), patrons de restricció revelats mitjançant hibridació amb sondes complementàries de seqüències repetides, els polimorfismes d'amplificació i els polimorfismes de seqüenciació (56).

La gran homogeneïtat del genoma de *M. tuberculosis* fa que les tècniques més emprades en l'epidemiologia molecular de la tuberculosi siguin l'estudi de regions repetides i recombinants del cromosoma. Aquestes regions o elements es poden classificar en dues categories:

- 1) Elements genètics amb capacitat de transposar, es a dir, amb capacitat de separar-se i integrar-se en el genoma independentment del sistema de recombinació de l'hoste com ho són les seqüències d'inserció (IS) (141). L'anàlisi de seqüències d'inserció del DNA repetides presents en el genoma en nombre i localització variable, va conduir a la identificació de distintes IS (63) , en concret va ser identificada la *IS6110* (1.355pb) específica de tots els membres del complex *M. tuberculosis* (46).

- 2) Seqüències extragèniques no codificants, amb funcions diferents no sempre ben conegudes.

Els marcadors moleculars presenten una sèrie de limitacions per a la identificació de cadenes de transmissió. Sobreestimant, quan la població estudiada presenta poca diversitat (limitació important en el cas de la tècnica de tipificació de l'oligonucleòtid separador (*spoligotyping*)), fet que es pot donar en poblacions amb comunitats aïllades amb escassa arribada de soques noves. I també, el fet de subestimar la transmissió recent quan la definició d'agrupació és estricta i l'exigència d'identitat de patrons fa que es perdin elements de la cadena en els que hi ha hagut una microevolució del marcador i, tot i tenir un patró molt similar, aquest no serà idèntic. L'EM presenta dues limitacions important respecte a l'ECC, la temporoespacial i la necessitat del diagnòstic microbiològic per a la tipificació de la soca. D'altra banda, es conegut que els ECC corroboren només entre un 20 i 30% de les relacions establertes mitjançant EM. Aquesta imprecisió dels ECC és deguda, en part, a patrons de transmissió complexes on els contactes causals poden jugar un paper important. Sovint els pacients agrupats per l'EM comparteixen dades demogràfiques o factors de risc.

L'epidemiologia molecular permet:

- ❖ L'estudi d'epidèmies: totes les soques que integren una cadena de transmissió seran idèntiques des del punt de vista molecular.
- ❖ Transmissió en poblacions: els estudis de poblacions evidencien la diversitat genètica de les soques de *M. tuberculosis* en diverses poblacions de diferents àrees geogràfiques. L'ús de tècniques de tipificació molecular per a identificar cadenes de transmissió de la tuberculosi esta fonamentat en el fet que els malalts relacionats epidemiològicament desenvolupen la malaltia com a conseqüència d'una infecció adquirida recentment d'una altra persona malalta. Així doncs les seves soques tindran un patró molecular idèntic, formant les anomenades agrupacions o clústers, representant la transmissió recent del bacil i progressió ràpida cap a la malaltia. Per contra, els pacients no relacionats epidemiològicament amb altres individus, i que la seva malaltia és fruit de la reactivació d'una infecció latent tindran un patró molecular únic. Així doncs, conjuntament amb els ECC aquest estudis permeten establir cadenes de transmissió i lligams entre els malalt que les constitueixen.

La combinació entre l'ECC i l'EM no sembla tant directa com es podria esperar. En les agrupacions establertes mitjançant l'EM, la proporció de lligams confirmats per l'ECC varia molt en diferents estudis, des d'un 10% al 83%, tot passant per valors intermedis (210, 242). Sembla que compartir un mateix patró molecular no significa necessàriament que hi hagi un lligam epidemiològic clar. No sempre l'ECC pot determinar la transmissió entre contactes esporàdics, i en malalts amb el mateix patró que el cas índex, no s'estableix una relació clara fent difícil el completar la cadena de transmissió. Treballs realitzats en àrees rurals observen patrons compartits en malalts geogràficament dispersos, sense evident contacte previ (34, 95, 173). El fet que algunes de les soques circulants en una zona geogràfica concreta (soques endèmiques), siguin més prevalents que altres, pot portar a interpretacions epidemiològiques errònies, assignat lligams no reals. Sovint, pacients que

comparteixen patrons però no es troben relacionats per l'epidemiologia de camp, solen formar part de grups de risc per a la transmissió de la tuberculosi.

Les principals aplicacions de la EM són les següents:

- ❖ Definir en una població els factors de risc per a la transmissió activa
- ❖ Seguiment de la difusió de soques d'interès epidemiològic: diverses soques identificades en epidèmies s'han associat a grans agrupacions àmpliament disseminades tant geogràficament com en el temps.
- ❖ Diferenciar la reinfecció exògena de la recidiva en un malalt concret. La possibilitat de la reinfecció té una relació directament proporcional amb la prevalença de la malaltia a la població de referència. Zones amb alta prevalença presenten un major risc per a una reinfecció, mentre que en zones amb baixa prevalença la reinfecció sol anar associada a pacients amb factors de risc associats com ara l'alcoholisme, indigència, ús de drogues, pacients amb la SIDA. Diversos estudis d'EM han demostrat que la reinfecció exògena de tuberculosi es dona tant en les zones de baixa incidència com en les d'alta incidència, però de forma menys freqüent (21).
- ❖ Detectar contaminacions creuades al laboratori de microbiologia: l'aïllament de *M. tuberculosis* en pacients sense signes ni símptomes de la malaltia han de fer pensar en una contaminació creuada la laboratori. Cal comparar la soca problema amb soques d'altres pacients les mostres dels quals s'han processat el mateix dia.

1.3.2.2.1 Tècniques de tificació molecular

- ❖ **Polimorfismes en la longitud dels fragment de restricció associat a IS6110.**
(Restriction fragment length polymorfism: RFLP) Tècnica de referència

El mètode de tipificació per a *M. tuberculosis* més emprat i estandarditzat és la tècnica coneguda com RFLP associada a la seqüència IS6110 (241). És un element genètic de 1355pb mòbil, que està present en diferent nombre de còpies (entre 0 i 25) i en

diferents llocs en el genoma de *M. tuberculosis* complex. Aquestes variacions són la base del polimorfisme que sovint és utilitzat en la tipificació de *M. tuberculosis* complex per diferents tècniques.

L'estudi d'aquestes seqüències d'inserció consisteix en analitzar els patrons de restricció-hibridació (RFLP) associats a *IS6110*, existint un protocol estandarditzat (239). L'anàlisi dels patrons de bandes es fan mitjançant softwares específics (BioImage Whole Band Analyzer, Millipore Corporation, Ann Arbor, MI, USA i Gelcompar Applies Maths Kortrijk, Belgium) (94), que permeten comparar els resultats obtinguts en diferents laboratoris a escala internacional. Les soques sense relació epidemiològica presenten patrons de bandes diferents, mentre que les soques relacionades presenten patrons idèntics. Aquest marcador es considera estable i, en aquelles soques amb més de 6 bandes, presenta un poder discriminatiu molt elevat tant pel nombre de còpies com per la localització (56, 121, 142, 161).

❖ **Tipificació de l'oligonucleòtid separador (*Spacer oligonucleotide typing* (*Spoligotyping*))**

Es basa en la detecció de la presència o absència de seqüències separadores conegudes de 34 a 41 pb, entre les múltiples còpies de les seqüències curtes DR (Direct Repeat) que estan organitzades en un locus cromosòmic únic del complex *M. tuberculosis* (118).

La tècnica es basa en utilitzar iniciadors homòlegs a la seqüència DR per poder amplificar les seqüències separadores. Una única hibridació per soca, amb els diferents oligonucleòtids complementaris a aquestes seqüències separadores, permet obtenir uns patrons comparables mitjançant softwares específics. El polimorfisme que es detecta ve determinat pel número de DR i per tant per la presència o absència de seqüències separadores concretes i és degut, probablement, a la recombinació homòloga entre DR propers o distants i a les reorganitzacions que provoca l'*IS6110*, present en la regió DR de la majoria de soques de *M. tuberculosis* (99).

Tot i que el seu poder discriminatiu és menor que el de la tècnica *IS6110*-RFLP, presenta tres grans avantatges: 1) és una tècnica ràpida, basada en la PCR, aplicable en la mostra clínica, per tant de gran utilitat en la detecció de brots; 2) serveix per identificar i tipificar de forma simultània diferenciant entre *M. bovis* i *M. tuberculosis*; 3) la descripció de noves seqüències separadores ha de permetre, en un futur, incrementar el seu poder discriminatiu.

❖ **Analísi del polimorfisme d'un sol nucleòtid (*single nucleotide polymorphism* SNPs)**

El fet que genoma de *M. tuberculosis* estigui molt conservat fa que variacions a nivell d'un sol nucleòtid puguin ser utilitzades per estudiar relacions filogenètiques entre soques clíniques. Són útils tant els polimorfismes d'un sol nucleòtid sinònims (sSNP) com els no sinònims (nsSNP), tot i que cadascun aborda qüestions biològiques diferents.

Els sSNP són neutres, sense canvi aminoacídic, útils per als estudis de genètica poblacional. Diversos estudis amb sSNP han contribuït a aclarir les relacions filogenètiques entre soques i també han estat útils per a mostrar el comportament epidemiològic dels diferents llinatges en diferents poblacions humanes (8, 19, 101, 102, 215). Alhora, donar informació sobre múltiples dianes és útil en: agrupació filogenètica, resistència a antibiòtics i virulència.

Els nsSNP provoquen canvis aminoacídics i per tant estan subjectes a la pressió selectiva interna i externa. Són útils per a l'estudi del loci genètics que determinen resistència als antibiòtics (150, 184, 188).

❖ **Polimorfisme en el nombre de repeticions en tàndem (*Variable numbers of tandem repeats* (VNTR))**

El mètode es fonamenta en la detecció del nombre de seqüències repetides en tàndem (87). Són analitzats dos tipus diferents de tàndem, el MPTR (*major polymorphic tandem repeat*) i ETR (*exact tandem repeat*). Els productes de la PCR de les seqüències repetides en tàndem es seqüencien per a revelar el nombre de tàndems repetits i la mida dels segments de DNA localitzats a ambdues bandes dels tàndems. És una tècnica altament reproduïble amb baix poder discriminatiu respecte al RFLP-*IS6110*. S'utilitza en estudis de epidemiologia en combinació amb altres mètodes.

❖ **Unitat repetitiva intercalada micobacteriana. (*Mycobacterial interspersed repetitive units* (MIRU))**

És un mètode similar al VNTR. En tot el genoma de *M. tuberculosis* s'han identificat 41 seqüències repetides en tàndem (220), 12 d'aquestes són suficientment variables en el nombre de repeticions per a que puguin ser utilitzades com un marcador epidemiològic. L'amplificació per PCR de cada MIRU genera fragments de diferent mida. Aquests fragments són mesurats determinant-se el nombre de repeticions de cadascun dels locus. D'aquesta manera, cada tipus de soca té assignat un nombre de 12 dígits corresponent al nombre de repeticions de cada locus MIRU (figura 16) (151). L'any 2006 es va incrementar la resolució de la tècnica afegint 3 locus més. (MIRU15)(219).

❖ **Anàlisi de delecions genètiques**

L'anàlisi comparativa de les soques H37rv i CDC1551 ha posat de manifest polimorfismes de seqüència llarga (*large-sequence polymorphisms* [LSP]) a banda dels SNP (86). Es creu que LSP ocorre principalment com a resultat de delecions genòmiques i redisposicions més que degut a recombinacions horitzontals. Les delecions són irreversibles i sovint esdeveniments únics i per això el seu anàlisi ha estat proposat per a la genotificació i per estudis de filogènia, evolució, interaccions

hoste-patògen, i epidemiologia molecular (35, 96, 236). Permeten el disseny de micromatrius amb la conseqüent alta productivitat que això suposa i amb força poder discriminatiu, encara però, no estan estandarditzades.

❖ **Mapejat i tipificació dels llocs d'inserció** (*Insertion site mapping* (ISM) i *insertion site typing* (Insite))

Són tècniques basades en el coneixement dels encreuaments de la seqüència d'inserció *IS6110* i de les regions que la flanquegen. Són tècniques precises per a la determinació de la relació entre soques, útils en estudis filogenètics i epidemiologia molecular. Presenten el desavantatge de ser molt laborioses.

❖ **Polymorphic GC-rich sequence-RFLP (PGRS)**

La PGRS és una seqüència curta (30pb) rica en guanines i citosines present en múltiples còpies en el genoma de *M. tuberculosis* (>100) i altres micobacteris. La regió PGRS s'ha utilitzat com una sonda per a la caracterització de soques de *M. tuberculosis* principalment en aquelles que posseeixen menys de 6 còpies d'*IS6110*. El mètode és similar a RFLP-*IS6110*, es diferencia principalment en la sonda utilitzada (PGRS) i en l'enzim de restricció utilitzat el *AclI* (103, 181, 182, 192). La PGRS té una alta estabilitat. L'obtenció d'un nombre elevat de bandes fa que sigui difícil confeccionar una base de dades internacional, i la comparació entre soques és difícil.

❖ **Mixed-linker PCR**

Es tracta d'un mètode desenvolupat immediatament després de la estandardització de la RFLP-*IS6110*, basat en el polimorfisme d'aquest mateix element. La tècnica inclou a més una amplificació, un lligament (103). Utilitza l'enzim de restricció *HhaI*. És una tècnica més ràpida que el RFLP-*IS6110* però igualment laboriosa. Al ser una tècnica poc utilitzada no es disposa de base de dades internacionals.

❖ **IS6110–Ampliprinting**

Aquest mètode detecta les diferències en la distància entre els marcadors IS6110 i MPTR, utilitzant una PCR–interna (*nested*-PCR) unilateral i analitzant els resultats mitjançant una hibridació. Té un poder discriminatiu limitat (180).

❖ **IS6110–PCR – IS6110 PCR inversa**

La metodologia emprada inclou una amplificació directa per PCR en el primer cas i una amplificació, digestió i lligament en el segon cas. El marcador epidemiològic és l'IS6110 (169).

❖ **Double repetitive elements–PCR (DRE–PCR)**

És un mètode ràpid basat en l'amplificació de regions localitzades entre dos elements repetitius i el nombre de còpies d'IS6110 i PGRS. La distància entre els elements repetitius i el nombre de còpies d'IS6110 i PGRS varia de soca a soca, donant un únic patró de bandes. Té un alt poder de discriminació, però és poc reproducible (124).

❖ **Polimorfisme de la mida dels fragments d'amplificació fluorescents (*Fluorescent amplified–fragment length polymorphism (FAFLP)*)**

Amb aquesta tècnica s'examina aproximadament el 0,1% de tot el genoma. No està associada al polimorfisme de cap element genètic. El polimorfisme es basa en el lloc on els enzims de restricció tallen el genoma. En aquest mètode els iniciadors de la PCR estan marcats amb una molècula fluorescent i la visualització dels fragments es realitza automàticament amb un seqüenciador de DNA (97).

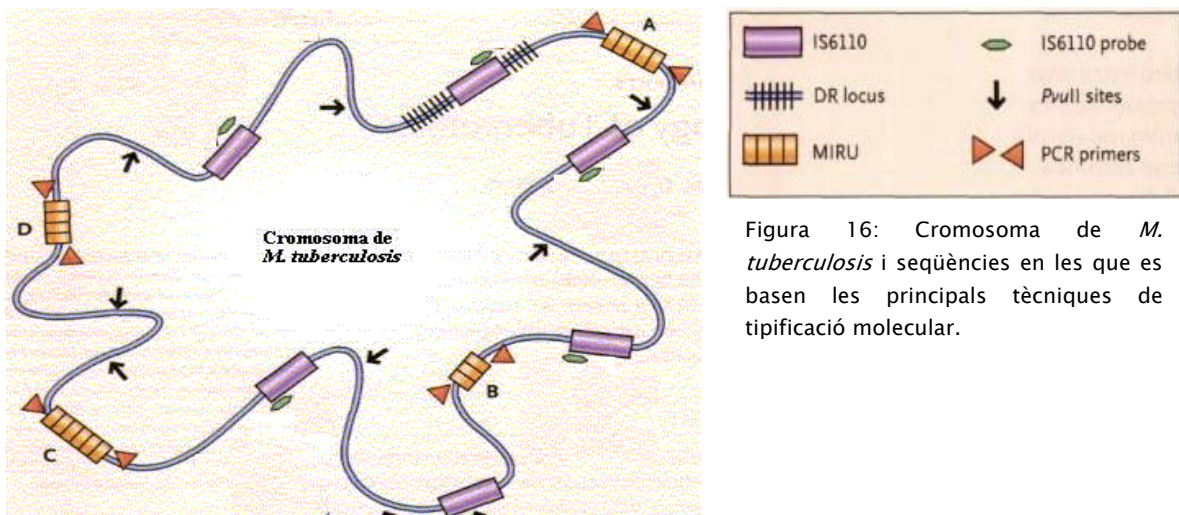


Figura 16: Cromosoma de *M. tuberculosis* i seqüències en les que es basen les principals tècniques de tipificació molecular.

Taula 7: Avaluació de les tècniques més utilitzades en epidemiologia molecular.

Tècnica	Seqüència diana	avantatges	Limitacions	comentaris
<i>IS6110</i> RFLP	<i>IS6110</i>	<p>Tècnica de referència.</p> <p>Patrons informatitzables amb software especialitzats.</p> <p>Extensament utilitzat, milers de dades disponibles.</p> <p>Relotge biològic provadament adequat per a l'estudi de transmissió.</p> <p>Extensa diversitat en patrons de soques amb >6 bandes.</p> <p>Les membranes poden ser rehibridades amb altres sondes.</p> <p>Detecció d'infeccions mixtes detectables per la variable intensitat de la hibridació de les bandes.</p> <p>Aplicacions en epidemiologia molecular, evolució i filogènia, detecció de contaminació creuada al laboratori.</p>	<p>Requereix subcultius abundants.</p> <p>per a l'extracció de suficient DNA. Requereix molt temps (30–40 dies).</p> <p>Laboriós.</p> <p>No és discriminativa en soques que tenen < de 6 bandes.</p> <p>Comparativa interlaboratori molt laboriosa</p> <p>Soques sense IS6110 (rar).</p>	<p>Primer mètode estandarditzat.</p> <p>Tècnica basada en la hibridació <i>Southern blot</i>.</p> <p>Individualment és la tècnica més discriminativa per soques amb > 6 bandes.</p> <p>Millors resultats en anàlisi de soques W-Beijing.</p> <p>La transposició i/o deleció de l'IS6110 són sempre unidireccionals i poden ser considerats indicadors d'evolució divergent.</p> <p>Existència de zones calentes (<i>hot spot</i>) per a la inserció.</p> <p>Es combinable amb altres tècniques per als estudis filogenètics.</p> <p>Es pot combinar amb altres marcadors per incrementar la resolució en soques amb ≤ 6 bandes.</p>
<i>Spoligotyping</i>	DR/separadors	<p>És la tècnica més senzilla per a genotipificar soques de <i>M. tuberculosis</i> complex.</p> <p>Les dades es presenten en format binari facilitant la comparació inter-laboratori.</p> <p>Membranes d'hibridació comercialitzades per a 45 mostres simultànies</p> <p>Anàlisi estandarditzat per a 43 separadors.</p> <p>Realitzable directament amb lisats cel·lulars sense requerir la purificació del DNA.</p> <p>Es pot fer amb bacteris no viables.</p> <p>Disponibilitat de dues amplies bases de dades per anàlisi comparatives (SPOTCLUST i SpolDB-.SITVIT).</p> <p>Aplicable com a primer pas en l'anàlisi de <i>M. tuberculosis</i> en regions amb poblacions diverses; epidemiologia molecular, detecció de contaminació creuada al laboratori.</p>	<p>Menys discriminativa que IS6110 RFLP i MIRU-VNTR (12 i 15 locus).</p> <p>No reconeix infeccions mixtes.</p> <p>Poc informativa en regions amb soques endèmiques predominants (p.ex.:W-Beijing a Xina, Sud Est asiàtic, Rússia).</p>	<p>Basat en tècniques d'amplificació-hibridació.</p> <p>Utilitzat ampliament per estudis filogenètics.</p> <p>Les relacions establertes de manera equivocada poden estar basades en la evolució convergent de les soques. Els mateixos patrons es poden trobar en diferents branques evolutives (el mateix separador es pot perdre de forma independent en diferents llinatges).</p> <p>SPOTCLUST pagina web per a l'anàlisi d'espilogofamílies (http://cgi.cs.rpi.edu/~vitoli/SPOTCLUST.html)</p> <p>Bases de dades SpolDB4 i SITVIT</p> <p>http://pasteruguadeloupe.fr:8081/SITVITDemo</p>

Introducció. La tuberculosi

Tècnica	Seqüència diana	Avantatges	Limitacions	Comentaris
MIRU-VNTR (12 locus)	MIRU	<p>Ràpida, amb alta productivitat per al genotipatge de <i>M. tuberculosis</i>.</p> <p>Millor resolució que l'spoligotyping.</p> <p>Resultats digitalitzats.</p> <p>Adequat per a genotipats a gran escala.</p> <p>Realitzable directament amb lisats cel·lulars sense requerir la purificació del DNA.</p> <p>Anàlisi manual per a 12 amplificacions per PCR individuals seguit per una electroforesi en gel.</p> <p>Possibilitat d'anàlisi automatitzada amb iniciadors de PCR marcats amb fluorescència.</p> <p>Iniciadors marcats permeten multiplex-PCR.</p> <p>Es pot utilitzar per identificar infeccions mixtes.</p> <p>Aplicable en epidemiologia molecular.</p>	<p>Menys discriminatori que l'IS6110-RFLP.</p> <p>Rellotge biològic massa lent per l'estudi de soques endèmiques.</p> <p>Poden trobar-se patrons similars en diferents llinatges.</p>	<p>Tècnica basada en la amplificació-electroforesi.</p> <p>Cada locus té un rellotge molecular diferent.</p> <p>Es pot utilitzar en estudis de evolució genètica.</p>
MIRU-VNTR (15 locus)		<p>Incrementa la resolució respecte a MIRU-VNTR 12 loci (comparable a IS6110 RFLP).</p>		<p>Pot ser útil en el futur per a la tipificació a gran escala.</p> <p>Els 15 loci han estat seleccionats de 29 estudiats.</p>
SNPs	nsSNP i sSNP	<p>Dóna la informació més precisa sobre les soques.</p> <p>Alta resolució.</p> <p>Pocs SNP seleccionats poden ser altament informatius.</p> <p>Automatitzable per genotipificar a gran escala.</p> <p>Aplicable a filogenètica, epidemiologia molecular, estudis de resistència als antibiòtics, i en la recerca de interaccions hoste-patògen.</p>	<p>Requereix la seqüenciació de múltiples dianes cromosòmiques</p>	<p>sSNP no suposa un canvi aminoacídic i no està associat a pressió selectiva; per això és ideal per estudis de genètica poblacional.</p> <p>nsSNP suposa un canvi aminoacídic i subjecte a pressió selectiva; pot ser utilitzat per a l'estudi de loci genètics que determinen resistència als antibiòtics.</p>

1.3.3. Evolució del complex *M. tuberculosis*

El complex *M. tuberculosis* inclou espècies amb seqüències nucleotídiques molt similars, acostant-se al 100% d'identitat en alguns gens estructurals com ara el que codifica per a la 16S rRNA, però es diferencien per la seva patogenicitat i hostes.

M. canettii, *M. africanum* i *M. tuberculosis* estan limitades a humans, mentre que *M. microti* infecta a rosegadors, *M. caprae* fonamentalment a bòvids, encara que excepcionalment s'han descrit en humans, i *M. bovis* presenta un espectre més ampli d'hostes, des dels bòvids als humans.

Inicialment es creia que *M. tuberculosis* podia haver evolucionat a partir de *M. bovis* mitjançant l'adaptació del patogen bòvid als humans durant la domesticació (217). Actualment aquesta hipòtesi no sembla consistent amb l'evolució humana, ja que hi ha un decalatge de 10.000 anys entre l'inici de la domesticació dels bòvids i l'inici estimat de la diversificació a partir de l'antecessor comú del complex *M. tuberculosis*. La seqüenciació total del DNA de *M. tuberculosis* (54) mostra que les espècies del complex *M. tuberculosis* es diferencien per la presència o absència de determinats fragments de DNA de mida entre 2 i 12,7 Kb cadascuna, anomenades regions de diferenciació (RD), i la deleció específica de TbD1 al genoma de *M. tuberculosis* H37Rv i present als altres membres del complex (36).

Basant-se en la presència o absència de la regió TbD1 es pot dividir les soques del complex en antigues, amb la TbD1 conservada, i modernes, amb la TbD1 delecionada. Les diferents troballes sembla que condueixen a que *M. bovis*, *M. africanum* i *M. microti* probablement pertanyin a un llinatge evolucionat, caracteritzat per la deleció de la RD9, exclouent la possibilitat de que *M. tuberculosis* hagi evolucionat a partir de *M. bovis* (figura 17) (35).

Estudis de filogènia poblacional basats en diferents marcadors genètics, suggereixen l'existència de varis llinatges de *M. tuberculosis* adaptats a poblacions humanes particulars i que, malgrat la migració i conseqüent dispersió de les soques de *M.*

tuberculosis, l'associació sembla ser estable, suggerint la possibilitat de la coevolució hoste- patogen (19, 88, 106).

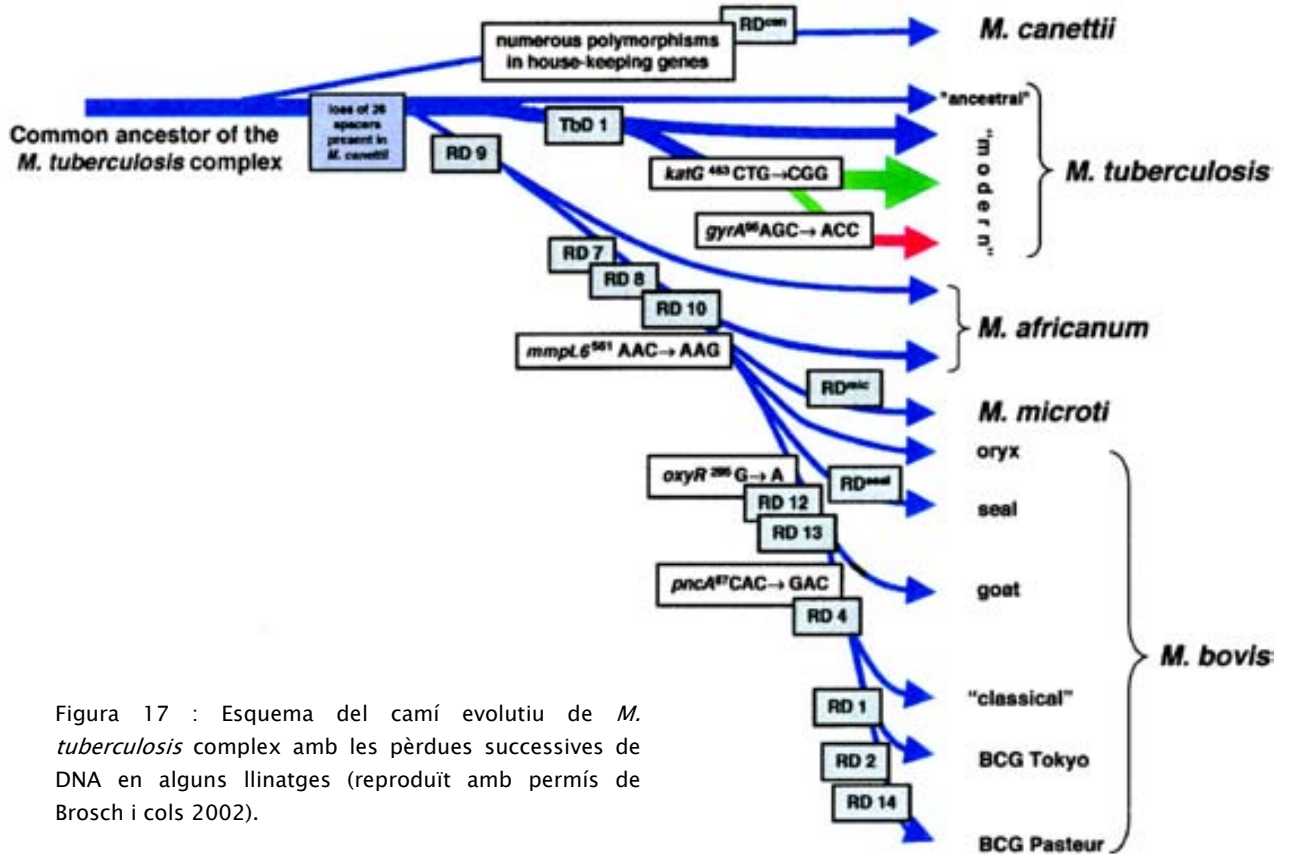


Figura 17 : Esquema del camí evolutiu de *M. tuberculosis* complex amb les pèrdues successives de DNA en alguns llinatges (reproduït amb permís de Brosch i cols 2002).

Marcadors com SNPs, VNTRs, LSPS i MIRU, utilitzats per a l'anàlisi filogeogràfic de la distribució de *M. tuberculosis* i l'anàlisi de les regions DR mitjançant l'*spoligotyping* han permès la construcció d'una base de dades internacional, SpolDB4, permetent la identificació i distribució geogràfica específica dels diferents llinatges de *M. tuberculosis*. (figura 19). Un estudi filogenètic recent realitzat per Filliol i cols., analitza 212 SNPs d'un total de 327 d'aïllaments clínics amb representació d'arreu del món, definint 6 grups (SCG (SNP cluster group)) del SCG1 al SCG6 i cinc subgrups, que han mostrat una bona correlació amb l'*spoligotyping* (40, 84). A la taula 8 es mostren els principals llinatges i subllinatges, la seva distribució geogràfica i la correlació amb els SCG definits per Filliol i cols., correlació que també es veu reflectida

a la figures 20a i 20b, la primera mostra l'arbre filogenètic obtingut amb l'anàlisi dels SPNs i la segona la seva correlació amb els espoligotips.

taula 8: Principals llinatges i subllinatges i la seva distribució geogràfica prevalent.

Llinatge	Subllinatge	SCG (filliol 2006)	Prevalent a	
EAI (east-african-indian)	EAI2- <i>Nonhaburi = Manilla</i>	SCG1	Sud est asiàtic, Àfrica de l'est i Sud de l'Índia	
	EIA6- <i>Bangladesh/1</i>			
	EIA7- <i>Bangladesh/2</i>			
	EAI8- <i>Madagascar</i>			
Beijing		SCG2	Sud est asiàtic Xina, Rússia i Japó.	
CAS (Central Asian)	CAS1- <i>Kili (Kilimanjaro)</i>	SCG 3a	Nord de la India, Pakistan. Líbia i Sudan	
	CAS1- <i>Dar (Dar-es-Salam)</i>			
Bovis		SCG7	Ubiqua	
Haarlem	H1,H2,H3, H4	SCG3b	Nord i Est d'Europa, Carib i Àfrica central i Iran	
X	X1	SCG 3c	Regne Unit, USA, antigues colònies Britàniques. Mèxic	
	X1,X2,X3	SCG 4		
LAM (Latin American and Mediterranean)	LAM 1	SCG 5	Països mediterranis, Amèrica Llatina i Àfrica	
	LAM 2			
	LAM 3			
	LAM 4			
	LAM 5			
	LAM6			
T (soques "modernes" de <i>M. tuberculosis</i>)	Miscel·lània de >600 STs inclassificats i alguns STs estratificats en subgrups.		SCG 6	Ubiqua
	T1- <i>Russia/2</i>	T4- <i>Central Europe/1</i>		
	T2- <i>Uganda</i>	T5-Madrid/2		
	T3- <i>Ethiopia</i>	T5- <i>Russia/1</i>		
	T3- <i>Osaka</i>	<i>Tuscany</i>		

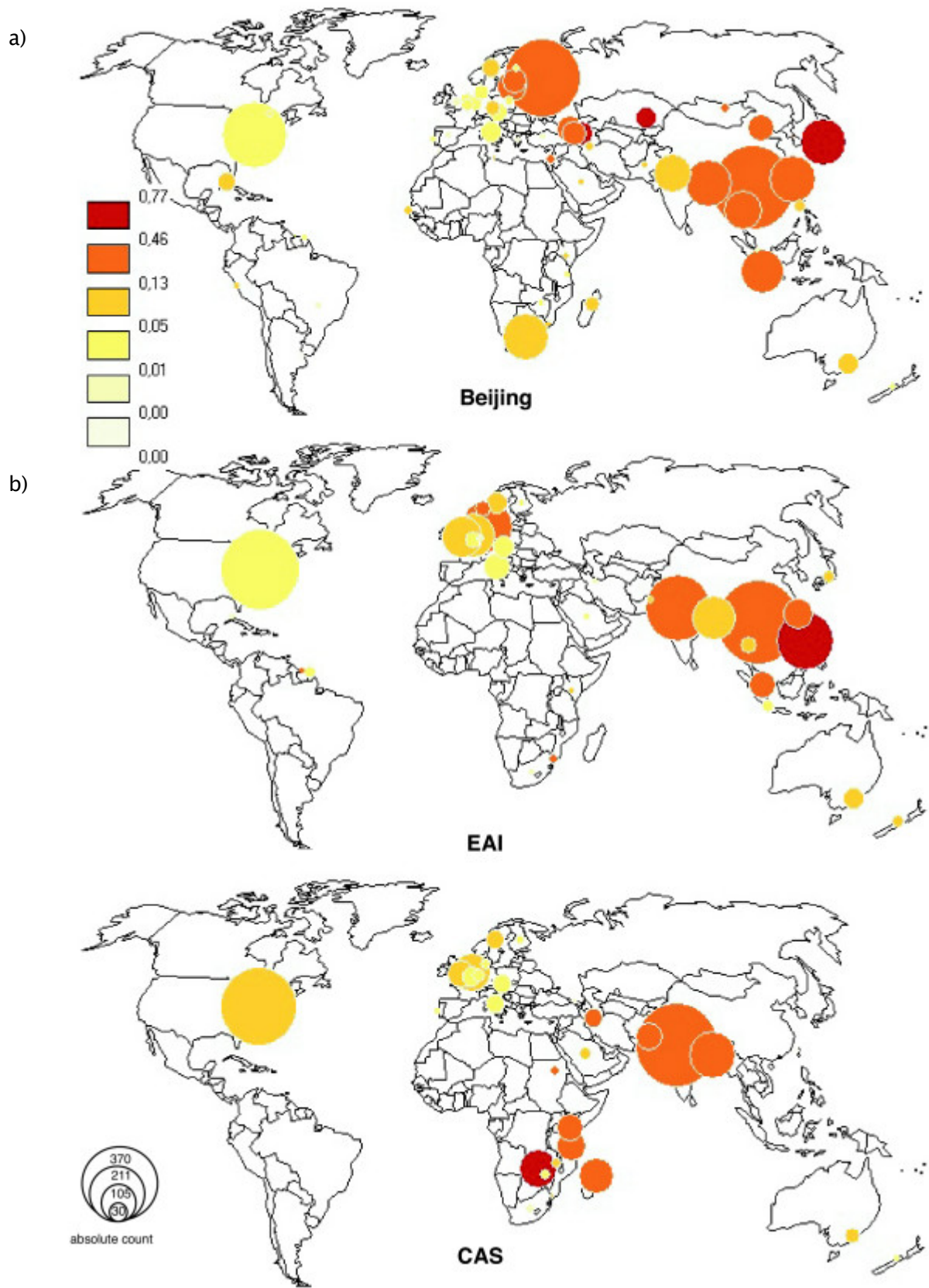
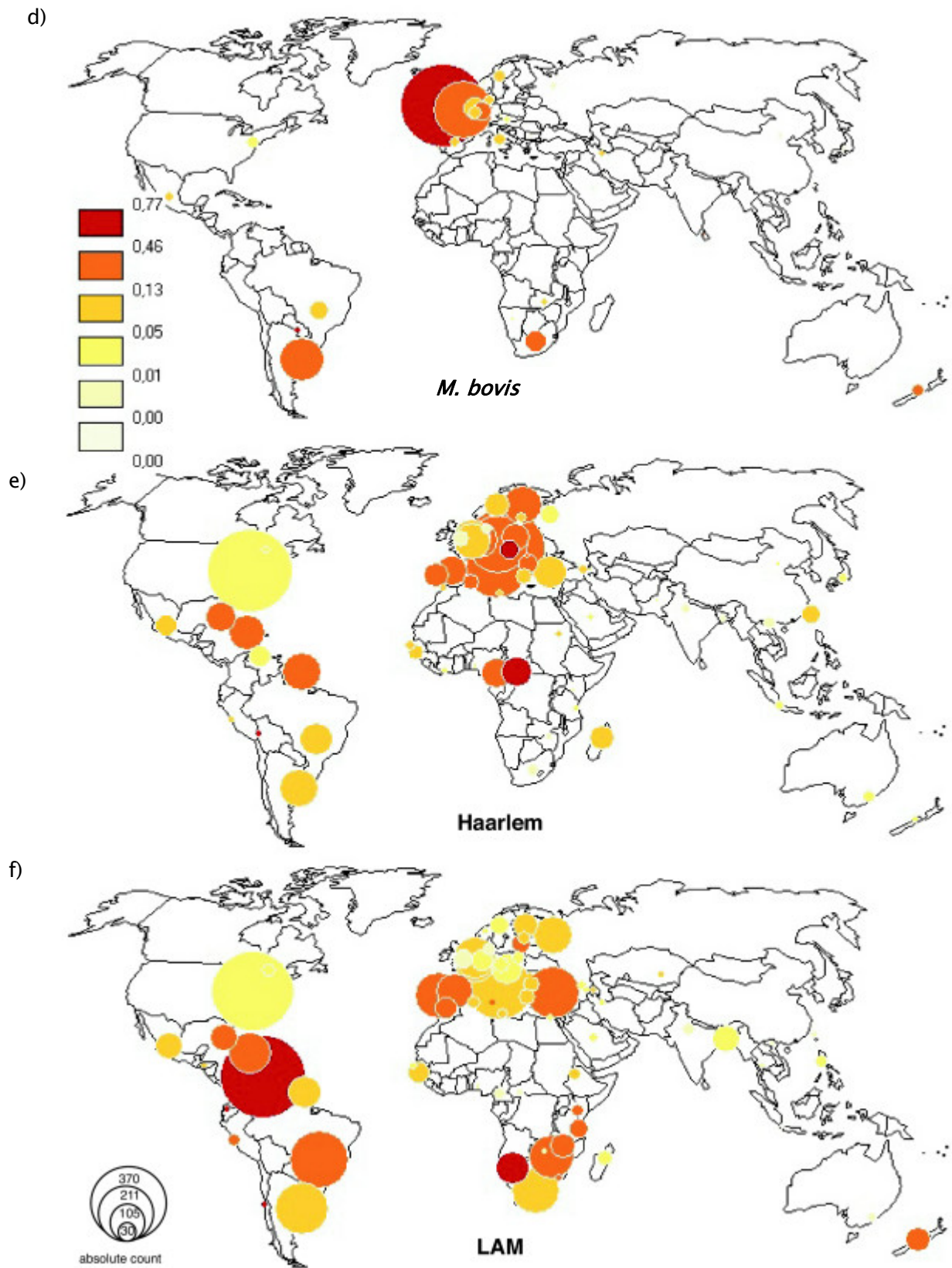


Figura 19: Distribució mundial dels principals llinatges de *M. tuberculosis* complex. a) *Beijing* b) *East-American.Indian* (EAI). c) *Central Asian* (CAS) d) *M. bovis* e) *Haarlem* f) *Latin American and Mediterranean* (LAM). (Reproduït amb permís de Brudey i cols. 2006)



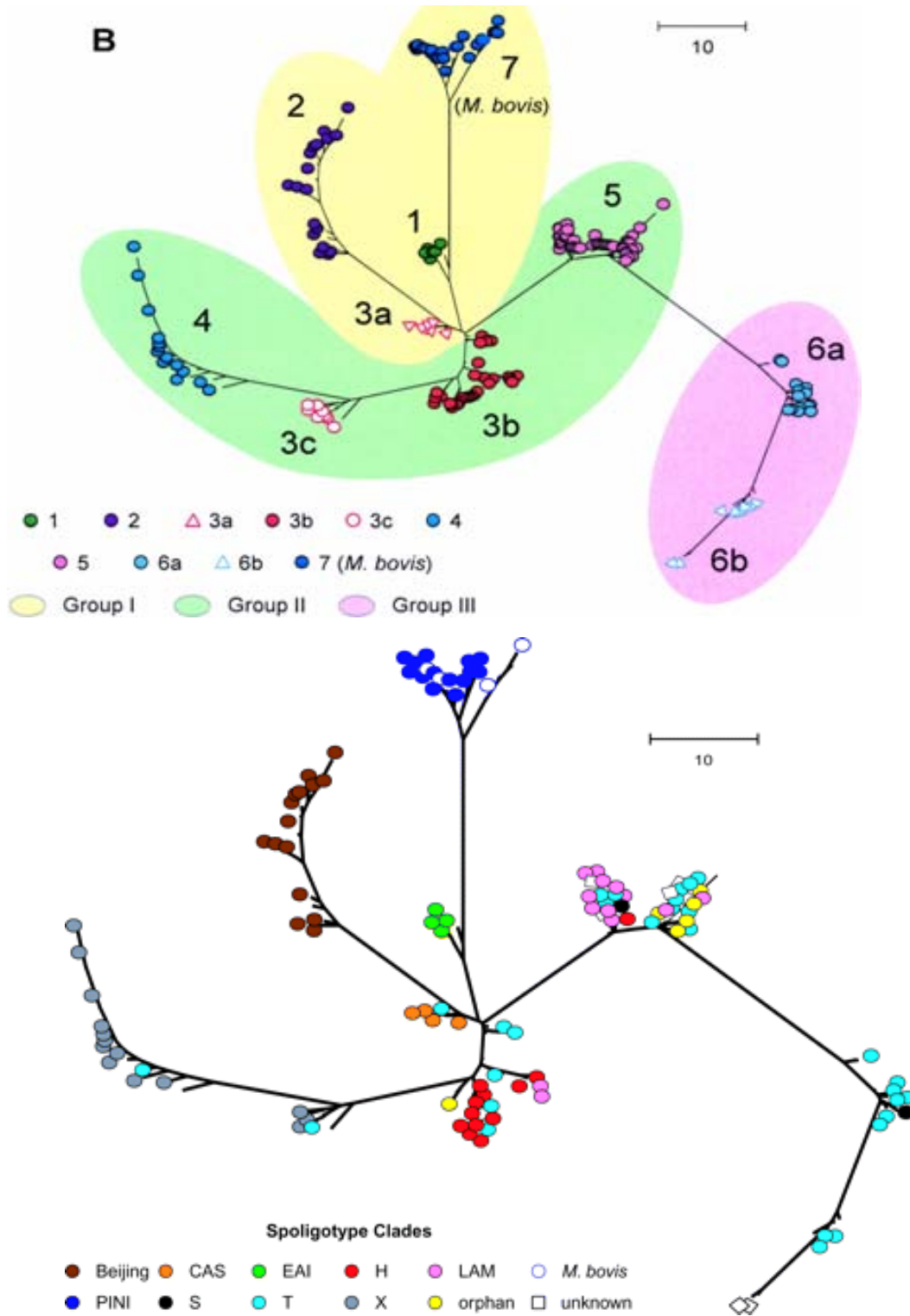


Figura 20: a) Model segons un estudi *neighbor-joining* basat en les dades de 327 soques on es van analitzar 212 SNPs presentant 182 espilogotips formant clústers idèntics. Els números designen cada SCG; els subgrups estan indicats per símbols acolorits. Els llinatges SNP que pertanyen als "major genètic" grups estan basat en la combinació de dos al·lels del *katG463* i *gyrA95* i estan també acolorit. La barra indica la distància respecte al número de SNP diferents. b) Distribució de les clades d'espilogotips segons el resultat de la SNP. Cada aïllament s'indica per un punt, el color del qual està assignat segons la clada d'espilogotip: CAS, Central Asian clade; EAI, East African-Indian clade; H, Haarlem clade; LAM, Latin American and Mediterranean clade; PINI, *Mycobacterium pinnipedii* clade; S, S clade; T, T clade; X, X clade. (Reproduït amb permís de l'ASM).

1.3.4 Patogènia de la tuberculosi

La interacció de *M. tuberculosis* amb l'hoste s'inicia quan les petites gotes respiratòries que contenen el microorganisme i que provenen d'un pacient infecciós són inhalades per un hoste susceptible. Encara que la major part dels bacils inhalats queden atrapats en les vies respiratòries superiors i són eliminats per les cèl·lules mucoses ciliades, una part arriben a la superfície dels alvèols pulmonars (85). En aquesta localització, si el bacil troba les condicions adequades de pH i oxigenació, començarà a multiplicar-se. Encara que aquesta multiplicació pot veure's limitada per l'acció fagocitària dels macròfags alveolars (45). La interacció de l'hoste amb un bacteri patògen porta a un període agut subclínic o amb simptomatologia clínica. Si l'hoste sobreviu al primer contacte amb el bacteri, la infecció aguda generalment es resol mitjançant l'eliminació dels bacteris invasors per part del sistema immunitari. En el cas de *M. tuberculosis*, un petit nombre de microorganismes sobreviu, persistent fins i tot tota la vida. La persistència de bacteris significa que s'ha establert un equilibri immune després d'haver generat una resposta aguda.

Quan el bacil és fagocitat per un macròfag no activat, s'inicia una multiplicació intracel·lular que porta a la lisi del macròfag. Posteriorment quan els bacils siguin fagocitats per macròfags activats, la producció d'enzims hidrolítics i citoquines impedirà la multiplicació intramacrofàgica. Els macròfags secreten un conjunt de mediadors solubles (citoquines i quimosines) amb efectes immunoreguladors i mediadors de les manifestacions clíniques de la tuberculosi. Entre aquests mediadors es troben: la Interleuquina 1 (IL1), que contribueix a l'aparició de febre, la Interleuquina 6 (IL6), que contribueix a la hiperglobulinèmia, i el factor de necrosi tumoral *alfa* (INF α), que facilita la destrucció de micobacteris, la formació de granulomes i l'aparició de diversos efectes sistèmics com febre i pèrdua de pes (85). Els macròfags també desenvolupen un paper crític en el processament i la presentació d'antígens micobacterians als limfòcits T; el resultat és una proliferació de limfòcits CD4+ crucials per a la defensa de l'hoste en front de *M. tuberculosis* (85, 186). En els

hostes immunocompetents es desenvolupa una immunitat eficient i la necrosi és menys important, pel fet que limita la malaltia moltes vegades per a tota la vida. En alguns hostes immunodeprimits com ara els coinfectats amb l'HIV, els defectes qualitius i quantitius de les cèl·lules T CD4+ expliquen la incapacitat per a contenir la proliferació del micobacteri ocasionant una lesió que va creixent donant lloc a una necrosi més important i generant noves lesions com a conseqüència de la disseminació.

S'han descrit quatre etapes per explicar els fenòmens que s'inicien des de la inhalació de les partícules fins el desenvolupament de la malaltia:

- 1) En l'etapa inicial, després de la inhalació, els bacils tuberculosos són fagocitats pels macròfags alveolars i són traslladats cap als nòduls limfàtics hiliars. Els macròfags infectats alliberen factors quimiotàctics que atreuen més macròfags i monòcits fins el lloc de la infecció. Aquesta fase sol ser asimptomàtica.
- 2) La segona etapa representa la multiplicació dels bacils dins dels macròfags fins a la mort cel·lular i l'alliberació dels bacils cap el medi extracel·lular. En aquesta etapa, anomenada de simbiosi, els bacils i els macròfags sembla que viuen en equilibri.
- 3) En la tercera etapa, que es desenvolupa entre la segona i la quarta setmana de la infecció, s'activen dues respostes addicionals de l'hoste en front *M. tuberculosis*. D'una banda una resposta d'hipersensibilitat retardada front a diferents antígens del bacil, evidenciada amb la prova de la tuberculina, destrueix els macròfags no actius que contenen bacils en fase de multiplicació. D'altra banda els limfòcits T CD4+ secreten citoquines i quimosines (INF α , IL2), que activen els macròfags augmentant la seva capacitat destructiva intracel·lular (85, 186). Com a resultat de tot això el nombre de micobacteris disminueix. Encara que ambdues respostes poden inhibir el creixement bacterià, és l'equilibri entre elles el que

determina la forma de tuberculosi que apareixerà amb posterioritat. El resultat de tot aquest procés és la formació de les lesions granulomatoses (tubercles), que té lloc després del desenvolupament d'immunitat específica i de l'acumulació d'un gran nombre de macròfags activats en la zona de la lesió primària. Els granulomes són agregats de cèl·lules immunitàries en varis estadis de diferenciació, que estan composts tant de cèl·lules limfocítiques i macròfags activats, com de cèl·lules epitelioides i cèl·lules gegants (78). La resposta d'hipersensibilitat retardada dóna lloc a l'aparició de necrosi sòlida en la part central del tubercle, anomenada càseum. El teixit circumdant del granuloma està calcificat o necròtic. Encara que *M. tuberculosis* pot sobreviure de forma quiescent a l'interior dels macròfags o en el material necròtic durant anys o tota la vida del pacient, el seu creixement queda inhibit en aquest ambient necròtic degut a la baixa tensió d'oxigen i al pH disminuït (253). En una petita proporció de casos, la resposta d'activació de macròfags és dèbil i el creixement dels micobacteris només pot ser inhibit per les reaccions de hipersensibilitat de tipus retardat, fet que condueix a la destrucció tissular.

- 4) En la quarta etapa les lesions tendeixen a augmentar encara més de mida, i el teixit adjacent es lesiona de forma progressiva. En el centre de la lesió els enzims hidrolítics dels macròfags liquen el material caseós, transformant-lo en un excel·lent medi de cultiu per al bacil que es multipliquen per primera vegada en el medi extracel·lular. Les parets bronquials i els vasos sanguinis són envaïts i destruïts i es formen les cavitats. En les parets de les cavitats, els bacils tuberculosos es poden multiplicar adequadament i disseminar-se a través dels vasos limfàtics, sanguinis i dels bronquis cap a les vies respiratòries i el medi extern mitjançant de l'expectoració (45).

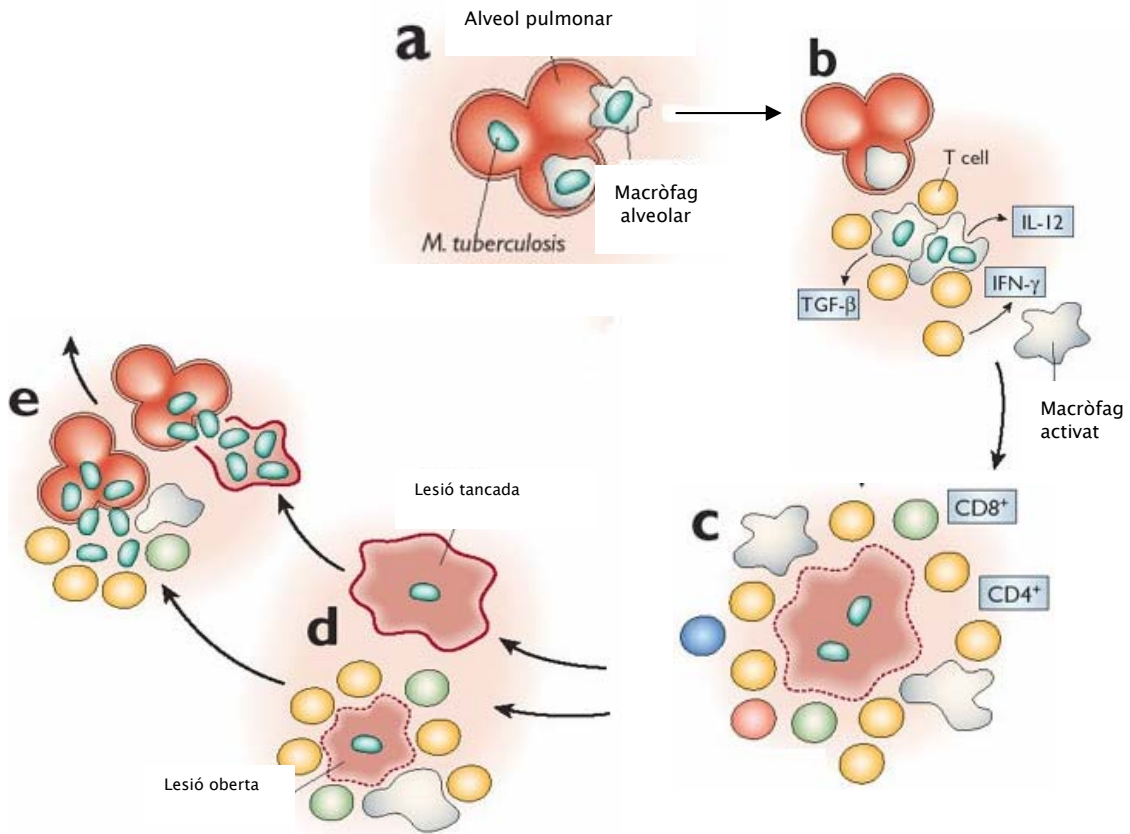


Figura 21. Persistència de la infecció per *Mycobacterium tuberculosis*. a) infecció, b) activació de macròfags, c) formació del granuloma, d) persistència, e) reactivació de la malaltia. Extret de: www.nature.com/.../fig_tab/ni1102-1026_F2.html.

1.3.5. Infecció tuberculosa latent

La prova de la tuberculina ha estat fins ara l'únic mètode establert i recomanat per a la detecció de la infecció tuberculosa latent (ITL).

Es realitza mitjançant la injecció intradèrmica de 2UI de PPD RT 23 (*protein purified derivate*) o els seus bioequivalents 5 UT de CT-68 o 5 UT de PPDS. Aquesta prova posa de manifest el mecanisme d'hipersensibilitat retardada desencadenat per l'arribada de limfòcits T, amb alliberació de IL 10 i IFN α , tot produint vasodilatació local, formació de fibrina, edema i l'arribada de macròfags. Aquesta reacció s'inicia de 5-6 hores després de la injecció i arriba a la màxima reacció en 48-72 hores. Els criteris de

interpretació de la prova de la tuberculina positiva es mostren en la taula 9. Generalment la sensibilitat a la prova tuberculínica és per tota la vida, encara que amb el pas del temps pot disminuir, fins i tot desaparèixer, en aquest cas si es torna a administrar el PPD, l'acció inicial pot ser petita o nul·la, però si es repeteix el test apareix una resposta exagerada. A aquest fenomen se l'anomena efecte empena (*Booster*).

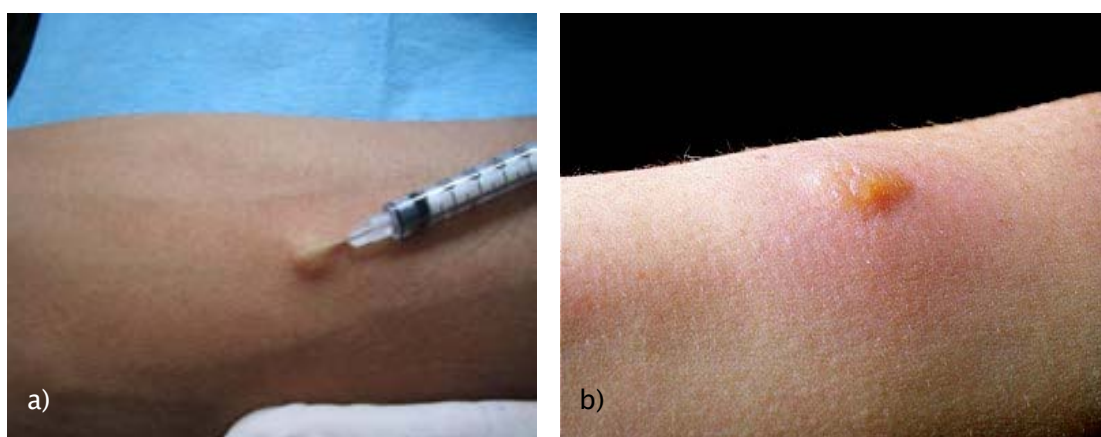


Fig 22: a) inoculació intradèrmica de PPD b) reacció positiva.

Taula 9: Criteris de PPD positiu segons diferents situacions.

Situació clínica/epidemiològica	PPD positiu
No vacunats	≥ 5 mm
Vacunats amb contacte íntim amb casos bacil·loscòpia positiva	≥ 5 mm
Vacunats amb contacte esporàdic amb casos bacil·loscòpia positiva o contacte íntim i freqüent amb casos bacil·loscòpia negativa	≥ 15 mm
Infectats per l'HIV	Qualsevol induració
Viratge tuberculínic	≥ 5 mm

Darrerament s'han desenvolupat altres sistemes de detecció de la ITL per a la quantificació de la resposta immunitària cel·lular, utilitzant diferents antígens micobacterians per a la estimulació de les cèl·lules T sensibilitzades i posteriorment detectant *in vitro* l'alliberació de IFN- γ . Actualment es disposa de dos mètodes comercialitzats, Quantiferon Gold® (Cellestis, Austràlia) i T-SPOT-TB® (Oxford

Immunotec, Regne Unit) els quals presenten diferències metodològiques. Quantiferon Gold® estimula els limfòcits presents en mostres de sang total i determina la producció de IFN- γ mitjançant enzimoimmunoanàlisi, mentre que T-SPOT-TB® requereix una separació prèvia de cèl·lules mononuclears per a la seva estimulació i determina la presència de IFN- γ mitjançant ELISPOT. Si es comparen amb la prova de la tuberculina aquests mètodes són cars, però presenten els avantatges de la objectivitat en la interpretació, la possibilitat de la repetició, resultats ràpids, eliminació de la visita de lectura, fàcil estandardització. A més de no veure's afectada per les reaccions per micobacteris ambientals o la vacuna antituberculosa i permet la inclusió de controls per a detectar pacients anèrgics (73).

1.3.6 Tuberculosi activa

El diagnòstic de la tuberculosi es basa 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. També s'han avaluat mètodes de diagnòstic serològics.

1.3.6.1. Diagnòstic clínic.

La tuberculosi és la més freqüent de les micobacteriosis, deguda sovint a *M. tuberculosis*, i rarament a *M. bovis* o *M. africanum*. Cal destacar dues espècies més del complex tuberculosi, una responsable de la tuberculosi dels rosegadors *M. microti* i l'altra *M. caprae* en bòvids, porcs senglars, camells, cèrvols i en tigres siberians que excepcionalment s'han descrit en humans (232).

Les manifestacions clíniques de la tuberculosi són força variables i depenen de múltiples factors, tant de l'hoste, com del bacteri com de la seva interacció (taula 10).

Taula 10 : Factors que influeixen en les característiques clíniques de la tuberculosi.

Factors hoste dependents	Factors dependents del bacteri	Factors dependents de la interacció hoste–bacteri
Edat	Virulència del bacteri	Localitzacions implicades
Estat immunitari	Tropisme per determinats teixits	Severitat de la malaltia
Nivell d'immunodeficiència		
Malnutrició		
Factors genètics		
Malalties coexistents		
Immunització amb BCG		

La primoinfecció tuberculosa cursa, en general, de forma asimptomàtica i produeix radiològicament una pneumonitis inespecífica que afecta, sobretot, els lòbuls inferiors pulmonars, produint freqüentment una adenopatia hiliar. En cas contrari, si la resposta immunitària de l'hoste no és adequada, apareixen símptomes i/o signes radiològics de malaltia.

1.3.6.1.1 Tuberculosi pulmonar

La infecció tuberculosa suposa només el contacte del bacil amb l'hoste, sense cap signe de malaltia, es considera malaltia a l'aparició de símptomes o signes radiològics. La tuberculosi pulmonar es pot classificar en dues categories: *malaltia primària* i *malaltia postprimària*.

Malaltia primària

Sovint la infecció tuberculosa és asimptomàtica, però en un nombre variable de casos, en funció dels seus factors predisponents es presenten signes clínics i radiològics de la infecció primària amb el típic component bipolar; parenquimatós i ganglionar. Amb una síndrome infecciosa inespecífica. L'aspecte radiològic típic consisteix en una

infiltració perifèrica (infiltrat alveolar únic en qualsevol lòbul, més freqüentment en la part inferior del lòbul dret) i s'acompanya d'adenopatia hiliar o paratraqueal unilateral. En la major part de casos la lesió cura de forma espontània i pot ser evident més endavant com un petit nòdul calcificat, anomenat lesió de Ghon. En la major part de casos aquest procés és asimptomàtic.

Quan la primoinfecció es dona en la infància o en pacients infectats amb l'HIV, la malaltia primària pot progressar ràpidament cap a un procés clínic. La lesió inicial augmenta de mida i pot evolucionar de diverses formes. El vessament pleural, és una troballa freqüent, degut a la invasió de l'espai pleural pels bacils provinents d'un focus adjacent subpleural. En els casos greus, la lesió inicial primària mostra necrosi en la part central i evoluciona cap a la cavitació aguda. La tuberculosi en els nens s'acompanya de forma gairebé invariable d'adenopatia limfàtica hiliar o mediastínica degut a la disseminació dels bacils des del parènquima pulmonar i a través dels vasos limfàtics (figura 23). La disseminació hematògena pot donar lloc a les manifestacions més greus de la malaltia primària per *M. tuberculosis*.



Figura 23: Radiografia de torax d'un nen amb adenopaties hiliars.

Malaltia Postprimària

També anomenada tuberculosi de l'adult, de reactivació o secundària. La malaltia postprimària és deguda a la reactivació endògena de la infecció latent o a la reinfecció exògena. La reactivació s'associa sovint a la desnutrició, alcoholisme, diabetis, vellesa o a canvis importants en la vida que poden portar a situacions d'estrès. Els pacients amb HIV tenen un risc del 10–15% per any de progressió de la infecció, mentre que els pacients no coinfectats per l'HIV tenen un risc del 3–4% durant el primer any després de la conversió de la tuberculina i posteriorment un 5–15% durant tota la vida (85). La reactivació sol localitzar-se en els segments apicals i posteriors dels lòbuls superiors, on l'elevada concentració d'oxigen i escàs drenatge limfàtic afavoreix el creixement dels micobacteris.

L'extensió de l'afectació parenquimatososa pulmonar és molt variable, des de petits infiltrats fins la malaltia cavitària intensa. Quan es formen cavitats, el contingut necròtic i líquefacte s'elimina en última instància a través de les vies respiratòries, donant lloc a l'aparició de lesions en altres camps pulmonars que alhora també es cavitent. L'afectació massiva de segments o lòbuls pulmonars, causa la pneumònia tuberculosa. Aproximadament la tercera part dels pacients amb tuberculosi pulmonar no tractats moren, mentre que altres presenten un procés de remissió espontània o bé mostren una evolució crònica i progressivament debilitant. En aquestes condicions, algunes lesions pulmonars presenten fibrosi i més tard calcificació, però en altres zones dels pulmons persisteixen les cavitats. Les persones amb aquesta forma de malaltia crònica segueixen eliminant bacils tuberculosos al medi exterior.

Durant les primeres fases de la malaltia, els signes i símptomes solen ser inespecífics e insidiosos, i consisteixen principalment en febre amb sudoració nocturna, pèrdua de pes, anorèxia, malestar general i debilitat. En la majoria dels casos apareix finalment tos, amb producció d'esput purulent i sanguinolent.

Pel diagnòstic de la tuberculosi pulmonar activa, cal fer l'estudi radiològic i la recollida de mostres seriadades d'esput per al seu cultiu i examen microscòpic abans d'iniciar el tractament antituberculós. En cas que el pacient no expectori, caldrà l'obtenció

broncoaspirats o rentades alveolars. En nens s'aconsella l'estudi seriat d'aspirats gàstrics.

1.3.6.1.2 Tuberculosi extrapulmonar

Abans de l'inici de la pandèmia de la SIDA, aproximadament el 85% dels casos de tuberculosi eren pulmonars exclusivament, mentre el 15% restant eren exclusivament extrapulmonars o amb ambdues entitats de forma concomitant (83). Actualment el percentatge ha augmentat al 20% degut a la major supervivència dels malalts immunodeprimits i a la millora tècnica pel seu diagnòstic. Dins les localitzacions extrapulmonars destaquen: limfàtiques (27%), pleurals (21,5%), genitourinàries (16%), disseminades miliars (9,8%), òssies (8,5%), meníngies (4,2%), i peritoneals (3,7%) (17). Les tuberculosi extrapulmonars normalment s'associen a l'existència d'un nombre reduït de bacils. Aquest fet, junt a la inaccessibilitat d'aquests llocs, fa que la confirmació bacteriològica sigui difícil (211). Tal com en la tuberculosi pulmonar els símptomes poden ser sistèmics o específics de la localització afectada. La pèrdua de pes s'associa a la malaltia disseminada i a la gastrointestinal. La febre i sudoració nocturnes són comuns en algunes localitzacions (disseminada, inclosa la miliar, i gastrointestinal), però no en altres (limfàtica, cutània, osteoarticular, genitourinària). Múltiples símptomes s'associen a cadascuna de les localitzacions potencials (44). Per al seu diagnòstic cal valorar en cadascun dels casos les avantatges i inconvenients de la biòpsia o la punció aspirativa de la zona afectada per tal d'obtenir material per a la diagnosi. De tots els pacients amb tuberculosi extrarespiratòria caldria l'obtenció d'una imatge radiològica pulmonar per excloure o confirmar la coexistència de la tuberculosi pulmonar.

1.3.6.2. Diagnòstic microbiològic

El diagnòstic microbiològic directe de la tuberculosi està influenciat per dos fets particulars de la biologia dels micobacteris, el temps de generació i l'estructura de la paret. Els micobacteris es divideixen molt lentament, amb un temps de generació que oscil·la entre les 18–20 hores, fet que fa que no es puguin observar colònies en els medis de cultiu fins a les 2–3 setmanes d'incubació. Aquest fet, retarda el diagnòstic de la infecció i fa necessari el tractament de les mostres en les quals els micobacteris estan acompanyats de flora sapròfita ja que el sobrecreixement més ràpid de la flora acompanyant impediria l'aïllament dels micobacteris.

Per evitar això i gràcies a l'estructura de la paret dels micobacteris, que es caracteritzen per un alt contingut de lípids que li confereixen resistència als agents fisicoquímics com els àcids o àlcalis, es pot tractar les mostres amb una descontaminació amb substàncies alcalines que elimina la flora acompanyant i preserva la integritat dels micobacteris (apartat 1.2.2).

Per al diagnòstic directe disposem de dues eines:

- 1) fenotípiques: observació directa per tinció ja sigui Ziehl–Neelsen o auramina (apartat 1.2.3) i cultiu de la mostra, amb la subsegüent identificació i estudi de sensibilitat dels micobacteris aïllats (apartats 1.2.5; 1.2.6; 1.2.7).
- 2) genotípiques: detecció del material genètic (apartat 1.2.4).

1.3.6.3 Diagnòstic serològic

Considerant que el genoma de *M. tuberculosis* codifica per aproximadament 4.000 proteïnes i que el bacteri altera el seu perfil d'expressió gènica per adaptar-se a l'ambient i que l'hoste experimenta una sèrie de respostes immunològiques de tipus humoral i cel·lular, és de suposar que el bacteri expressa diferents antígens durant els diferents estadis d'infecció i progressió de la malaltia. Per aquestes raons, els recents avenços en les tècniques diagnòstiques s'han centrat en el desenvolupament de

mètodes que identifiquin la tuberculosi latent i activa mitjançant l'anàlisi amb antígens immunodominants i la caracterització d'anticossos i cèl·lules T (128).

Els antígens utilitzats en els assaigs serològics inclouen l'antigen 38-kDa, lipoarabinomanà, antigen 60, complex antigènic 85, glicolípid fenòlic Tb1, 2,3-diacitrealosa i lipooligosacàrids entre altres.

El nivell de desconeixement de la dinàmica d'aparició i vida mitja de les immunoglobulines en el transcurs de la tuberculosi, fa que el diagnòstic serològic encara no es pugui recomanar (44).

1.3.6.4 Diagnòstic per l'imatge

Tant la tuberculosi pulmonar com l'extrapulmonar no presenten cap signe radiològic patognomònic, encara que hi ha lesions radiològiques que suggereixen una tuberculosi (cavitacions en lòbuls superiors), el que fa que sovint la principal sospita diagnòstica es fonamenti en una radiologia suggestiva. Cal tenir en compte que pacients coinfectats per l'HIV i altres immunodeprimits poden tenir radiografies de tòrax normals. El pronòstic i la resposta al tractament no es poden avaluar per l'evolució radiològica, ja que hi pot haver un increment de les lesions en el primer més de tractament sense que això suposi un fracàs terapèutic. No cal fer radiografies durant el tractament, només al principi i al final. Les formes radiològiques més freqüents són l'infiltrat amb adenopatia satèl·lit (complex primari) o sense ella, l'adenomegalia simple, el vessament pleural, la tuberculosi pulmonar miliar (disseminació lobulillar (figura 24)) i l'atelectàsia consegüent a l'obstrucció d'un bronquíol per un gangli inflammat (44).



Figura 24: Patró miliar. Petits micronòduls de 1 a 3 mm. distribuïts difusament en ambdós camps pulmonars.



Figura 25. Adenopaties a l'hili pulmonar dret, associat a imatges parenquimatoses. Manifestació de tuberculosi primària.



Figura 26. Tuberculosi espinal. Mal de Pott.

1.3.6.5 Diagnòstic anatomopatològic

Algunes vegades la tuberculosi es diagnòstica per l'existència de granulomes tuberculosos en mostres obtingudes mitjançant biòpsies. Es basa en l'observació de granulomes caseificants que caldrà sempre confirmar amb tincions per a la identificació de bacils àcid-alcohol resistents (44).

1.3.7 Tractament de la tuberculosi

1.3.7.1 Bases bacteriològiques del tractament antituberculós

El tractament de *M. tuberculosis* és diferent al que s'utilitza en la resta de patògens bacterians degut al seu llarg temps de duplicació, a la seva constitució estructural que fa que tingui baixa permeabilitat cel·lular i a la seva capacitat de romandre en estat de latència. Cal també destacar que el bacteri pot localitzar-se en diferents hàbitats en l'hoste on s'enfronta a diferents condicions ambientals. D'aquesta forma, podem pensar en la malaltia activa com la suma de diferents poblacions dinàmiques dins l'organisme metabòlicament diferents i per tant, amb una possible susceptibilitat diferent als fàrmacs (157, 158).

El tractament de la tuberculosi es basa en dos pilars fonamentals: l'associació de fàrmacs per evitar la selecció de resistències i el tractament perllongat per evitar les recidives de la malaltia, eliminant totes les poblacions bacil·lars que hi ha a les lesions tuberculosos. Els fracassos terapèutics es donen per resistència als fàrmacs, ja sigui per un anterior règim inapropiat o, sovint, per falta d'acompliment per part del pacient que abandona el tractament a mida que es recupera.

El tractament estàndard actual fou definit per Mitchinson l'any 1985, va descriure quatre poblacions bacil·lars en les lesions i tres fases de tractament de la tuberculosi:

- ❖ Població A: és una població metabòlicament activa, extracel·lular que creix en pH neutre i amb una tensió d'oxigen elevada. Constitueix la població més nombrosa amb més de 10^8 bacils (44), quantitat que permet el desenvolupament de resistències, i per tant és la responsable del fracàs terapèutic. El fàrmac més actiu en front aquesta població és la INH, amb capacitat bactericida, que en 2 o 3 dies destrueix el 90% de la població extracel·lular dels granulomes cavitats (fase I).
- ❖ Població B: bacils en situació intramacrofàgica en medi àcid i poca oxigenació, condicions que fan que tinguin poca activitat metabòlica i per això siguin difícils d'eliminar. Són els anomenats "bacils persistents", responsables de les recidives mesos o anys després d'acabar el tractament. El fàrmac més actiu en front aquesta població és la PZA que veu la seva activitat augmentada amb l'acidificació del medi, mentre que en aquesta situació la INH i la RIF disminueixen la seva activitat. A la capacitat que tenen els fàrmacs per eliminar aquesta població se l'anomena esterilitzant (fase II).
- ❖ Població C: els bacils es troben en les lesions caseoses a un pH neutre on passen llargs períodes de latència i esporàdicament i en períodes curts,

es multipliquen. Juntament amb la població B, són també responsables de les recaigudes en acabar el tractament. El pH de les lesions no és suficient àcid per la PZA i actua eficaçment la RIF amb capacitat esterilitzant (fase III).

- ❖ Població D: les lesions postinfecció estan formades per una població poc nombrosa i en fase de latència, que serà controlada pel sistema immune. La manca d'activitat metabòlica fa que els fàrmacs no puguin actuar. Són els bacils responsables de les reactivacions endògenes.

1.3.7.2 Resistència als antituberculosos

Es parla de resistència quan el tractament perd la seva eficàcia, reapareixent o persistint els símptomes i signes de la malaltia. En la pràctica clínica en un malalt amb tuberculosi es sospita la resistència quan no han desaparegut els símptomes clínics després de dos mesos de tractament, persisteix la bacil·loscòpia positiva després de quatre mesos de tractament o reapareix després de la negativització, i en cas que es produeixi una recaiguda després d'haver finalitzat el tractament de manera correcta. Cal també sospitar resistència quan el malalt ha tingut episodis de tuberculosi previs sense resposta al tractament. Per a la confirmació definitiva cal fer l'estudi de sensibilitat als fàrmacs antituberculosos.

La resistència en *M. tuberculosis* és d'origen cromosòmic i es presenta espontàniament durant la multiplicació, és irreversible i es transmet de forma vertical. Tot i que l'aparició d'un bacil mutant és espontània sense la necessitat de la pressió selectiva d'un fàrmac, per a que tota una població bacteriana esdevingui resistent si és necessari el contacte previ amb el fàrmac. La taxa d'aquestes mutacions varia segons l'antibiòtic, oscil·lant entre 10^{-3} per la PZA i 10^{-8} per l'ETB en fàrmacs de primera elecció. Si s'utilitza monoteràpia, inicialment, en una primera fase s'elimina la majoria

de bacils, i posteriorment hi ha una selecció de mutants resistents al fàrmac utilitzat, és el fenomen anomenat “fall and rise”, el que provocarà la inutilització del fàrmac per aquesta soca de manera permanent

Quan es combinen dos o tres fàrmacs la freqüència de mutació serà el producte de les freqüències parcials de cada antibiòtic. Així en combinacions on intervenen tres antibiòtics com la INH, la RIF i la PZA la probabilitat d'aparició de resistències seria de 10^{-21} , motiu pel qual caldria una població bacil·lar impossible d'encabir en un ésser humà.

El grup de treball de la *International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases* i l'OMS (201) han classificat les resistències en 5 tipus :

- ❖ **Mono-resistència:** resistència a un sol fàrmac de primera línia.
- ❖ **Poliresistència:** resistència a dos o més fàrmacs de primera línia, en cas de ser INH i RIF s'anomenarà **multiresistència (MDR-TB)**.
- ❖ **Resistència en casos nous** (resistència primària): resistència en malalts que no han rebut mai tractament o ho han fet durant menys d'un mes.
- ❖ **Resistència en casos prèviament tractats** (resistència secundària): resistència en malalts que com a mínim han rebut tractament antituberculós durant un mes.
- ❖ **Resistència combinada:** és la suma dels casos nous i els prèviament tractats en una zona determinada i en un temps determinat.

La multiresistència és actualment la resistència bacteriana més preocupant i severa. Una varietat de la tuberculosi multiresistent és l'anomenada extremadament resistent (XDR-TB) on, a més dels criteris de multiresistència INH i RIF resistents, també presenten resistència en front les quinolones i al menys a un dels tres fàrmacs injectables de segona línia: capreomicina, kanamicina o amikacina. La XDR-TB és el resultat d'un mal maneig de la MDR-TB i del pobres programes de control.

1.3.7.2.1 Programes de control. Estratègia DOTS i DOTS-plus

Per tal de controlar a nivell mundial la preocupant situació epidemiològica de la tuberculosi cal establir mesures per evitar-ne la transmissió, identificant i tractant la font de contagi. Per això, s'han creat els Programes Nacionals de lluita contra la tuberculosi (PNT) on, com a principals objectius, es plantegen l'establiment de vies per al diagnòstic precoç, tractament i curació dels casos de tuberculosi, fent especial incidència en aquells que tenen bacil·loscòpia positiva, i la implantació d'estudis de contacte amb les actuacions corresponents. Després de la potenciació dels PNT a nivell mundial i donada la cada vegada més complicada situació, l'OMS va declarar la tuberculosi com una emergència mundial i va potenciar l'establiment de l'estratègia del Tractament Curt Directament Observat (*Directly Observed Treatment Short-course*, DOTS), on a grans trets es demana:

- 1) Compromís polític pel control eficaç de la tuberculosi, garantint el recursos necessaris per a dur a terme els PNT.
- 2) Establir una xarxa mínima de laboratoris de nivell 1 (amb capacitat per a fer bacil·loscòpies), i establir laboratoris de nivell 2 (capacitat per fer bacil·loscòpies, cultiu i identificació) i nivell 3 (amb la resta d'eines donant totes les possibilitats de diagnòstic), així com una xarxa de centres per a recollir les mostres.
- 3) Tractament estàndard amb DOTS durant com a mínim els dos primers mesos.
- 4) Garantir el subministrament de fàrmacs, punt d'acompliment compromès en els països amb pocs recursos, on sovint el subministrament de fàrmacs és inestable.
- 5) Elaboració d'un sistema de registre i informació per avaluar el PNT, controlant la despesa i demanda de material i fàrmacs.

Arrel de la farmacoresistència emergent com a reflex del deficient control de la tuberculosi. Les àrees amb nivells significatius de MDR-TB, l'estratègia DOTS requereix ser reforçada amb la incorporació i administració de fàrmacs de segona línia. En

aquest sentit es desenvolupa la estratègia DOTS-plus, que no està concebuda com una opció universal, només cal executar en àrees seleccionades per combatre l'epidèmia emergent de MDR-TB i on el programa DOTS funcioni eficaçment.

Fig 27: Percentatge de cobertura del programa DOTS (Març 2008).

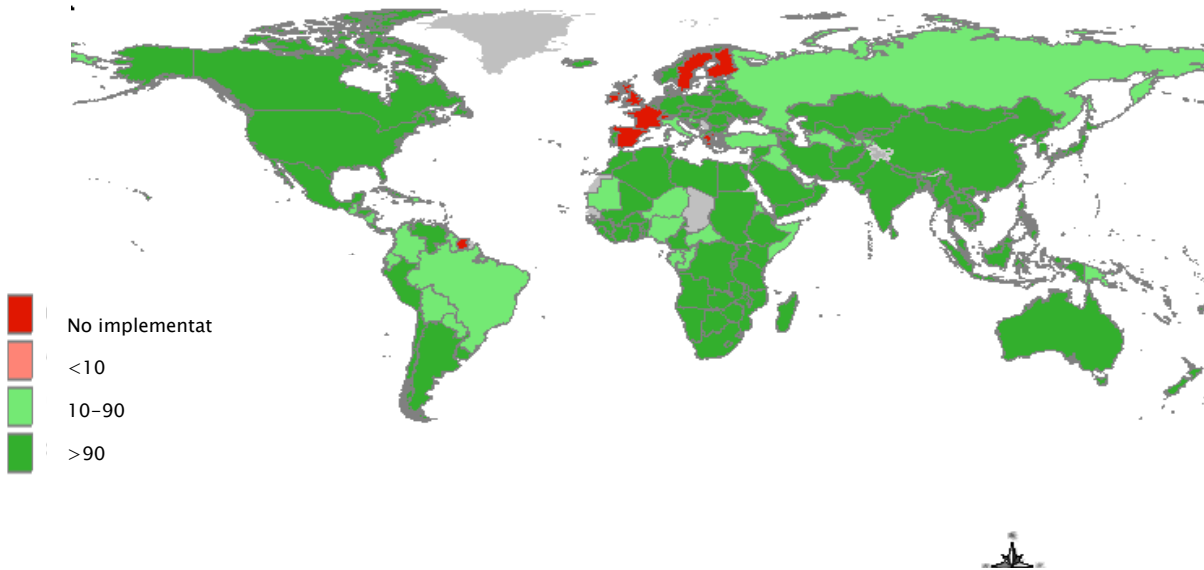
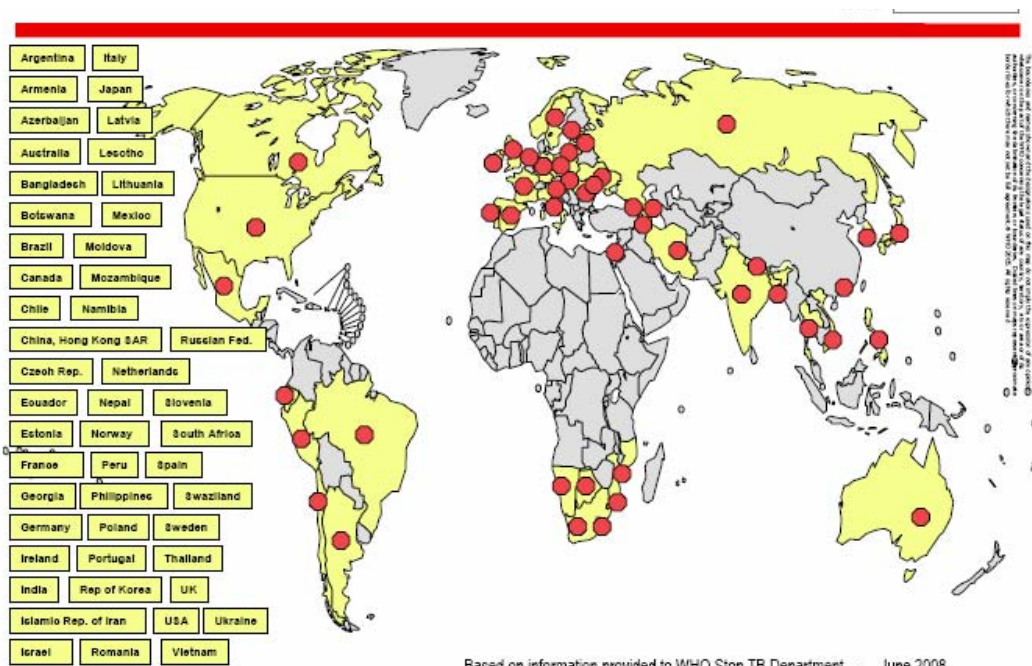


Fig 28: Països amb casos confirmats de XDR-TB (Juny 2008).



1.3.7.3 Pautes de tractament actuals

1.3.7.3.1 Tractament de la infecció tuberculosa latent

Tota persona que no presenta manifestacions clíniques, radiològiques i microbiològiques de tuberculosi i que presenti una prova de la tuberculina positiva, es considera que té una infecció tuberculosa latent. El seu tractament, anomenat també quimiopprofilaxis secundària o tractament preventiu, té l'objectiu de prevenir el desenvolupament de la infecció cap a malaltia, essent alhora una eina important en l'estratègia de control de la tuberculosi.

Estarà indicada en persones en les següents circumstàncies:

- ❖ Coinfectades amb l'HIV amb PPD positiu.
- ❖ Coinfectats per l'HIV amb PPD negatiu, i evidència de PPD anterior positiu (malalts anèrgics).
- ❖ Persones amb PPD positiu en contacte amb pacients bacil·lífers.
- ❖ Nens menors de cinc anys amb PPD positiu.
- ❖ Persones amb viratge tuberculínic en els dos últims anys.
- ❖ Persones amb PPD positiu i patologies de risc per a patir tuberculosi.
- ❖ Persones vinculades a situacions d'alt risc amb PPD positius (homes menors de 35 anys, dones menors de 30) (238).

El tractament d'elecció és la monoteràpia amb Isoniazida, excepte en aquells casos en que es sospiti resistència. La pauta que allarga el tractament fins a 9 mesos disminueix el risc de reactivació, amb un percentatge del 90 % d'èxit en pacients complidors. Pauta també recomanada en pacients HIV i nens menors de 4 anys. En pacients que no toleren la isoniazida o es sospita la possibilitat de resistència es proposa com a tractament alternatiu la monoteràpia durant 4 mesos amb rifampicina, aquesta pauta no seria la recomanable en pacients HIV positius per la interacció amb la terapèutica antiretroviral. En pacients en circumstàncies especials es pot utilitzar la pauta d'isoniazida més rifampicina durant 3 mesos, tot i que augmenta la toxicitat. S'havia

proposat també l'ús de la combinació de rifampicina i pirazinamida durant dos mesos (114), però s'ha rebutjat per la seva alta toxicitat, que no seria justificada en un tractament preventiu. En els casos de pautes combinades cal la supervisió del compliment del tractament ja que s'utilitzen fàrmacs de primera línia en períodes de temps curts (112, 238). Les pautes utilitzades es descriuen en la taula 9.

Taula 11 Pautes de tractament de la tuberculosi latent (112).

Pauta	Dosificació diària	Dosificació intermitent (només adults)	Duració total del tractament
INH	5 mg per kg	2 dies/setmana (15 mg per Kg)	6–9 mesos en adults. 9 mesos en HIV pos. i nens.
RIF	10 mg per kg		4 mesos en adults; 6 mesos en nens
INH+RIF	5 mg + 10 mg per kg		3 mesos

1.3.7.3.2 Tractament de la malaltia

En el tractament de la malaltia la pauta més utilitzada i recomanada és la continuada de sis mesos, considerada el tractament estàndard en els casos nous. Diferents pautes en diferents circumstàncies han estat recomanades per la OMS (taula 10) (167).

La pauta de tractament estàndard caldrà modificar-se en pacients que pateixen silicotuberculosi, cirrosi hepàtica, hepatitis alcohòlica, insuficiència renal, embaràs i en una mare en període d'alletament.

Taula 12. Teràpia antituberculosa de curta durada recomanada per l'OMS (167).

Categoria	Pacients	Fase inicial ^a	Fase de continuïtat
I	<p>Pacients nous amb:</p> <ul style="list-style-type: none"> • bacil·loscòpia positiva. • tuberculosi pulmonar bacil·loscòpia negativa i localització parenquimal extensa. • HIV concomitant. • formes severes de tuberculosi extrapulmonar. 	<p>Recomanat INH RIF PZA ETB^{b,c}</p> <p>Opcional 2(INH RIF PZA ETB)^{3,o} 2 INH RIF PZA ETB</p>	<p>Recomanat 4 INH RIF</p> <p>Opcional 4 (INH RIF)^{3,o} 6 INH ETB</p>
II	<p>Pacients prèviament tractats amb TP i bacil·loscòpia positiva en situació de :</p> <ul style="list-style-type: none"> • recaiguda. • Incompliment <p>Pacients de la categoria I amb fracàs terapèutic en comunitats amb un adequat programa de seguiment de resistències, alts nivells de MDR-TB i capacitat per realitzar estudis de sensibilitat</p> <p>En una comunitat:</p> <ul style="list-style-type: none"> • on es coneix la baixa incidència de MDR-TB o amb la confirmació de tuberculosi sensible als antituberculosos • amb pobres programes de seguiment, absència de dades epidemiològiques i pocs recursos per implementar tractaments individualitzats 	<p>Recomanat 2 HRZES / 1 IRZE^d</p> <p>Opcional 2 (HRZES)³ / 1 HRZE</p> <p>Règims especialment dissenyats, estàndards o individualitzats</p> <p>Recomanat: 2 INH RIF PZA ETB STR/ 1 INH RIF PZA ETB</p> <p>Opcional: 2 (INH RIF PZA ETB STR)³/ 1 INH RIF PZA ETB³</p>	<p>Recomanat 5 HRE^d</p> <p>Opcional 5(INH RIF ETB)</p> <p>Recomanat 5 INH RIF ETB</p> <p>Opcional: 5(INH RIF ETB)³</p>
III	<p>Pacients nous amb bacil·loscòpia negativa (no inclosos en l'apartat I) i formes lleus de tuberculosi extrapulmonar</p>	<p>Recomanat: 2 INH RIF PZA ETB^e</p> <p>Opcional: 2 (INH RIF PZA ETB)³ o 2 INH RIF PZA ETB</p>	<p>Recomanat 4INH RIF 4(INH RIF)³</p> <p>Opcional 4 (INH RIF)³ o 6 INH ETB</p>
IV	<p>TB Crònica (bacil·loscòpia positiva al finalitzar el re-tractament supervisat); casos comprovats o sospitosos de MDR-TB^f</p>	<p>Règims especialment dissenyats, estàndards o individualitzats</p>	<p>Règims especialment dissenyats, estàndards o individualitzats</p>

a: El nombre que precedeix les inicials del fàrmac indica la durada del tractament en mesos. Els números que apareixen després de les inicials en superíndex, indiquen el nombre de vegades per setmana que s'han d'administrar els fàrmacs. L'absència de nombre indica que seran administrades diàriament.

b: ETB: etambutol; INH: isoniazida; RIF: rifampicina; PZA: pirazinamida.

c: l'estreptomicina (STR) es pot utilitzar en lloc de l'etambutol. En meningitis tuberculosa, l'etambutol cal substituir-lo per la estreptomicina.

d: el tractament diari és preferible. D'altra banda, dos cops per setmana també és una opció acceptable.

e: L'etambutol pot ser eliminat en pacients amb tuberculosi pulmonar no cavitada, amb bacil·loscòpia negativa, HIV negatiu, pacients amb formes lleus de tuberculosi extrapulmonar, i nens o adolescents amb tuberculosi primària.

f: és recomanable fer l'antibiograma en pacients que han estat en contacte amb MDR-TB

Objectius

2. Objectius



Objectius

Objectius principals:

1. Avaluar els mètodes diagnòstics del laboratori de Micobacteris: examen directe, amplificació d'àcids nucleics, aïllament per cultiu, i identificació.
2. Seguiment de les resistències als antituberculosos en els malalts nous i amb tractament previ.

Objectius secundaris:

1. Avaluació de dos sistemes no radiomètrics (MB/BacT ALERT® i BACTEC MGIT 960®) per l'estudi de la sensibilitat als antituberculosos de primera línia.
2. Caracterització molecular dels mecanismes de resistència als fàrmacs de primera línia.
3. Descripció dels diferents llinatges de les soques resistents aïllades a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

3. Material i mètodes



3.1 Població de referència

L'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP) dóna servei a una població del voltant de 300.000 individus. La majoria de la seva població d'influència pertany als districtes de L'Eixample Dret, Gràcia, Horta-Guinardó, Sant Andreu i Sant Martí. El 49% dels seus usuaris són majors de 65 anys amb una distribució de sexes homogènia. (Consorti sanitari de Barcelona. Memòria HSCiSP 2006). Les taxes d'immigració, econòmiques i de tuberculosi queden reflectides a la taula 13.

Taula 13: Taxes d'immigració, econòmiques i de tuberculosi per districtes de Barcelona (Departament d'estadística. Ajuntament de Barcelona. (15)).

Districte	Índex Renda familiar per càpita 2005	Taxa immigració 2006	Taxa de tuberculosi 2006	% nacionalitats estrangeres més freqüents (gener 2007)	
Barcelona	100	59,1	27,7	Equador	10
				Itàlia	7
				Bolívia	6,5
Ciutat Vella	72,0	170,7	83,74	Pakistan	14,6
				Filipines	9,9
				Marroc	9,6
Eixample	116,3	59,9	20,19	Itàlia	10,2
				Xina	8,1
				Equador	7,1
Sants-Montjuïc	80,7	64,5	38,92	Equador	12,1
				Marroc	7,1
				Perú	6,9
Les Corts	139,4	45,6	11,84	França	9,3
				Itàlia	8,8
				Colòmbia	6,4
Sarrià-Sant Gervasi	178,8	45,3	8,11	Itàlia	11,8
				França	11,7
				Alemanya	5,9
Gràcia	104,5	52,5	21,22	Itàlia	11,3
				Equador	7,0
				França	6,6
Horta-Guinardó	85,5	39,1	17,16	Equador	14,6
				Bolívia	8,4
				Perú	8,1
Nou Barris	68,5	44,2	27,00	Equador	23,2
				Bolívia	10,6
				Perú	6,6
Sant Andreu	82,4	44,3	15,70	Equador	16,3
				Perú	11,2
				Marroc	7,6
Sant Martí	85,7	49,9	27,31	Equador	11,9
				Pakistan	7,0
				Perú	6,8

La taxa de tuberculosi va directament lligada a les condicions socioeconòmiques de la població. La major taxa de tuberculosi de la ciutat es detecta al districte de Ciutat Vella on l'índex familiar de renda per càpita es troba 23 punts per sota del de la ciutat de Barcelona i presenta la major taxa d'immigració, gairebé triplicant la de la ciutat de 59,1 a 170,7. Aquestes dades es veuen reflectides en la taxa de tuberculosi observada amb un valor de 83,74, comparada amb el 27,7 de tota la ciutat. També es destacable que la majoria de la població immigrant prové de països amb una elevada prevalença de tuberculosi. A l'altra banda de la forquilla es troba el districte de Sarrià-Sant Gervasi, amb una taxa de tuberculosi del 8,11, on la taxa de renda familiar per càpita és del 178,8 i la d'immigració del 45,3, i on la majoria d'immigrants provenen de països europeus amb una baixa prevalença de tuberculosi.

Les dades de la població dels districtes d'influència de l'HSCiSP es troben en un nivell mig. L'índex de renda familiar per càpita oscil·la entre el 85,5 d'Horta-Guinardó i el 116,3 de l'Eixample. Les taxes d'immigració oscil·len entre 59,9 de l'Eixample i 39,1 d'Horta-Guinardó. El terme mig d'aquestes dades també es veu reflectit en les taxes de tuberculosi que s'observen, des del 27,31 de Sant Martí, molt propera a la global de la ciutat de Barcelona (27,7) al 17,16 d'Horta-Guinardó.

Per a l'anàlisi de les dades d'evolució de l'aïllament de les diferents espècies de micobacteris és útil conèixer l'evolució de la infecció pel VIH i els casos de SIDA a la ciutat de Barcelona (figura 29).

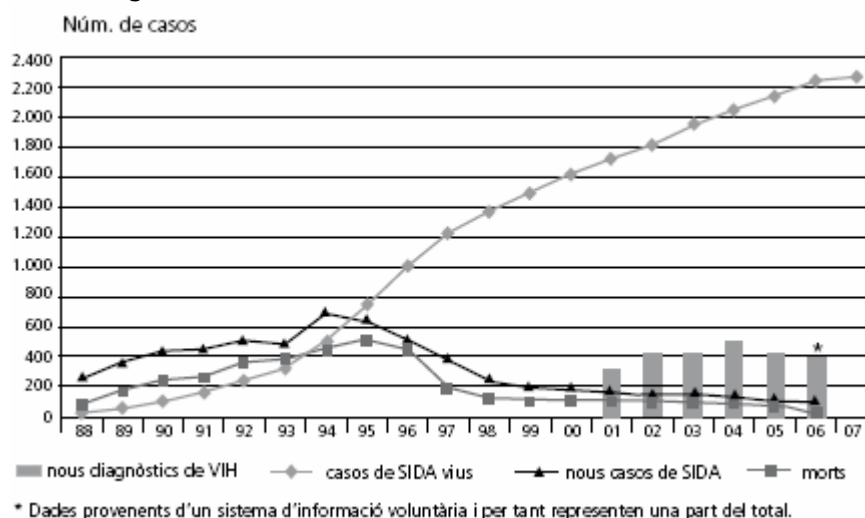


Figura 29: Evolució anual dels nous casos, del nombre de morts i dels casos de SIDA que consten com a vius a 30 de setembre de 2007. Nous diagnòstic d'infecció pel VIH (2001-2006).
 Font: Agència de Salut Pública. Consorci sanitari de Barcelona. Informe 76 SIDA a Barcelona.

3.2 Digestió i descontaminació (5, 69)

La N-Acetil-L-Cisteïna (NALC) és un bon agent mucolític que a concentracions entre el 0.5 i el 2 % pot digerir ràpidament espunts amb un elevat contingut de moc. La descontaminació es porta a terme mitjançant l'addició de hidròxid sòdic. La concentració final de NaOH a la mostra és d'un 1%. Cal tenir en compte que la vida útil de la mescla és curta, 24 hores, tot i que la participació del citrat sòdic ajuda a la prevenció de la inactivació de la NALC actuant com a quelant captant els ions metàl·lics que poden estar presents en la mescla. El tampó fosfat utilitzat per a la neutralització fa també més efectiva la sedimentació dels micobacteris.

❖ Reactius

- ◆ Solució de treball (preparar la mescla abans de la seva utilització i rebutjar-la 24 hores després de la seva preparació).
 - N-acetil-cisteïna 2.5g
 - Citrat sòdic 3% 250ml
 - citrat sòdic dihidratat 33 g
 - aigua destil·lada 1000 ml
 - NaOH 4% 1N 250 ml
 - hidròxid sòdic (NaOH) 40 g
 - aigua destil·lada 1000 ml
- ◆ Tampó fosfat
 - NaHPO₄ 4.73 g
 - KH₂PO₄ 4.53 g
 - aigua destil·lada 1000 ml.

Autoclavar els reactius a 121°C durant 15 minuts

❖ Procediment

1. Col·locar la mostra en un tub de fons cònic estèril de 50 ml.
2. Afegir un volum equivalent de solució de treball.
3. Homogeneïtzar amb un mesclador no més de 30 segons.
4. Deixar a temperatura ambient 15 minuts.
5. Afegir el tampó fosfat fins a un volum de 50 ml. Mesclar bé invertint el tub varies vegades.
6. Centrifugar a 4000 rpm durant 20 minuts. Decantar el sobrenedant.

7. Fer dues extensions en un portaobjectes i fixar per d'escalfor a 65–70°C durant dues hores.
8. Resuspendre el botó amb aigua destil·lada estèril per tal de sembrar en els medis de cultiu triats.

3.3 Examen directe (5, 171, 246)

3.3.1 Tinció de Ziehl–Neelsen

❖ **Reactius:**

- ❖ Fucsina de Ziehl

fucsina bàsica	3 g
fenol	50 ml
etanol	100 ml
- ❖ Solució àcid–alcohòlica

àcid clorhídric	3 ml
alcohol etílic	97 ml
- ❖ Colorant de contrast

blau de metilè	0,3 g
aigua destil·lada.	100 ml

❖ **Procediment**

1. Recobrir la preparació amb fucsina de Ziehl. Deixar-la actuar durant 20 minuts. Escalfar amb un flamejador de manera periòdica, al començar i cada 10 minuts. Decantar i rentar amb aigua.
2. Decolorar amb la solució àcid–alcohòlica de 30 segons a 2 minuts. Rentar amb aigua.
3. Recobrir la preparació amb blau de metilè durant 1 minut. Decantar, rentar amb aigua i assecar.
4. Observar al microscopi amb objectiu d'immersió (100x)

3.3.2 Tinció amb Auramina

❖ **Reactius:**

- ❖ Auramina. (ref: CL0001–1 Reactivos para diagnostico (REDI)).
- ❖ Solució àcid–alcohòlica

àcid clorhídric	3 ml.
alcohol etílic	97 ml.
- ❖ Colorant de contrast

Permanganat potàssic. (ref: CL 0031–1 Reactivos para diagnóstico.(REDI))

❖ **Procediment**

1. Tenyir per immersió la preparació amb auramina 20 minuts. Rentar amb aigua.
2. Decolorar durant 2 minuts amb la solució àcid-alcohòlica. Rentar amb aigua.
3. Tenyir per immersió amb permanganat de potassi durant 2 minuts.
4. Observar al microscopi de fluorescència (40x). Quan s'observin bacils àcid-alcohol resistents cal comprovar amb una tinció de Ziehl-Neelsen. Es pot utilitzar la mateixa extensió i tenyir a sobre.

Obtenció, càlcul i expressió de resultats

Observar al microscopi la preparació i comptar els bacils àcid-alcohol resistents.

Els resultats s'expressen segons la taula següent:

Taula 14: Quantificació de les baciloscòpies.

Nº bacils àcid-alcohol resistents (baar)		Resultat
100x	40x	
0	0	No s'observen baar
1-2/300 camps	1-2/250 camps	No s'observen baar
1-9/100 camps	1-9/25 camps	S'observen escassos baar
1-9/10 camps	1-9/10 camps	S'observen alguns baar
1-9 camp	1-9 camps	S'observen bastants baar
> 9 camp	> 9 camp	S'observen abundants baar

3.4 Medis de cultiu, incubació i lectura (5, 134, 206)

En funció de la sospita etiològica i de la localització anatòmica de la mostra s'inocularan uns i/o altres medis de cultiu, i s'incubaran a diferents temperatures i durant un temps més o menys llarg. Distribuïrem la mostra prèviament descontaminada, homogeneïtzada i concentrada pels diferents medis de cultiu de la següent manera:

- ◆ tubs de Löwenstein-Jensen: 0.4 ml de mostra
- ◆ 0,5 ml de mostra en 1 flascó de medi líquid, s'utilitzaran de forma alterna setmanalment
 - BD BACTEC™ 12B (complementat amb 0.1 ml de PANTA suplement antibiòtic)
 - BacT/ALERT® MP (complementat amb 0.5 ml de MB/BacT® *Antibiòtic Supplement*)

En biòpsies de pell i mostres on es sospiti la presència de micobacteris de creixement ràpid caldrà incubar un dels 2 tubs de medi sòlid a 28–30°C i sembrar un BD BACTEC™ 12B (complementat amb 0.1 ml de PANTA) per incubar-lo a 28–30°C.

Per l'estudi de micobacteris en sang o moll d'os s'inocula un vial de BacT/ALERT® MB, que un cop arriba al laboratori cal suplementar amb 0.5 ml del vial d'enriquiment.

❖ Incubació i lectura

Taula 15: Tipus de medis utilitzats al laboratori de micobacteris de l'HSCiSP, temps d'incubació i periodicitat en la lectura

Tipus de medi	Temperatura d'incubació (°C)	Temps d'incubació	Periodicitat de lectura
Lowenstein-Jensen	35–38 i/o 28–30	8 setmanes	Quinzenal
BD BACTEC™ 12B	35–37 i/o 28–30	8 setmanes	1er mes: dos cops per setmana 2on mes: setmanal
BacT/ALERT® MP	37	8 setmanes	Lectures automàtiques diàries.
BacT/ALERT® MB	37	12 setmanes	Lectures automàtiques diàries

3.5 Detecció d'àcids nucleics directament en la mostra clínica

Per a la realització de la tècnica s'han utilitzat els kits de la casa Gen-Probe, Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct test (AMTD) (BioMerieux/Gen-Probe), seguint el protocol indicat pel fabricant.

❖ Preparació de la mostra:

1. Dispensar 50µl del tampó diluent de mostra en cada un dels tubs de lisi necessaris.
2. Dispensar 450µl del sediment de la mostra descontaminada, 450µl de control negatiu i 450µl de control positiu en el tub de lisi corresponent. Homogeneïtzar.
3. Sonicar durant 15 minuts per tal de lisar els micobacteris.
4. Reconstituir el reactiu d'amplificació liofilitzat amb 3 ml del tampó de reconstitució i homogeneïtzar fins la seva completa dissolució. Aliquotar 0.5 ml en tubs *ependorf* de 1.5 ml. I congelar a –20°C.
Dispensar 50µl del reactiu d'amplificació en el fons del tub d'amplificació.
5. Dispensar 200µl del reactiu oli en el tub d'amplificació.
6. Transferir 25 µl del lisat, control d'amplificació negatiu i control d'amplificació positiu en el fons del tub d'amplificació.

7. Col·locar la gradeta de tubs d'amplificació en el incubador Gen-Probe a 95° durant 15 minuts.
8. Col·locar la gradeta de tubs d'amplificació en el incubador Gen-Probe a 42° durant 5 minuts.
9. Reconstituir el reactiu enzim amb 1.5 ml. de tampó de dilució de l'enzim.
Al·liquotar 0.25 ml/tub i congelar a -20°C
Dispensar 25 µl de la mescla enzimàtica en cada tub d'amplificació, mantenint-los a 42°C.
Mantenir la mescla enzimàtica a la nevera fins el moment d'utilitzar-ho.
10. Tapar els tubs amb una làmina adhesiva. Agitar la gradeta de tubs d'amplificació per aconseguir una bona homogeneïtzació de les mostres amb l'enzim.

❖ **Hibridació i detecció:**

1. Afegir 100 µl de reactiu d'hibridació *Mycobacterium tuberculosis hybridization reagent* (reconstituït amb 6 ml de *Mycobacterium hybridization buffer*).
2. Homogeneïtzar 1 seg. tres vegades.
3. Incubar a 60°C 15 minuts en bloc de calor de Gen-Probe
4. Treure i afegir 300 µl de *Mycobacterium selection reagent*.
5. Mesclar 1 seg. tres vegades.
6. Incubar a 60°C 15 minuts en bloc de calor de Gen-Probe.
7. Treure i refredar a T^a ambient durant 5 minuts.
8. Llegir amb el luminòmetre.

❖ **Interpretació dels resultats:**

Control negatiu >20.000 RLU (unitats relatives de luminescència)

Control positiu > 500.000 RLU

Mostres negatives < 30.000 RLU

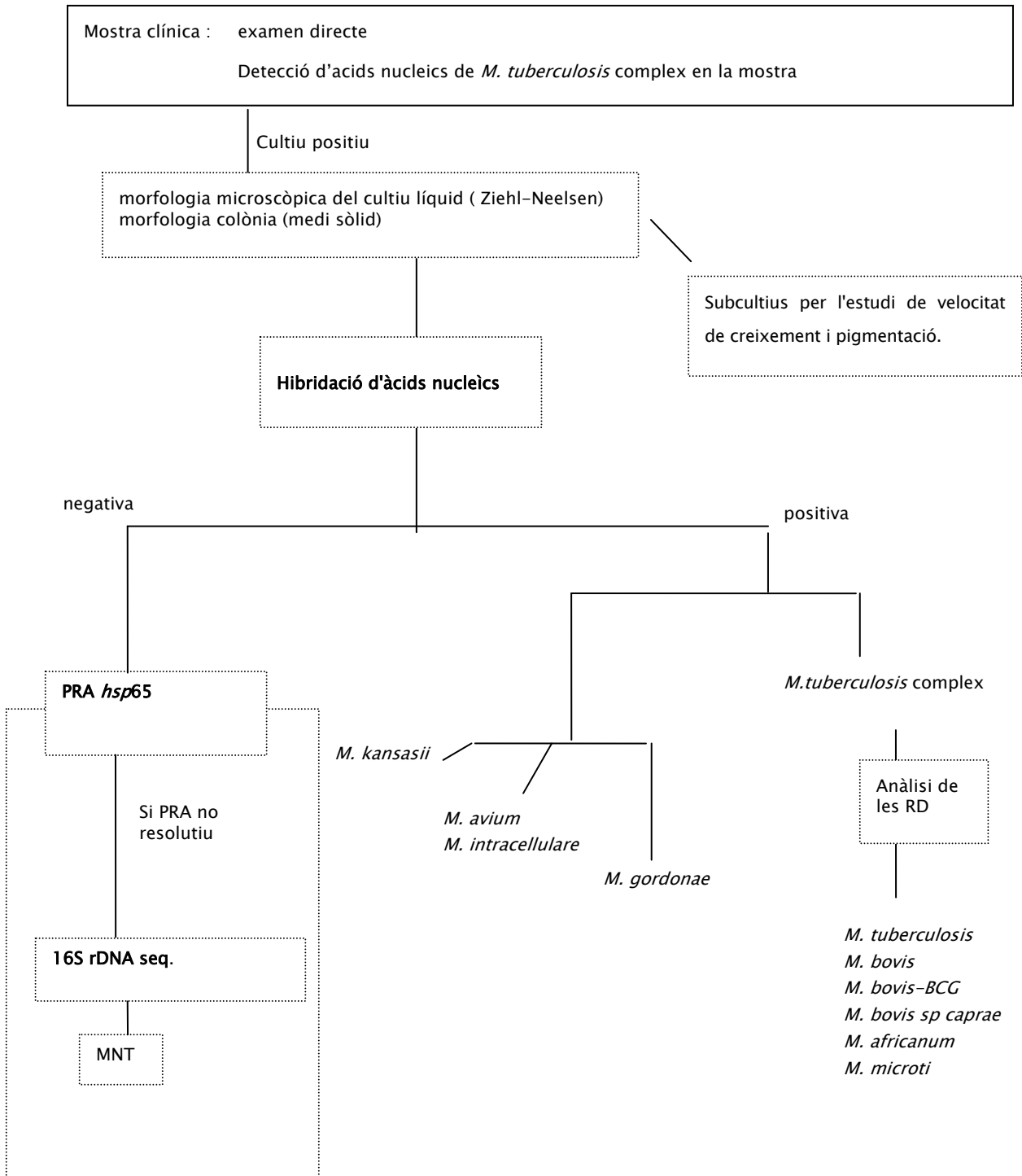
Mostres positives > 10⁶ RLU

Mostres indeterminades entre 30.000 i 1.000.000 RLU.

3.6 Identificació dels micobacteris

L'algoritme per a la identificació escollit en el nostre laboratori s'inicia amb la confrontació amb les sondes d'hibridació AccuProbe (BioMerieux/Gen-Probe). En cas de no ser resolutives, es continua amb una identificació fenotípica de pigmentació, velocitat i temperatura òptima de creixement seguit de PCR-RFLP *hsp65*, si aquest no és resolutiu es seqüència una part del gen que codifica per a la 16S rRNA i/o del gen que codifica per a la *hsp65*. L'algoritme de treball està esquematitzat en la figura 30.

Figura 30: Algorisme de treball per a la identificació d'espècies al laboratori de micobacteris de l'HSCiSP



3.6.1 Identificació per sondes de hibridació. Accuprobe [BioMerieux, Gen-probe] (5, 132, 159, 197)

El sistema utilitza una sonda de DNA monocatenari amb un marcador quimioluminiscent, que es complementaria al rRNA de l'organisme diana. Es disposa de sondes comercials específiques per al complex *M. tuberculosis*, per al complex *M. avium*, i per a les espècies *M. avium* i *M. intracellulare*, *M. gordonae*, i *M. kansasii*.

❖ Procediment

1. En cas de treballar a partir d'un vial líquid dispensar 2 ml del vial amb creixement i centrifugar a 4000 r.p.m. durant 20 minuts. Decantar completament el sobrenedant.
2. Resuspendre en 100µl de *reactiu 1* i 100µl de *reactiu 2*. Agitar enèrgicament fins la total resuspensió del sediment.
3. Transferir 200µl de la suspensió al tub de reactiu de lisis [*Lysing reagent tube*]. En cas de treballar amb colònies a partir de medi sòlid farem la suspensió directament al tub de lisi.
4. Ultrasonicar 15 minuts a temperatura ambient.
5. Inactivar 10 minuts a 95°C.
6. Transferir 100 µl del lisat al tub d'hibridació.
7. Incubar 15 minuts a 60°C.
8. Afegir 300 µl de reactiu 3 i incubar a 60°C.
 - 5 minuts per *M. avium* complex, *M. avium*, *M. intracellulare* i *M. gordonae*
 - 8 minuts per *M. kansasii*
 - 10 minuts per a *M. tuberculosis complex*
9. Deixar refredar 5 minuts a temperatura ambient i llegir al luminòmetre.
 - Valor \geq 30.000 positiu
 - Valor $<$ 30.000 negatiu

3.6.2 Estudi de velocitat i temperatura òptima de creixement i pigmentació (5, 133, 136, 244)

Per tal d'orientar la identificació del micobacteri aïllat, cal tenir sempre present com a referència la seva velocitat i temperatura òptima de creixement, així com el tipus de pigmentació.

❖ **Procediment:**

1. Preparar una suspensió bacteriana 1 McFarland de la soca a identificar (cultiu recent 2–3 setmanes) en un tub amb aigua destil·lada estèril i perles de vidre.
2. Realitzar dilucions 1/10.000. Preparar 4 tubs amb 9 ml d'aigua destil·lada estèril i passar 1 ml de la suspensió inicial al tub 1 i així successivament fins el tub 4.
3. Sembrar 0.1 ml en 6 tubs de Löwenstein–Jensen, embolicar-ne 3 amb paper d'alumini. Incubar una parella de tubs, un tapat i l'altre sense tapar, a cada temperatura d'incubació, 30, 37 i 42°C.
4. Observar als 3, 5 i 7 dies, i posteriorment setmanalment. Els aïllaments que creixin durant els primers 7 dies es consideraran micobacteris de creixement ràpid, i els que creixin després de creixement lent.
5. Quan el creixement ja és visible en el tub sense tapar es desemboliquen els tubs tapats, si no presenten pigmentació, per tal d'induir-ne la producció cal exposar un dels tubs a la llum d'una bombeta de tungstè a 20 cm aproximadament durant 2h.
6. Posteriorment el tub es torna a tapar i es segueix incubant 24 i/o 48 hores buscant un possible canvi en la pigmentació.

Canvi de color: soca fotocromògena (cal tenir en compte que *M. szulgai* és fotocromògen a 25°C i escotocromògena a 37°C)

Sense canvis: soca no pigmentada

Soca ja inicialment pigmentada: soca escotocromògena

3.6.3 Anàlisi del polimorfisme dels fragments de restricció associats al gen *hsp65* (PCR–RFLP *hsp65*) (42, 52, 70, 127, 205, 224, 226)

❖ **Extracció de DNA**

A partir d'un cultiu sòlid es realitza una suspensió de 2 o 3 colònies en 500 µl d'aigua destil·lada estèril, s'inactiven els micobacteris al bany a 95° 20 min.

L'extracció de DNA es realitza amb el kit *Instagen Matrix* (BioRad) seguint les instruccions de la casa comercial.

❖ **Obtenció d'amplificats per PCR, obtenció dels fragments de restricció.**

Es realitza l'amplificació d'un fragment d'unes 440 pb del gen *hsp65* que codifica per una proteïna de xoc tèrmic de 65 kDa. amb els iniciadors Tb11 i Tb12. Posteriorment es realitza la digestió d'aquest fragment amb els enzims *BstEII* i *HaeIII* segons el protocol descrit per Telenti i cols. 1993 (226).

Iniciadors

- ◆ Tb11 5'- ACCAACGATGGTGTGTCAT-3'
- ◆ Tb12 5'- CTTGTGGAACCGCATACCCT-3'

❖ Anàlisi dels patrons de restricció

La separació dels fragments es realitza per electroforesi en gel d'agarosa al 4 % i la visualització dels fragments obtinguts amb llum UV mitjançant la tinció del DNA amb bromur d'etidi. Les imatges obtingudes es guarden informatitzades i anàlisi dels fragments es realitza amb el sistema informàtic *Bio Image System* (Millipore; USA) i *Fingerprinting II Informatix Software* (Bio-Rad, CA, USA) (figura 31).

Un cop obtingudes les mides dels fragments la identificació de l'espècie de micobacteri es realitzà comparant aquest patrons amb els algoritmes publicats per Brunello i cols. i amb les actualitzacions que han proposat Chimara i cols Esparcia i cols. (en premsa) , i amb els inclosos a la base *PRASITE* disponible per internet: www.app.chuv.ch/prasite (taula 16).

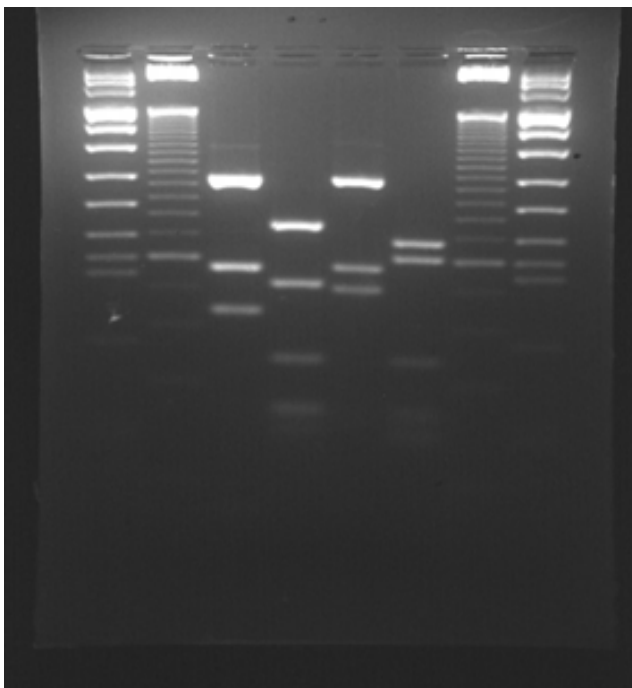


Figura 31:

Carrils 1,2,7,8 marcadors de pes molecular conegut.

Carrils 3 i 4 digestions amb *BstEII* i *HaeIII* d'una soca de *M. xenopi*.

Carrils 5 i 6 digestions amb *BstEII* i *HaeIII* d'un patró corresponent a *M. intracellulare* o *M. chimaera* (caldrà la seqüenciació per identificar-la).

taula 16: Algoritme per a la identificació dels aïllaments de micobacteris a nivell d'espècie per PCR-RFLP *hsp65*

llargada dels fragment digerits amb <i>BstEII</i> (bp)	llargada dels fragment digerits amb <i>HaeIII</i> (bp) ^{a, b}	Espècies ^c
No digestió	197, 87, 58	<i>M. confluentis</i>
	184, 107	<i>M. gilvum</i>
	175, 87, 59	<i>M. gadium</i> CIP105388
	171, 87	<i>M. tusciae</i>
	168, 127	<i>M. triviale</i> DSM44153
	161, 87, 59, 58	<i>M. vaccae</i> CIP105934
	(160), (85), (55)	<i>M. flavescens</i> Type III
	(145), (130)	<i>M. simiae</i> Type V
	145, 127	<i>M. florentinum</i> DSM44852
	145, 127	<i>M. lentiflavum</i> Type I CIP105465
	145, 87, 59, 58, 52	<i>M. komossense</i> CIP105293
	145, 87, 59, 58	<i>M. parafortuitum</i> CIP106802
	145, 69, 58, 54	<i>M. brumae</i>
	139, 98, 58, 51	<i>M. holsaticum</i> DSM44478
	139, 87, 58	<i>M. flavescens</i> Type II
	139, 58, 51	<i>M. flavescens</i> CIP104533
	139, 58, 51	<i>M. novocastrense</i> CIP105546
	134, 127, 65	<i>M. duvalii</i> CIP104539
	127, 114, 70, 58	<i>M. aurum</i> Type II CIP 104465
	127, 103, 69	<i>M. szulgai</i>
127, 103, 59	<i>M. nebraskense</i> ATCCBAA-837	
325, 116	196, 69, 58, 54	<i>M. aichiense</i>
	185, 145	<i>M. fallax</i> CIP81.39
	181, 127	<i>M. terrae</i> Type I ATCC15755
	161, 123, 58	<i>M. rhodesiae</i>
	(145), (130)	<i>M. lentiflavum</i> Type II
	(145), (130)	<i>M. simiae</i> Type IV
	145, 127, 59	<i>M. montefiorensis</i> ATCCBAA-256
	145, 127, 51	<i>M. triplex</i> CIP106108
	(145), (115), (70)	<i>M. terrae</i> Type V
	145, 65, 59, 58	<i>M. mucogenicum</i> Type IV
	145, 65, 59, 58	<i>M. phocaicum</i> Type III
	145, 58	<i>M. arupense</i> Type I ATCCBAA-1242
	145	<i>M. cookii</i> CIP105396
	(140), (85), (60)	<i>M. terrae</i> Type VII
	139, 94, 58	<i>M. nonchromogenicum</i> Type II
	139, 87, 58	<i>M. chitae</i>
	139, 65, 58	<i>M. mucogenicum</i> Type V
	139, 58	<i>M. terrae</i> Type III
	(130), (110), (70), (60)	<i>M. gordonae</i> Type VIII
	(130), (95), (75), (60)	<i>M. kansasii</i> Type V
127, 112, 70, 59	<i>M. gordonae</i> Type IV	
127, 112, 69	<i>M. kumamotoense</i>	
127, 103	<i>M. genavense</i>	
310, 131	197, 60, 58, 54	<i>M. chelonae</i>
	197, 60, 58, 54	<i>M. salmoniphilum</i> ATCC13758
	175, 87, 58	<i>M. sphagni</i> DSM44076
	161, 123, 58	<i>M. madagascariense</i> CIP104538
	160, 112, 111	<i>M. haemophilum</i>
	145, 69, 58, 54	<i>M. immunogenum</i> CIP106684
	139, 134, 51	<i>M. elephantis</i> Type I CIP106831
	139, 134, 51	<i>M. pulveris</i>
	(140), (100), (60)	<i>M. elephantis</i> Type II
	139, 94, 78	<i>M. canariensis</i> CIP 107998
	139, 94, 78	<i>M. cosmeticum</i> ATCC BAA-878
	139, 65, 58	<i>M. mucogenicum</i> Type I ATCC49650
	127, 114, 58	<i>M. botniense</i> DSM44537
	127, 94, 78	<i>M. lacus</i> DSM44577

llargada dels fragment digerits amb <i>Bst</i> II (bp)	llargada dels fragment digerits amb <i>Hae</i> III (bp) ^{a, b}	Espècies ^c
310, 116	244, 139	<i>M. fluoranthenorans</i> DSM44556
	181, 161	<i>M. fredericksbergense</i> DSM44346
	181, 139	<i>M. terrae</i> Type II
	172, 139	<i>M. neoaurum</i> CIP105387
	146, 139, 58	<i>M. diernhoferi</i> CIP105384
	145, 78, 58	<i>M. augbanense</i> CIP 108543
	145, 65, 58	<i>M. phocaicum</i> CIP108542 Type I
	145, 65, 58	<i>M. mucogenicum</i> TypeII CIP105223
	139, 87, 58	<i>M. mucogenicum</i> Type III
	139, 87, 58	<i>M. phocaicum</i> Type II
	139, 65, 58	<i>M. phocaicum</i> Type IV
	223, 106	<i>M. shottsii</i> ATCC700981
	197, 87, 58	<i>M. moriokaense</i> CIP105393
	197, 69, 58	<i>M. bolletii</i> CIP 108541
	197, 69, 58	<i>M. massiliense</i> CCUG 48898
	(190), (105), (80)	<i>M. ulcerans</i> Type II
	188, 126	<i>M. simiae</i> Type I
	(185), (130)	<i>M. genavense</i> Type II ATCC51233
	178, 134, 72, 51	<i>M. thermoresistibile</i> CIP105390
	178, 98, 51	<i>M. hassiacum</i> CIP105218
	162, 94, 51	<i>M. poriferae</i>
	161, 58, 51	<i>M. austroafricanum</i> CIP 105395
	161, 58, 51	<i>M. vanbaalenii</i> DSM7251
	(155), (140)	<i>M. simiae</i> Type II
	146, 139, 98, 52	<i>M. peregrinum</i> Type I CIP105382
	145, 139, 75	<i>M. parascrofulaceum</i> Type V
	(145), (130), (60)	<i>M. parmense</i> CIP107385
(145), (130)	<i>M. seoulense</i> DSM44998	
(145), (130)	<i>M. intracellulare</i> Type III	
145, 129, 127	<i>M. intermedium</i> CIP104542	
145, 127, 95	<i>M. scrofulaceum</i> Type I	
145, 127	<i>M. saskatchewanense</i> ATCCBAA-544	
145, 127	<i>M. simiae</i> Type VI	
145, 127	<i>M. avium</i> Type III	
145, 127	<i>M. interjectum</i> Type I	
145, 106, 78	<i>M. ulcerans</i> CIP105425	
145, 106, 78	<i>M. pseudoshottsii</i> ATCCBAA-883	
145, 106, 78	<i>M. marinum</i>	
145, 106	<i>M. bohemicum</i> CIP 105811	
(145), (105), (80)	<i>M. malmoense</i> Type II	
145, 69, 58, 52	<i>M. abcessus</i>	
(140), (125), (60), (50)	<i>M. senegalense</i> Type III ATCC35796	
(140), (105), (80)	<i>M. intracellulare</i> Type II	
140, 81, 58, 51	<i>M. phlei</i> CIP105389	
139, 123, 98, 52	<i>M. peregrinum</i> Type II	
139, 123, 98, 52	<i>M. septicum</i> ATCC700731	
139, 123, 98, 52	<i>M. porcinum</i> ATCC33776	
139, 123, 58, 52	<i>M. boenickei</i> CIP107829	
139, 112, 69	<i>M. terrae</i> Type IV	
139, 103, 58	<i>M. kubicae</i> CIP106428	
139, 103	<i>M. conspicuum</i> CIP105165	
139, 87, 59, 58	<i>M. chubense</i> CIP106810	
139, 87, 58	<i>M. chlorophenolicum</i> CIP104189	
139, 87, 58	<i>M. obuense</i>	
127, 112, 95	<i>M. intracellulare</i> Type V	
127, 112	<i>M. gordonae</i> Type V	
127, 112	<i>M. interjectum</i> Type II	
127, 112	<i>M. heidelbergense</i> CIP105424	
127, 103, 78	<i>M. kansasii</i> Type I CIP104589	
127, 103, 78	<i>M. branderi</i> CIP104592	
127, 103, 59	<i>M. avium</i> Type II	
127, 103	<i>M. avium</i> Type I ATCC25291	
127, 103	<i>M. colombiense</i> CIP108962	
127, 94, 81, 78	<i>M. parascrofulaceum</i> Type III	
127, 94	<i>M. palustre</i> DSM44572	
127, 78, 58	<i>M. celatum</i> Type I CIP106109	
(120), (115), (110)	<i>M. intracellulare</i> Type IV	
112, 106	<i>M. asiaticum</i> DSM44297	

llargada dels fragment digerits amb <i>Bst</i> II (bp)	llargada dels fragment digerits amb <i>Hae</i> III (bp) ^{a, b}	Espècies ^c	
231, 131, 79	181, 161	<i>M. doricum</i> DSM44852	
	(175), (80)	<i>M. aurum</i> Type I	
	161, 145, 59	<i>M. agri</i>	
	161, 87, 58	<i>M. monacense</i>	
	145, 123, 58	<i>M. smegmatis</i> CIP104444	
	139, 81, 58	<i>M. tokaiense</i> CIP106807	
	146, 145, 98, 52	<i>M. alvei</i> CIP103464	
	146, 139, 98, 58	<i>M. peregrinum</i> Type III	
	145, 123, 58, 52	<i>M. mageritense</i> Type I CIP104973	
	145, 123, 58, 52	<i>M. alvei</i> Type II	
	145, 127	<i>M. simiae</i> Type III	
	145, 123, 58	<i>M. goodii</i> ATCC700504	
	145, 123, 58	<i>M. mageritense</i> Type II	
	145, 81, 58	<i>M. murale</i> CIP105980	
	(140), (85)	<i>M. wolinskyi</i> Type II	
	(140), (120), (95)	<i>M. gordonae</i> Type VI	
	139, 103, 69	<i>M. shimoidae</i> DSM44152	
	139, 123, 98, 52	<i>M. senegalense</i> Type II	
	139, 123, 59	<i>M. fortuitum</i> Type II ATCC19542	
	139, 123, 58	<i>M. wolinskyi</i> Type I ATCC700010	
	139, 87, 58	<i>M. mageritense</i> Type III	
	139, 81, 58	<i>M. hodleri</i> CIP104909	
	(130), (105), (80)	<i>M. celatum</i> Type II ATCC51130	
	(130), (95), (70)	<i>M. kansasii</i> Type III	
	127, 103, 101	<i>M. kansasii</i> Type II	
	127, 103, 69	<i>M. gastri</i>	
	127, 103, 69	<i>M. kansasii</i> Type VI	
	127, 94	<i>M. parascrofulaceum</i> Type IV	
	231, 116, 94	161, 112, 59	<i>M. gordonae</i> Type IX
		161, 103, 59	<i>M. heckeshornense</i> DSM44428
(155), (110)		<i>M. gordonae</i> Type VII	
(145), (130)		<i>M. lentiflavum</i> Type III	
145, 127, 59		<i>M. chimaera</i> CIP107892	
145, 127, 57		<i>M. intracellulare</i> Type I	
145, 127		<i>M. scrofulaceum</i> Type III	
145, 105, 78		<i>M. malmoense</i>	
(145), (70), (60)		<i>M. terrae</i> Type VI	
(140), (125), (100)		<i>M. brisbanense</i> CIP107830	
139, 123, 58		<i>M. terrae</i> Type VIII	
139, 58		<i>M. hiberniae</i>	
127, 112, 95		<i>M. gordonae</i> Type X	
127, 112	<i>M. gordonae</i> tipo III		
127, 94, 59, 51	<i>M. intracellulare</i> Type VI		
231, 116, 79	210, 115	<i>M. gordonae</i> Type II	
	181, 139, 52	<i>M. senegalense</i> Type IV ATCC35796	
	161, 112, 57	<i>M. gordonae</i> Type I	
	161, 104, 59	<i>M. xenopi</i>	
	152, 127, 69	<i>M. tuberculosis</i> complex	
	145, 123, 58, 52	<i>M. fortuitum</i> Type I ATCC6841	
	145, 127	<i>M. sherrisii</i> ATCCBAA-832	
	145, 58, 54	<i>M. nonchromogenicum</i> Type I DSM44164	
	141, 123, 58, 52	<i>M. farcinogenes</i>	
	139, 123, 58, 52	<i>M. conceptionense</i> CIP108544	
	139, 123, 58, 52	<i>M. houstonense</i> ATCC49403	
	139, 123, 58, 52	<i>M. neworleansense</i> ATCC49404	
	139, 123, 58, 52	<i>M. senegalense</i> Type I CIP104971	
	139, 94	<i>M. parascrofulaceum</i> Type I	
	(135), (90), (85)	<i>M. fortuitum</i> type III	
	(130), (95)	<i>M. lentiflavum</i> Type IV	
	(130), (115), (75), (60)	<i>M. kansasii</i> Type IV	
127, 94	<i>M. parascrofulaceum</i> Type II ATCCBAA-614		
(125), (95)	<i>M. scrofulaceum</i> Type II		

a. les mides entre [] són els observats per a aquest fragments en patrons descrits anteriorment (70, 175, 189, 218, 224).

b. les mides entre () són els derivats de l'anàlisi de la seqüència.

c. (NF) diana de restricció no trobada en la seqüenciació. NF fragment no trobat en el patró de PRA la negreta indica PRA que no figura en algoritmes definits per Telenti i cols. (226). Taylor i cols. (224), i Devallois i cols. (70). Espècies amb més de dues soques estudiades, es mostra la mida mitja.

3.6.4 Anàlisi de les regions de diferenciació (RDs) a *M. tuberculosis* complex (170)

Anàlisi de la presència o absència d'unes regions concretes anomenades RD (Regions of Difference) que es troben delecionades de forma específica en alguns membres del complex *M. tuberculosis*.

❖ Extracció de DNA

A partir d'un cultiu sòlid en Löwenstein-Jensen es realitza una suspensió de 2 o 3 colònies en 200 µl d'aigua destil·lada estèril, s'inactiven els micobacteris al bany a 95° 20 min. L'extracció de DNA es realitza amb el kit *Instagen Matrix* (BioRad) seguint les instruccions de la casa comercial.

❖ Obtenció d'amplificats per PCR

Realitzarem 4 PCR per detectar la presència o absència de les regions RD1, RD9, RD10 i RD11.

Iniciadors:

- ◆ RD1 (regió present de 150 bp; regió absent de 200 bp)
 - ET1 5'– AAG–CGG–TTG–CCG–CCG–ACC–GAC–C–3'
 - ET2 5'– CTG–GCT–ATA–TTC–CTG–GGC–CCG–G–3'
 - ET3 5'– GAG–GCG–ATC–TGG–CGG–TTT–GGG–G–3'

- ◆ RD 9 (regió present de 306 bp; regió absent de 206 bp)
 - RD9 FF 5'– GTG–TAG–GTC–AGC–CCC–ATC–C –3'
 - RD9 Int 5'– CAA–TGT–TTG–TTG–CGC–TGC –3'
 - RD9 FR 5 – GCT–ACC–CTC–GAC–CAA–GTG–TT –3'

- ◆ RD10 (regió present de 308 bp; regió absent de 202 bp)
 - RD10 FF 5'– CTG–CAA–CCA–TCC–GGT–ACA–C –3'
 - RD10 Int 5'– GAA–GTC–GTA–ACT–CAC–CGG–GA –3'
 - RD10 FR 5'– AAG–CGC–TAC–ATC–GCC–AAG –3'

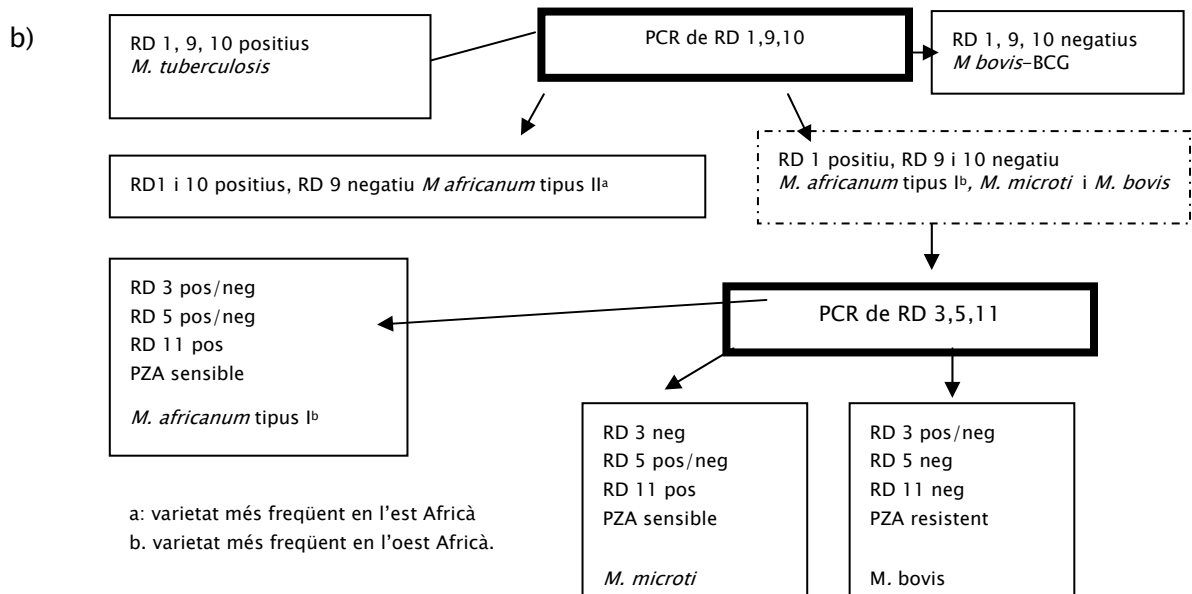
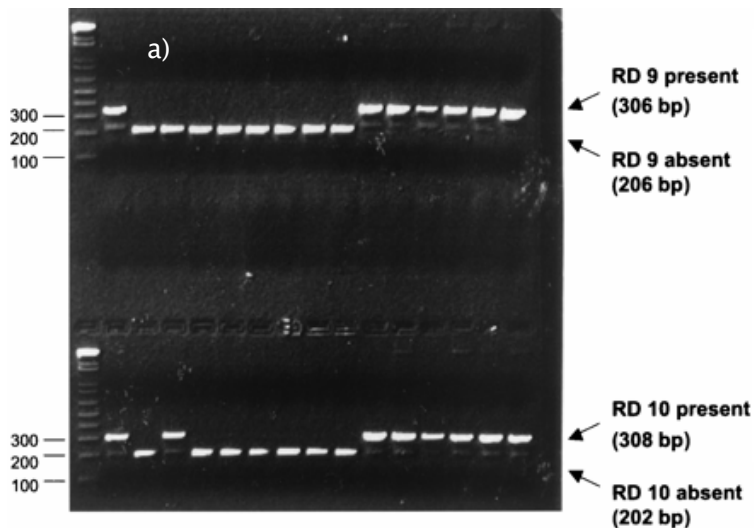
- ◆ RD11 (regió present de 454 bp; regio absent no producte)
 - RD11 intF 5– CGG–CAG–CTA–GAC–GAC–CTC –3
 - RD11 intR 5– AAC–GTG–CTG–CGA–TAG–GTT–TT –3

A cada PCR s'inclou una soca control de *M. tuberculosis* i una soca de *M. bovis*.

L'anàlisi dels amplificats obtinguts es realitza per electroforesi en un gel d'agarosa al 2%, comparant la mida de l'amplificat amb el d'un marcador de pes molecular conegut. La visualització dels fragments es fa amb llum UV mitjançant la tinció del DNA amb bromur d'etidi.

❖ Anàlisi dels patrons de restricció

Un cop conegudes les mides dels fragments, la identificació de l'espècie dins del complex *M. tuberculosis* es realitza comparant els resultats obtinguts amb l'algorisme descrit per Parsons i cols. 2002.



3.6.5 Seqüenciació del gen que codifica per la 16S rRNA i per la hsp65 (42, 129, 226)

❖ Extracció de DNA

A partir d'un cultiu sòlid en Löwenstein-Jensen es realitza una suspensió de 2 o 3 colònies en 500 µl d'aigua, s'inactiven els micobacteris al bany a 95° 20 min.

L'extracció de DNA es realitza amb el kit *Instagen Matrix* (BioRad) seguint les instruccions de la casa comercial.

❖ Obtenció d'amplificats per PCR

Iniciadors: per a l'amplificació d'un fragment d'aproximadament 900 pb. del gen que codifica per 16S rRNA

- ◆ 16S-27f 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
- ◆ 16S-907r 5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3'

Iniciadors : per a l'amplificació d'un fragment de 440 pb. de la proteïna de xoc tèrmic 65 kDa. (gen *hsp 65*)

- ◆ Tb11 5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3'
- ◆ Tb12 5'-CTTGTCGAACCGCATAACCT-3'

Un cop comprovats en un gel d'agarosa els amplificats obtinguts a la PCR, es purifiquen per eliminar els iniciadors i nucleòtids de la PCR amb el *High Pure PCR Product Purification kit* (Roche) seguint les instruccions de la casa comercial. Posteriorment es seqüencia un fragment del gen que codifica per a la 16S rRNA d'unes 500 pb, i de 440 pb. de gen *hsp 65* amb el kit comercial *fmol DNA Cycle Sequencing System* (Promega Corporation, Madison, USA) seguint les instruccions de la casa comercial.

Iniciadors per a la seqüenciació.

- ◆ 16S-27f 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
- ◆ 16S-519r 5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3'
- ◆ Tb11 5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3'
- ◆ Tb12 5'-CTTGTCGAACCGCATAACCT-3'

Els fragments obtinguts a la reacció de seqüenciació s'analitzen amb *ALF Express II* (Amersham Pharmacia Biotech).

❖ **Anàlisi de les seqüències obtingudes**

Les seqüències resultants s'analitzen amb el programa *ALFwin Sequence Analyser 2.00* (Amersham Pharmacia Biotech) i per la seva identificació es comparen amb les seqüències de soques de referència dipositades al GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) i en el cas del gen 16S rRNA també amb la base de dades del Ridom. (www.ridom-rdna.de).

3.7 Estudis de sensibilitat a *M. tuberculosis* complex (17, 111, 163, 172, 207)

3.7.1 Mètode radiomètric BACTEC 460TB^R

El mètode radiomètric BACTEC 460TB^R, defineix la resistència a un antibiòtic concret quan l'1% d'un inòcul bacterià creix en presència d'una determinada concentració crítica (concentració més baixa a la que l'antibiòtic inhibeix al 95% de la soca salvatge de *M. tuberculosis*) d'un fàrmac antituberculós.

La determinació de la sensibilitat a la pirazinamida mereix una especial atenció. El metabolit eficaç, l'àcid pirazinoic, actua a pH àcid (pH=5,5). Això implica que el pH del medi de cultiu ha d'adequar-se a aquestes condicions. No obstant això fins a un 10% dels aïllaments de *M. tuberculosis* son incapaços de créixer a aquest pH. S'ha aconseguit una adaptació establint un pH de 6 i compensant amb una major concentració de l'antibiòtic. Basat en aquesta premissa, el mètode radiomètric aconsegueix un creixement en la pràctica totalitat de les soques.

3.7.1.1 Antibiograma als antituberculosos de primera línia

Les concentracions d'antibiòtic estudiades han estat:

Isoniazida	0.1 µg/ml
Rifampicina	2 µg/ml
Etambutol	7.5 µg/ml i/o 2.5 µg/ml
Estreptomicina	6 µg/ml i/o 2 µg/ml
Pirazinamida	100 µg/ml

Per a fer l'antibiograma de primera línia es segueixen les recomanacions del fabricant:

1. Partir d'un Bactec 12B en creixement actiu: índex de creixement (IC) superior a 500 per a la INH, la RIF, l'ETB i l'STR i 200 per a la PZA.
2. Establir una atmosfera de CO₂ al 5% en tots els vials, tant en el vial control com en els vials amb antibiòtic.
3. Introduir 0.1 ml de l'antibiòtic al vial de 12B i al de pH 6 per a l'estudi de la PZA.
4. Inocular 0.1 ml del vial amb l'inòcul als vials amb antibiòtic i al vial control per a l'estudi de la PZA.
5. Diluir al 1/100 (0.1 ml en el vial amb 9.9 ml de DILUTING FLUID). Inocular 0.1 ml en el vial control de l'antibiograma SIRE.

Els vials es llegeixen diàriament, essent possible interpretar els resultats quan l'IC del vial control és ≥ 30 per a la INH, la RIF, l'ETB i l'STR i ≥ 200 per a la PZA. El temps necessari per arribar-hi ha d'oscil·lar entre 4 i 14 dies, en el cas de la pirazinamida el període es pot allargar fins a 21 dies .

En el cas de la INH, la RIF, l'ETB i l'STR quan l'augment de l'IC en el vial control és superior a l'observat en els vials amb antibiòtic, la soca es considera sensible. Per a la PZA la sensibilitat o resistència s'estableix en funció del percentatge que representa el creixement del vial amb antibiòtic respecte al vial control. Així, si és inferior al 10%, la soca es considera sensible; superior al 10%, resistent; i entre 5 i 10%, indeterminat o parcialment resistent.

3.7.1.2 Antibiograma als antituberculosos de segona línia

Es realitza en cas de detectar alguna resistència als antituberculosos de primera línia.

Aquest antibiograma no està comercialitzat i cal la seva preparació al laboratori.

Antibiòtics:

capreomycin sulfate	ref :C 4142. Sigma
ethionamide	ref: E 6005. Sigma
kanamycin monosulfate	ref: K 4000. Sigma
amikacina	ref: A 3650. Sigma
clofazimine	ref: C 8895. Sigma
ofloxacina	ref: O 8757. Sigma

❖ Preparació de les solucions mare

Les solucions mare han de tenir una concentració mínima de 1000 µg/ml, és aconsellable però que no siguin menors de 10.000 µg/ml. La solució mare s'ha de preparar 40 vegades més concentrada que la concentració final que utilitzarem.

Taula 17: Fàrmacs de segona línia amb els dissolvents i diluents utilitzats.

fàrmac	dissolvent	diluent
capreomicina	aigua	aigua destil·lada
etionamida	etilenglicol *	aigua destil·lada
kanamicina	aigua	aigua destil·lada
amikacina	aigua	aigua destil·lada
clofazimina	dimetil	dimetilsulfòxid
Rifabutina	metanol	aigua destil·lada
ofloxacina	NaOH 0.1N	aigua destil·lada

*Etilenglicol puríssim .Ref: 1.00949.1000. MERCK

**Dimethyl Sulfoxide. Ref: D-8779 SIGMA

Totes les solucions mare excepte la clofazimina i l'etionamida s'han de filtrar amb filtres *millipore* de 0.22 µm. Un cop preparada s'aliqüota en criotubs, a raó de 25 µl per criotub, de manera que a l'hora de fer l'antibiograma afegint 0.975 ml d'aigua destil·lada i inoculant 0.1 ml al vial de BACTEC 12B obtindrem la concentració final desitjada. Les solucions mares aliqüotades s'han de conservar a -70°C, excepte la clofazimina que es conserva a temperatura ambient en la foscor. En aquestes condicions les podem guardar durant 1 any.

Taula 18: Dil·lucions dels fàrmacs de segona línia.

antituberculós	Concentració final en 4 ml de 12B	concentració en 0.1ml ml	concentració en1 ml	solució mare
capreomicina	1.25 µg/ml	5 µg/ 0.1ml	50 µg/ ml	2 mg/ ml
etionamida	1.25 µg/ml	5 µg/ 0.1ml	50 µg/ / ml	2 mg/ ml
kanamicina	5.0 µg/ml	20 µg/ 0.1ml	20 µg/ / ml	8 mg/ ml
amikacina	1 µg/ml	4 µg/ 0.1ml	40 µg/ ml	1.6 mg/ ml
clofazimina	0.5 µg/ml	2 µg/ 0.1ml	20 µg/ ml	0.8 mg/ ml
ofloxacina	2.0 µg/ml	8 µg/ 0.1ml	80 µg/ ml	3.2 mg/ ml
rifabutina	0.5 µg/ml	2 µg/ 0.1ml	20 µg/ ml	0.8 mg/ ml

Formula pel càlcul de la solució mare:

$$\text{pes (mg)} = \frac{\text{volum (ml)} \times \text{concentració final (\mu\text{g/ml})}}{\text{potència (mcg/ml)}}$$

❖ Procediment

1. Descongelar un criotub de solució mare de cada un dels antibiòtics a estudiar. Afegir 0.975 ml d'aigua destil·lada estèril, excepte en la clofazimina que afegirem DMSO, a cada criotub.
2. Partir d'un Bactec 12B en creixement actiu: IC superior a 500.
3. Establir una atmosfera de CO₂ al 5% en tots els vials, tant en el vial control com en els vials amb antibiòtic.
4. Introduir 0.1 ml de l'antibiòtic al vial de BACTEC 12B.
5. Inocular 0.1 ml del vial inòcul en els vials amb antibiòtic. Diluir al 1/100 (0.1 ml en el vial amb 9.9 ml de DILUTING FLUID). Inocular 0.1 ml en el vial control.

Els vials es llegeixen diàriament, essent possible interpretar els resultats quan l'IC del vial control és ≥ 30 . El temps necessari per arribar-hi ha d'oscil·lar entre 4 i 14 dies. Quan l'augment de l'IC en el vial control és superior a l'observat en els vials amb antibiòtic, la soca es considera sensible.

3.7.1.3 CIM a la Isoniazida

Es realitza en soques resistents a la INH. Partint de *Isonicotinic àcid hydrazide free base* (ref : I 3377. SIGMA) es preparen dil·lucions de 0.05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2, 6,4 i 12,8 $\mu\text{g/ml}$.

Tant el solvent com el diluent és l'aigua destil·lada estèril. Un cop preparada la solució mare caldrà filtrar-la amb filtres *millipore* de 0.22 μm .

Taula 19: Dil·lucions per a l'Isoniazida.

antituberculós	Concentració final en 4 ml	concentració en 0.1 ml	concentració en 1 ml	solució mare
isoniazida	12,8 $\mu\text{g/ml}$	51,2 $\mu\text{g/ml}$	512 $\mu\text{g/ml}$	20,48 mg/ml

Un cop preparada la solució mare l'al·liquotarem en criotubs a raó de 25 µl per criotub, de manera que a l'hora de fer l'antibiograma, afegint 975 µl d'aigua destil·lada obtindrem la concentració de 12,8 µg/ml. Partint d'aquesta concentració farem dil·lucions dobles per a fer la CIM. Posteriorment inocularem 0.1 ml de cada concentració als vials de BACTEC 460TB per obtenir la concentració final desitjada. La solució mare al·liquotada s'ha de conservar a -70°C.

❖ Procediment

1. Descongelar un criotub de solució mare. Afegir 0.975 ml d'aigua destil·lada estèril.
2. Partir d'un Bactec 460TB 12B en creixement actiu: IC superior a 500.
3. Establir una atmosfera de CO₂ al 5% en tots els vials, tant en el vial control com en els vials amb antibiòtic.
4. Introduir 0.1 ml de l'antibiòtic descongelat i diluït al vial de 12B.
5. Inocular 0.1 ml del BACTEC 460TB crescut en els vials amb antibiòtic. Diluir al 1/100 (0.1 ml en el vial amb 9.9 ml de DILUTING FLUID). Inocular 0.1 ml en el vial control.

Els vials es llegeixen diàriament, essent possible interpretar els resultats quan l'IC del vial control és ≥ 30 . El temps necessari per arribar-hi ha d'oscil·lar entre 4 i 14 dies. Quan l'augment de l'IC en el vial control és superior a l'observat en els vials amb antibiòtic, la soca es considera sensible

3.7.2 Estudi de sensibilitat amb el sistema MBaCT/ALERT® S.I.R.E KIT (bioMerieux)

La metodologia a utilitzar és la suggerida per la casa comercial. Amb aquest mètode s'estudien les concentracions crítiques següents :

Isoniazida	0.1 µg/ml
Rifampicina	1 µg/ml
Etambutol	5 µg/ml
Estreptomicina	1 µg/ml
Pirazinamida	100 µg/ml

Per a la preparació de l'inòcul es seguiran les indicacions del fabricant en funció del medi de cultiu de partida. Un cop el tub amb l'inòcul tingui el creixement adequat es procedirà a la realització de l'antibiograma.

❖ **Procediment per a la INH, la RIF, l'ETB i l'STR**

1. Afegir a cada vial 0.5 ml de l'antibiòtic corresponent i 0.5 ml d'aigua destil·lada al vial control.
2. A cada vial introduir 0.5ml de *restoring fluid* que conté elements indispensables per al creixement dels micobacteris.
3. Inocular els vials amb antibiòtic amb 0.5 ml del vial inòcul. Diluir 1/100 la suspensió del vial inòcul amb aigua destil·lada estèril i inocular amb 0.5 ml de la dilució el vial control.
4. Introduir els vials en l'incubador MB Bact/ALERT 3D. El software determinarà la seva positivitat o negativitat.

❖ **Procediment per a la PZA**

1. Preparar tres vials, un amb 0.5 ml de l'antibiòtic i els altres dos amb 0.5 ml d'aigua destil·lada per a fer-los servir de control directe i control diluït..
2. A cada vial introduir 0.5ml de *restoring fluid* i de solució acidificant.
3. Inocular el vials amb antibiòtic i el vial de control directe amb 0.5 ml del vial inòcul. Diluir 1/10 la suspensió del vial inòcul amb aigua destil·lada estèril i inocular amb 0.5 ml de la dilució el vial control diluït.
4. Introduir els vials en l'incubador MB Bact/ALERT 3D. El software determinarà la seva positivitat o negativitat

L'antibiograma finalitzarà quan el control sigui positiu, entre els 2 i 15 dies d'incubació. Una soca es considerarà resistent si el vial amb el fàrmac es senyalitzat com a positiu abans o al mateix temps que el vial control, en el cas de la INH, la RIF, l'ETB i l'STR. En el cas de la PZA, quan els dos controls han estat considerats positius, la soca serà sensible si el creixement en el vial amb antibiòtic requereix més temps que en el vial control i resistent si es considerat positiu abans.

3.7.3 Estudi de sensibilitat amb el sistema BACTEC MGIT 960®

La metodologia a utilitzar és la suggerida per la casa comercial

Amb aquest mètode s'estudien les concentracions crítiques següents :

Isoniazida	0.1 µg/ml
Rifampicina	1 µg/ml
Etambutol	5 µg/ml
Estreptomicona	1 µg/ml

Per a la preparació de l'inòcul es seguiran les indicacions del fabricant. Un cop el tub amb l'inòcul tingui el creixement adequat es procedirà a la realització de l'antibiograma.

❖ **Procediment:**

1. Afegir a cada vial 0.8 ml de suplement BACTEC MGIT 960 SIRE.
2. Afegir l'antibiòtic als tubs corresponents.
3. Diluir la suspensió del vial preparat com inòcul a 1:100 i amb la dil.lució inocular amb 0.5 ml el vial control i el vials amb l'antibiòtic.
4. Incubar els vials l'aparell BACTEC MGIT 960.

L'aparell BACTEC MGIT 960 controlarà el conjunt de vials fins que s'obtingui la determinació de sensibilitat o resistència. Un cop complerta l'anàlisi els resultats seran informats per l'aparell.

3.8 Detecció dels mecanismes genètics associats a la resistència de la isoniacida, rifampicina, estreptomina i pirazinamida en soques previamente aïllades en cultiu (79, 108, 202)

La detecció de les mutacions responsables de conferir resistència a un o l'altre fàrmac es basa en l'amplificació d'una o varies regions del gen o gens implicats, amb uns iniciadors i condicions de PCR específiques. Les dades de la seqüenciació són generades a un instrument automatitzat, que mitjançant softwares específics són editades i comparades amb la seqüència del gen de la soca salvatge.

S'ha analitzat per a cada antibiòtic les regions següents: :

INH: el codó 315 del gen *katG* i la regió reguladora de l'operó *mabA-inhA*

RIF: 165pb d'una regió del gen *rpoB*.

STR: el gen *rpsL* sencer (375pb) i el fragment 530 *loop* del gen *rrs* (238 pb)

PZA : el gen *pncA* (560 pb)

Taula 20. Iniciadors utilitzats en l'amplificació de les diverses regions gèniques involucrades en la resistència a la INH, la RIF, l'STR i la PZA en soques de *M. tuberculosis*.

Regió Gènica	Iniciadors	seqüència
<i>katG</i>	F	5'-GGAAACTGT TGTCCCATTTTCG-3'
	R	5'-GGGCTGGAAG AGCTCGTATG-3'
<i>mabA-inhA</i>	TB92	5'- CCTCGCTGCCCAGAAAGGGA- 3'
	TB93	5'-ATCCCCCGTTTTCTCCGGT- 3'
<i>rpoB</i>	RPO1	5'-ACCGCAGACGTTGATCAACAT-3'
	RPO2	5'-GGCAGCTCACGTGACAG-3'
<i>rpsL</i>	ML51	5'-CCCACCATTGACGAGCTGGT-3'
	ML52	5'-GTCGAGCGAACCGCGAATGA-3'
<i>rrs loop 530</i>	Tb53	5'-GATGACGGCCTTCGGGTTGT-3'
	TB54	5'-TCTAGTCTGCCCGTATCGCC-3'
<i>pncA</i>	P1	5'-GCTGGTCATGTTCCGGATCG-3'
	P6	5'-GCTTGCGGCGAGCGCTCCA-3'

❖ Obtenció del DNA.

Es fa una suspensió de bacteris 0,5 *McFarland* en 400 µl de TE buffer amb 100µl de boles de vidre estèril, s'inactiven els micobacteris al bany 95°C durant 30 min. Després de centrifugar 10 minuts a 13.000 rpm el sobrenadant es manté a -20°C fins a l'amplificació.

❖ PCR i seqüenciació

Es segueixen els protocols descrits per M. Espasa i cols. per a la INH i la RIF, el descrit per Honoré i cols. per a la STR i el descrit per Scorpio i cols. per a la PZA.. Les seqüències obtingudes per a cadascun dels gens han estat comparades amb les seqüències salvatges de *M. tuberculosis* obtingudes del Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) (taula 21).

Taula 21: Seqüències salvatges de *M. tuberculosis* amb les que es comparen les seqüències obtingudes en cada cas.

Regió gènica	Seqüència salvatge
<i>katG</i>	G1581367
<i>mabA-inhA</i>	U66801
<i>rpoB</i>	L27989
<i>rpsL</i>	L08011
<i>rrs loop 530</i>	X52917
<i>pncA</i>	U59967

3.9 Tipificació molecular del complex *M. tuberculosis* mitjançant la tècnica de l'oligonucleòtid separador (*Spoligotyping*) (39)

Es basa en la detecció de la presència o absència de seqüències separadores conegudes de 34 a 41 pb, entre les múltiples còpies de les seqüències curtes DR (Direct Repeat) que estan organitzades en un locus cromosòmic únic del complex *M. tuberculosis*. El DNA extret del bacteri és amplificat mitjançant PCR, els amplicons obtinguts s'hibriden sobre una membrana on hi ha fixats 43 oligonucleòtids diferents. Trenta set corresponents a les seqüències separadores de la soca patró *M. tuberculosis* H37Rv i 6 a *M. bovis*-BCG. Els productes d'hibridació es detecten mitjançant quimioluminescència.

❖ Obtenció de del DNA.

Cal només cal una petita quantitat de DNA. La PCR es pot realitzar a partir de mostres clíniques, cèl·lules lisades i de DNA cromosòmic purificat.

Iniciadors

- ◆ DRa: 5' GGT TTT GGG TCT GAC GAC 3' (biotinilat a l'extrem 5', guardar a 4°C; repetides descongelacions donen lloc a patrons molt dèbils)
- ◆ DRb: 5' CCG AGA GGG GAC GGA AAC 3' (guardar aliquidat a -20°C).

❖ Preparació de les mostres

Diluir les mostres de DNA a 10 ng/µl.

Control positiu: *M. Tuberculosis* H37rv i *M. bovis*-BCG

Control negatiu: aigua

Barreja de la reacció:

Reactiu	Volum
Iniciador DRa (20 pmol)	4µl
Iniciador DRb (20 pmol)	4µl
DNTPs [Roche] (2,5mM cadascun, concentració final 0.2 mM cada dNTP)	4µl
Tampó 10X + MgCl ₂ (25 mM)	5µl
Taq Expand [Roche]	0.5µl
Aigua	30.5µl
48 µl de la mescla per tub + 2µl DNA (diluït a 10 ng/µl)	

Termociclador:

3 min 96°C		5 min 72°C
1 min 96°C	} 30 cicles	∞ 4°C
1 min 55°C		
30 seg. 72°C		

Quan no es treballa amb DNA purificat es pot disminuir la concentració de DNA i augmentar el nombre de cicles .

Electroforesi: comprovar els resultats de la PCR carregant 5 µl en un gel al 0.8% d'agarosa, la visualització del DNA es fa amb llum UV mitjançant la tinció prèvia del DNA amb bromur d'etidi.

❖ **Hibridació i detecció**

Procediment:

- Preparar el tampons (escalfar abans d'utilitzar)
 - 300 ml 2xSSPE/0.1% SDS a 60°C
 - 500 ml 2xSSPE/0.5% a 60°C
 - 500 ml 2xSSPE/0.5% temperatura ambient
 - 500 ml 2xSSPE temperatura ambient.
- Retolar 43 tubs i afegir a cadascun 150µl de 2xSSPE/0.1% SDS.
- Afegir a cada tub 20µl dels productes de PCR (a la posició 43 posar-hi un control). Desnaturalitzar els productes de PCR diluïts durant 10 min a 100°C. Col·locar ràpidament en gel, almenys 5 min.
- Rentar el filtre durant 5' a 60°C amb 2xSSPE/SDS 0.1% (al forn d'hibridació).
- Col·locar la membrana i un *supportcushion* en el *miniblotter*, els *slots* han de quedar perpendiculars a les línies dels oligonucleòtids aplicats.
- Aspirar per buit amb una punta de pipeta el contingut dels canals.
- Carregar els *slots* del *miniblotter* amb 150 µl dels productes de PCR diluïts i hibridar durant 1h a 60°C en una superfície horitzontal sense agitació.
- Buidar els slots per aspiració.

9. Treure el filtre del miniblotter.
10. Rentar el filtre dues vegades amb 2xSSPE/0.5% SDS durant 10 min a 60°C.
11. Refredar la membrana per conservar l'activitat de la peroxidasa.
12. Incubar la membrana amb el conjugat streptavidina-peroxidasa: 5µl del conjugat streptavidina-peroxidasa (500U/ml) en 20 ml de 2xSSPE/0.5% SDS durant 10 min a 42°C.
13. Retirar l'excés de reactiu
14. Detecció quimioluminescent. Barrejar 10 ml del reactiu 1 de *ECL deteccion liquid* (Amersham) amb 10 ml del reactiu 2 de *ECL deteccion liquid*. Banyar el filtre durant 1 min.
15. Col·locar el filtre dins una casset. Damunt col·locar-hi una transparència i damunt d'ella una pel·lícula fotogràfica (*Hyperfilm*, Amersham)
16. Exposar durant 20 min.
17. Revelar la pel·lícula (revelar, fixar i rentar amb aigua) i, en funció del resultat, col·locar una nova pel·lícula.

❖ **Deshibridació del filtre**

1. Rentar la membrana dues vegades amb 1% de SDS a 80°C durant 30 min al forn d'hibridació.
2. Eliminar el SDS i rentar la membrana en 20 mM EDTA pH 8, durant 15 min a temperatura ambient i en agitació.
3. Escòrrer i guardar la membrana humitejada en EDTA. Cal embolicar-la en film transparent i col·locar-la en una bossa hermètica. Guardar a la nevera ben protegida (evitar la dessecació).

❖ **Interpretació dels resultats**

H37rv (control positiu) : li manquen els espaiadors 20–21 i 33–36.

M. bovis: li manquen els separadors 39–43.

M. africanum: li manquen els espaiadors 8,9 i 39.

Soques *Beijing* : hi manquen els espaiadors 1–34, i almenys 3 dels 9 del 35 al 43 (123).

3.10 Conservació de les soques

❖ **Protocol:**

1. Creixement de la soca en medi Löwenstein-Jensen a 37°C.
2. Afegir dins al tub, 2 ml de medi TSB (*Trypton Soya Broth* + 20% glicerol).
3. Resuspendre les cèl·lules del cultiu en el TSB mitjançant una nansa.
4. Repartir la solució en dos criotubs (utilitzar tubs de 2 ml).
5. Col·locar els tubs en un *freezing container* [Nalgene, ref 5100-0001] i tota la nit a -70°C. Permet baixar la temperatura de forma progressiva (1°C / min).
6. Conservar els tubs en dos congeladors separats a -70°C.

4. Resultats i discussió



En el següent recull de dades s'estudien diferents períodes en funció del paràmetre avaluat, l'estudi retrospectiu limita les avaluacions al conjunt de dades acumulades de que es disposa. El període varia en funció de la data de posada en marxa al laboratori del paràmetre avaluat o del moment en que es van començar la recollida de dades acurades. S'ha avaluat el màxim possible de dades disponibles en cadascun dels paràmetres.

4.1 Mostres per malalt (estudis seriat)

Tal com es descriu en el apartat 1.2.1, un correcte estudi per a la detecció de micobacteris requereix la tramesa al laboratori de mostres seriades, sempre que la localització anatòmica ho permeti. L'estàndard recomana l'obtenció de tres mostres per localització, recollides adequadament i en tres dies consecutius. És important sobretot en el cas d'avaluar l'aïllament dels micobacteris no tuberculosos (MNT), especialment en mostres del tracte respiratori, ja que els criteris establerts per a la diferenciació entre colonització i infecció inclouen l'aïllament reiterat del micobacteri no tuberculós en la mateixa localització (16).

No seria útil analitzar la idoneïtat de la tramesa en totes les mostres rebudes, ja que en molts dels casos quan el metge responsable del pacient rep el resultat negatiu de la primera mostra ja disposa d'un diagnòstic alternatiu i no remet altres mostres per a la realització de l'estudi complet. Així doncs, s'ha fet l'anàlisi de la tramesa de mostres seriades únicament en els cultius positius, incloent també les mostres bacil·loscòpia positiva cultiu negatiu (taula 22).

Els resultats posen de manifest que poques vegades s'aconsegueix l'estudi seriat de tres mostres tal com està recomanat. En el nostre hospital convé insistir en la conveniència de recollir tres mostres sempre que sigui possible.

Taula 22: mostres positives per pacient i localització anatòmica.

	Nº mostres	Nº malalts	nº mostres per pacient
Respiratòries			
esput	1889	1184	1,59
broncoaspirat	322	312	1,03
rentada broncoalveolar	80	75	1,06
aspirat gàstric	36	26	1,4
biòpsia bronquial	15	15	1
altres mostres	31	25	1,24
Extrarespiratòries			
adenopatia	100	90	1,11
orina	139	115	1,20
femta	55	40	1,37
biòpsia pleura	19	18	1,06
líquid pleural	75	65	1,15
mostres osteo-articulars	51	28	1,82
biòpsia de pell	35	33	1,06
LCR	9	8	1,12
biòpsies intestinal i líquid ascític	33	28	1,17
pericardi	7	4	1,75
biòpsies genitals	7	7	1
exsudats sense especificar	35	30	1,17
sang	162	97	1,67
moll de l'os	26	24	1,08

4.2 Espècies aïllades. Identificació

Es disposa de les dades de les espècies aïllades durant un període de 20 anys, de 1987 a 2007. Amb un total de 6637 cultius positius per micobacteris. De les quals 4314 (65%) pertanyen al complex *M. tuberculosis* i 2323 (35%) han estat MNT.

Micobacteris no tuberculosos.

Les espècies de MNT aïllades amb més freqüència han estat *M. xenopi* amb (10,21% del total; 29,18% de MNT), *M. avium* complex (7,80% del total; 22,29% de MNT), *M. gordonae* (7,45% del total; 21,30% de MNT), i *M. kansasii* (5,98% del total, 17,08% de MNT). Aquest grup d'espècies suposa el 87,6% dels aïllaments de MNT. El 12,4 % restant està format principalment per espècies de *M. fortuitum* complex (2,41% del total; 6,88% de MNT), essent les més freqüents *M. fortuitum* (1,20% del total; 3,44% de MNT) i *M. chelonae* (0,67% del total; 1,94% de MNT). La resta, la formen una miscel·lània d'espècies que estan reflectides en la taula 23.

Resultats i discussió

Taula 23: Nombre d'aïllaments de les diferents espècies de micobacteris per any (el nombre representa els aïllaments, entre parèntesi el nombre de pacients).

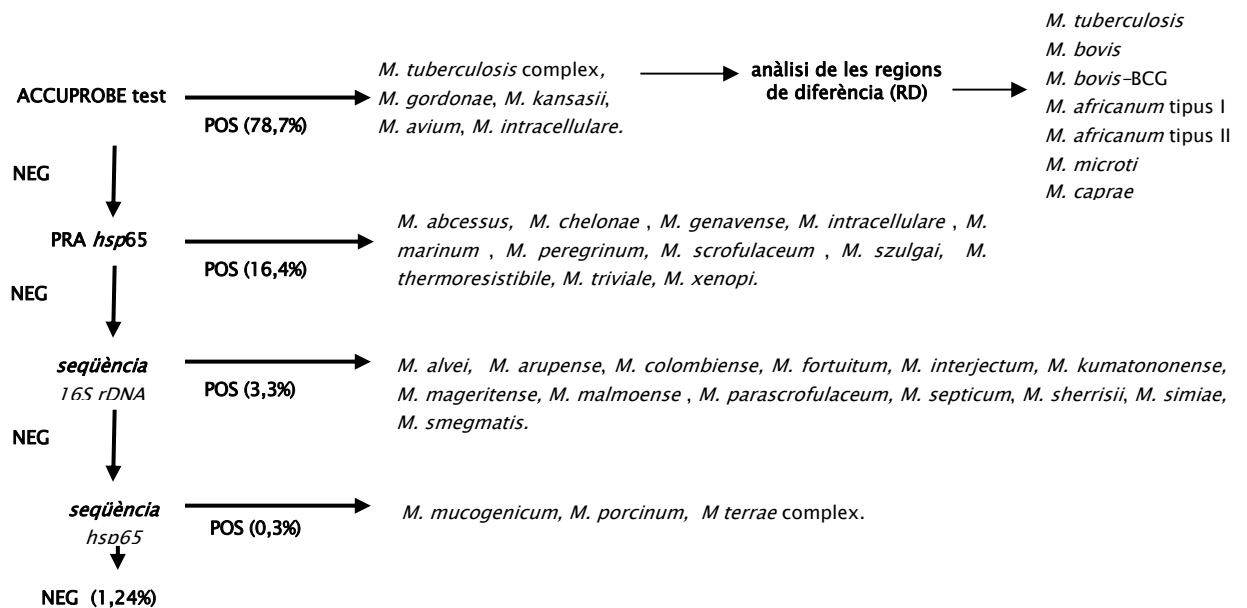
ESPÈCIE	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
<i>M. tuberculosis</i>	335 (181)	348 (178)	323 (165)	246 (135)	314 (134)	305 (160)	342 (138)	243 (122)	185 (75)	171 (85)	166 (97)	177 (91)	140 (80)	172 (91)	122 (69)	127 (65)	98 (63)	117 (62)	113 (60)	122 (69)	118 (55)
<i>M. bovis</i>										19 (6)	1		1	1	1	1				1	
<i>M. bovis</i> - BCG															1			1			
MAC	6 (4)	8 (7)	14 (6)	15 (6)	48 (24)	40 (25)	68 (17)	66 (25)	127(56)												
<i>M. intracellulare</i>										14 (3)	2 (2)	2 (1)	5 (4)	4 (3)	1	2 (1)	6 (2)	4 (3)	1	2(2)	12 (2)
<i>M. avium</i>										21 (9)	1 (3)	5 (3)	4 (2)	6 (4)	2 (1)	10 (10)	7 (3)	8 (4)	2 (2)	3 (3)	4 (1)
<i>M. kansasii</i>	18 (12)	10 (8)	25 (10)	14 (9)	14 (14)	43 (25)	29 (13)	32 (14)	32 (14)	24 (11)	32 (17)	30 (15)	28 (13)	11 (11)	18 (8)	17 (11)	4 (3)	11 (8)	1	1	11 (4)
<i>M. xenopi</i>	68 (43)	17 (11)	20 (15)	12 (8)	30 (30)	38 (35)	47 (40)	28 (26)	53 (42)	74 (49)	36 (26)	34 (23)	39 (28)	36 (30)	27 (25)	36 (30)	32 (28)	6 (5)	13 (10)	21 (13)	11 (10)
<i>M. goodii</i>	69	47 (39)	31 (30)	11 (11)	87 (75)	64 (64)	12 (12)	29 (29)	39 (35)	9 (9)	6 (6)	22 (19)	10 (9)	6 (6)	4 (4)	5 (5)	6 (6)	8 (7)	14 (14)	8 (8)	8 (7)
<i>M. arupense</i>																	2 (2)				
<i>M. africanum</i>																				1	
<i>M. abscessus</i>														1	1				1	3 (1)	
<i>M. alvei</i>																			1		
<i>M. chelonae</i>		1	3 (3)	6 (4)	3 (2)	1	2 (2)	1	3 (2)	1	1	2 (2)			1	1	3 (3)	6 (2)	4 (4)	4 (2)	3 (3)
<i>M. colombiense</i>																				2 (2)	
<i>M. cl pigmentada</i>	3			1																	1
<i>M. cr no pigmentada</i>	3 (3)						14 (12)	10 (10)	3 (2)	7 (7)	1	2 (2)	1		1						1
<i>M. cr pigmentada</i>				1	1				7 (6)	2 (2)	1			3 (3)			2 (2)				
<i>M. fortuitum</i>	11 (10)	6 (6)	8 (8)	1	13 (13)	6 (6)		3 (3)	4 (4)		5 (2)	4 (4)		4 (4)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	3 (3)	2 (1)	2 (2)	2 (2)
<i>M. fortuitum 3rd biov.</i>																					2 (2)
<i>M. fortuitum complex</i>									4 (4)		1										
<i>M. genavense</i>									4 (2)	2 (2)					6 (3)	1		3 (1)		1	1
<i>M. interjectum</i>																					1
<i>M. kumamotoense</i>																		1			
<i>M. mageritense</i>																			1		
<i>M. malmoense</i>												3 (3)	3	2 (2)							
<i>M. marinum</i>		3 (3)		1	2 (1)	2 (2)		2 (2)		4 (4)	4 (3)	1	2 (2)	1	2 (2)	2 (2)		2 (2)	1		
<i>M. mucogenicum</i>												2 (2)	1			1					
<i>M. parascrofulaceum</i>																5 (5)		4(3)	5 (1)		
<i>M. peregrinum</i>								2(2)	3 (3)	1	4 (4)	2 (2)	1			1		1	2 (1)		
<i>M. porcinum</i>																	1				
<i>M. septicum</i>																			1		1
<i>M. sherrisii</i>																				1	
<i>M. scrofulaceum</i>	2 (2)	2 (2)	1			1				3 (1)		4 (2)				1					
<i>M. simiae</i>	2 (2)		2 (2)		1	1	3 (2)	3 (1)	2(2)	5 (3)	1				3 (3)		4 (3)				
<i>M. smegmatis</i>						1								1							
<i>M. szulgai</i>						1															
<i>M. terrae complex</i>		1										3 (1)		2 (2)		1				1	
<i>M. triviale</i>																		1 (1)			2 (1)
<i>Mycobacterium sp.</i>		5	1	1	2	2	1	2			3 (3)			1						1	1

Per a la identificació de les diferents espècies s'han utilitzat diverses tècniques al llarg dels anys, utilitzant tècniques bioquímiques convencionals, cromatografia en capa fina i de gasos. Des de 1995 s'utilitzen les tècniques de biologia molecular, contribuint a l'estalvi en temps i permetent la identificació més acurada de les diferents espècies. Seguint l'algoritme de treball del laboratori (apartat 3.6), inicialment es procedeix a l'observació microscòpica dels cultius positius, i a la hibridació amb sondes AccuProbe®, posteriorment es subcultiven en Löwenstein-Jensen per a la definició de la velocitat de creixement, temperatura òptima i producció de pigment i en funció d'aquests s'orienta cap a la utilització d'una o altra tècnica per a la identificació molecular, ja sigui l'anàlisi del polimorfisme dels fragments de restricció, la seqüenciació del gen que codifica per a 16SrRNA o del *hsp65*, o bé l'anàlisi de les regions de diferenciació RD1, RD9, RD10, RD11.

En la figura 33 es recullen les diferents tècniques de biologia molecular amb la seqüència en que s'utilitzen actualment al laboratori per la identificació dels diferents micobacteris.

No ha estat objecte de la present memòria establir una relació causal entre aïllament i malaltia.

Figura 33: Algoritme de les diferents tècniques per a la identificació de micobacteris actualment en ús al laboratori de micobacteris de l'HSCiSP. Entre parèntesi el percentatge d'aïllaments identificats amb cadascuna de les tècniques.



Tal com s'ha descrit àmpliament a la literatura (16, 38, 147) l'augment d'aïllaments de MNT es va accelerar d'ençà dels primers informes de pacients amb la SIDA a partir de 1982 als EEUU i uns anys després a Europa. També hi va contribuir la universalització de la quimioteràpia, les terapèutiques amb corticoides i l'ús de fàrmacs immunosupressors, que feu que augmentés el nombre de pacients susceptibles a les infeccions per microorganismes oportunistes (74). Al nostre hospital s'ha detectat una relació directa amb les infeccions per l'HIV, ja que la major incidència coincideix amb la fase més alta de l'epidèmia de la SIDA a la nostra ciutat, alhora que el descens coincideix amb la implementació del tractament antirretroviral d'alta eficàcia a partir dels anys 1996–1997 (*highly active antiretroviral therapy* (HAART))(figura 34).

Aquesta relació és evident en els aïllaments en les espècies pertanyents al complex *M. avium*, observant com a partir de la implementació de la HAART la incidència disminueix dràsticament. A Europa, en un recull de dades de 21 països durant 12 anys, la freqüència d'aïllaments d'espècies de MNT oscil·la en funció de l'àrea geogràfica i al llarg dels anys, amb l'aparició de noves espècies. El canvi més evident s'ha observat en els aïllaments de *M. xenopi* (16, 147).

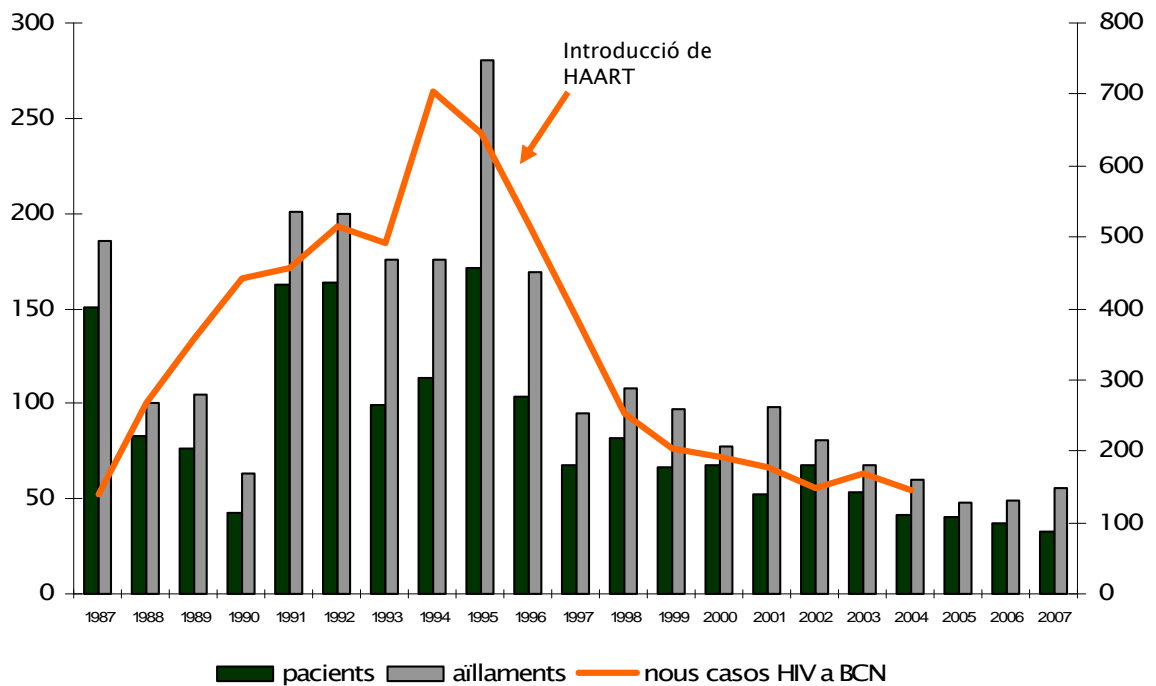
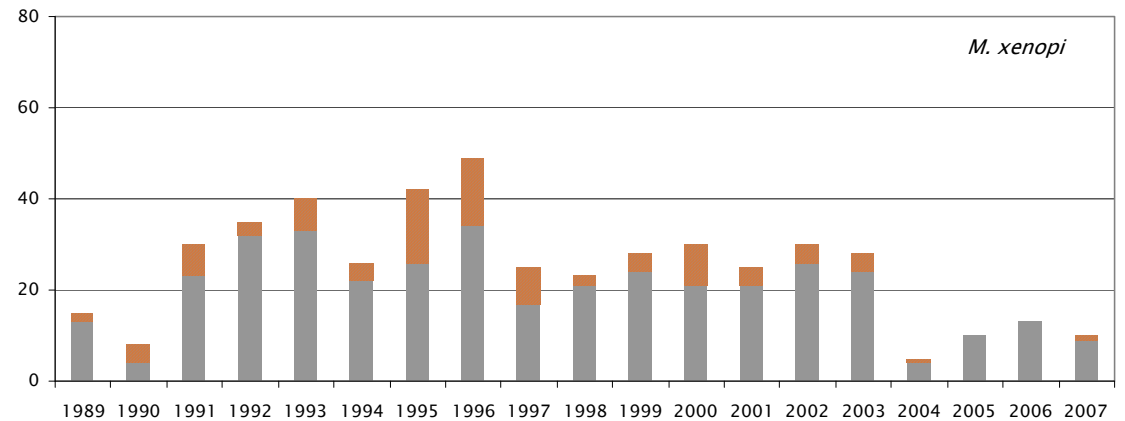
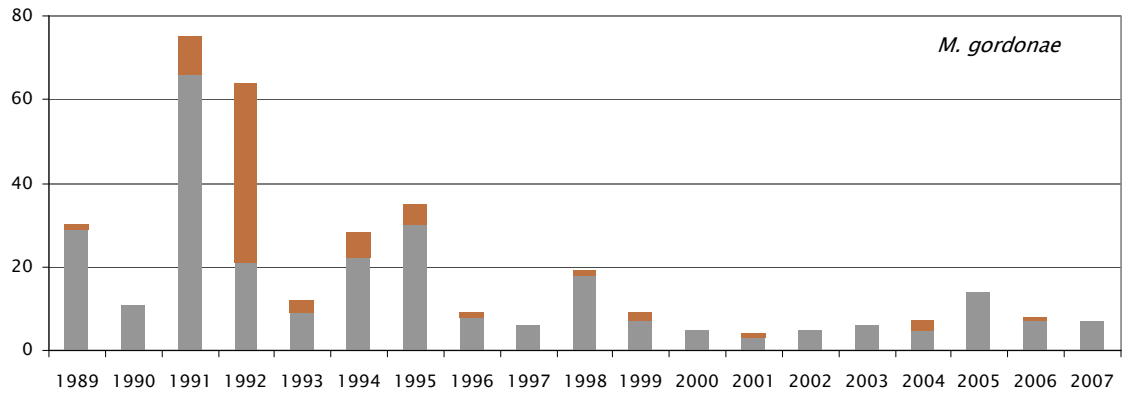
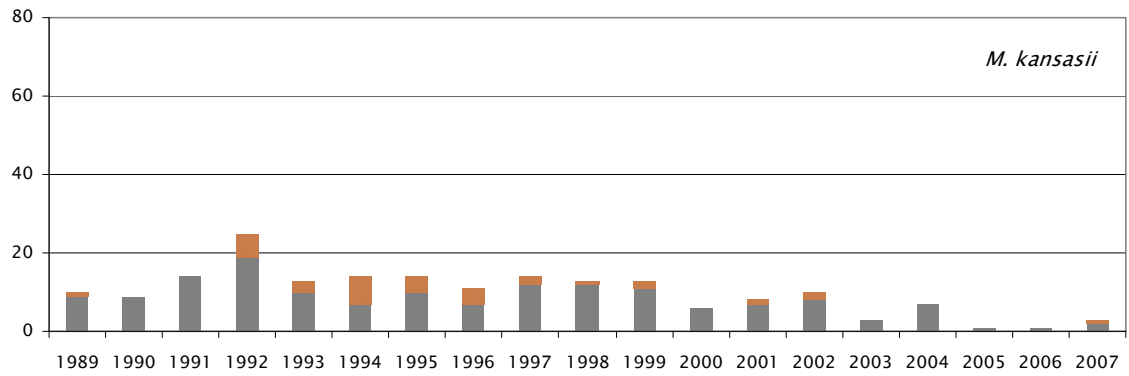
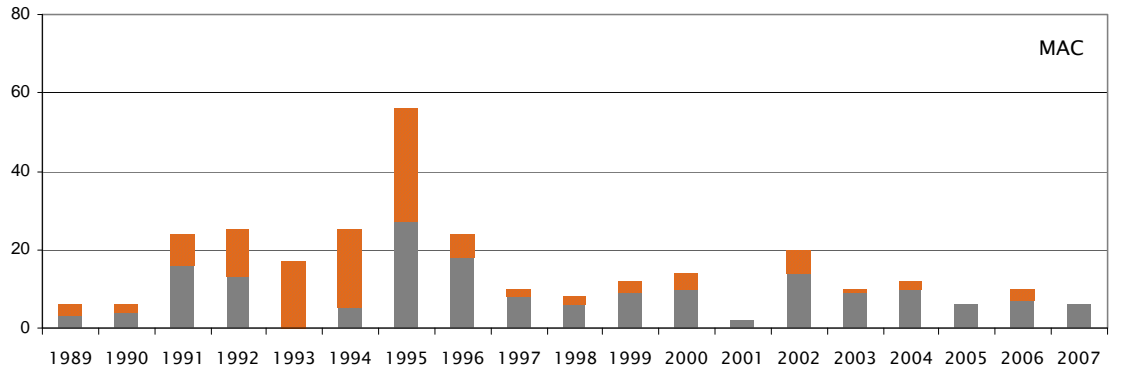


Fig 34: Aïllaments de MNT 1987–2007 al l'HSCiSP relacionat amb les infeccions per l'HIV a la ciutat de Barcelona en el mateix període.

Fig 35: aïllaments de les espècies més freqüents durant el període 1989-2007.



A la figura 35 es representen els aïllaments de les espècies més freqüents durant el període 1989–2007. *M. xenopi* ha estat la més aïllada, coincidint amb que s'ha observat en el recull de Martín-Casabona i cols. (147), on es posa de manifest la clara distribució geogràfica d'aquesta espècie pràcticament desconeguda als EEUU i al nord d'Europa i amb una alta prevalença al sud i oest d'Europa. Els aïllaments de *M. xenopi* es relacionen amb la xarxa de distribució, acumuladors i escalfadors d'aigua en àrees urbanes i la seva termoresistència fa que sigui difícil d'eliminar. S'han relacionat també els aïllaments de *M. xenopi* amb la introducció de nous sistemes de cultiu que afavoreixen els aïllaments de micobacteris exigents i que requereixen condicions ambientals específiques (74). En el nostre laboratori el nombre d'aïllaments de *M. xenopi* ha anat disminuint al llarg dels anys. Per una banda aquesta disminució coincideix amb la introducció al laboratori del sistema de cultiu i aïllament MB/Bact ALERT, sistema amb el qual en cas de voler incubar els vials a 42°C, temperatura òptima de creixement per *M. xenopi*, cal canviar la temperatura de tot un armari d'incubació amb capacitat per a 120 o 240 vials. D'altra banda s'ha relacionat la disminució de la incidència de *M. xenopi* amb la implementació de la profilaxi i/o tractament per a *M. avium* complex, que també és actiu en front *M. xenopi* (74).

Els aïllaments de *M. kansasii* mostren una distribució geogràfica força relacionada amb les zones mineres, i en les àrees urbanes i industrials per la seva presència en les conduccions de la xarxa de distribució d'aigua (30, 98, 147, 196). Tot i que *M. kansasii* sol ser responsable de malaltia en pacients immunocompetents amb factors de risc locals (malalties pulmonars cròniques, tuberculosi prèvia, consum de tabac i alcohol) la incidència de la infecció va augmentar, tal com va passar amb *M. avium* complex, amb la pandèmia de SIDA. Així doncs, la nostra casuística està relacionada amb el compromís immunocompetent de la nostra població, observant una disminució de la incidència paral·lela a la introducció de les HAART (195). A l'Estat Espanyol s'observa una clara variabilitat geogràfica, la incidència més elevada ha estat

a La Rioja, Andalusia, Astúries i Catalunya, tot i que és inferior al que s'observa en zones d'Europa on *M. kansasii* és endèmic (131, 145, 196).

M. gordonae es considera un dels principals contaminants de les mostres, ja sigui en el moment de l'obtenció de la mostra, com al laboratori. Després d'observar l'alta incidència d'aïllaments de *M. gordonae*, l'any 1992 es van introduir modificacions en la metodologia. Esterilitzant tot el material, un cop net i assecat, així com l'aliqüotació de tot els reactius per tal de no haver de compartir-los entre mostres, i així, minimitzar les possibles contaminacions creuades. Aquestes modificacions sembla que van actuar eficaçment, al disminuir de forma significativa el nombre d'aïllaments d'aquesta espècie.

4.3 Distribució de les diferents espècies aïllades per localització anatòmica

S'han analitzat les dades de les mostres que han arribat al laboratori de Microbiologia de l'HSCiSP per a l'estudi de micobacteris durant dotze anys (1995–2007). Durant aquest període s'han rebut 51.104 mostres (3838 cultius de sang i moll de l'ós) de les quals 3078 (6 %) han presentat cultiu positiu per a micobacteris.

Taula 24: Nombre de mostres i malalts per espècie aïllada i localització anatòmica.

	Nºmostres	Nº malalts		Nºmostres	Nº malalts
PULMONAR					
<i>M. avium</i>	34	24	<i>M. parascrofulaceum</i>	5	1
MAC	30	14	<i>M. scrofulaceum</i>	5	3
<i>M. bovis</i>	9	7	<i>M. simiae</i>	13	13
<i>M. fortuitum</i> complex	63	60	<i>M. szulgai</i>	5	2
<i>M. genavense</i>	2	1	<i>M. terrae</i> complex	6	5
<i>M. gordonae</i>	130	123	<i>M. tuberculosis</i>	1374	770
<i>M. intracellulare</i>	61	25	<i>M. xenopi</i>	378	279
<i>M. kansasii</i>	213	175	Altres MNT*	30	30
LIMFÀTICA					
<i>M. avium</i>	4	4	<i>M. intracellulare</i>	2	2
MAC	1	1	<i>M. marinum</i>	1	1
<i>M. genavense</i>	3	3	<i>M. tuberculosis</i>	85	75
<i>M. gordonae</i>	1	1	Altres MNT*	3	2

Resultats i discussió

	Nºmostres	Nº malalts		Nºmostres	Nº malalts
OSTEOARTICULAR					
MAC	1	1	<i>M. tuberculosis</i>	38	26
<i>M. bovis</i>	4	2	<i>M. xenopi</i>	2	1
<i>M. fortuitum</i>	6	1			
CUTÀNIA					
<i>M. abscessus</i>	1	1	<i>M. marinum</i>	17	17
<i>M. bovis</i>	1	1	<i>M. tuberculosis</i>	4	4
<i>M. chelonae</i>	9	5	<i>M. simiae</i>	1	1
<i>M. fortuitum</i>	1	1	<i>M. xenopi</i>	1	1
<i>M. kansasii</i>	1	1	<i>Mycobacterium sp.</i>	1	1
PLEURAL					
MAC	2	2	<i>M. gordonae</i>	1	1
<i>M. africanum</i>	1	1	<i>M. tuberculosis</i>	87	58
<i>M. fortuitum</i> complex	2	2	<i>M. xenopi</i>	1	1
PERICÀRDICA					
<i>M. tuberculosis</i>	7	4			
MENÍNGEA					
<i>M. tuberculosis</i>	9	8			
RENAL					
<i>M. alvei</i>	1	1	<i>M. genavense</i>	1	1
<i>M. avium</i>	2	2	<i>M. gordonae</i>	7	7
MAC	4	4	<i>M. peregrinum</i>	2	2
<i>M. bovis-BCG</i>	4	4	<i>M. tuberculosis</i>	97	78
<i>M. fortuitum</i>	3	3	<i>M. xenopi</i>	24	24
			Altres MNT*	1	1
GASTROINTESTINAL					
MAC	3	2	<i>M. fortuitum</i> complex	4	4
<i>M. bovis-BCG</i>	1	1	<i>M. gordonae</i>	1	1
MCR no pigmentats	1	1	<i>M. tuberculosis</i>	24	17
AÏLLAMENTS EN FEMTA					
<i>M. avium</i>	9	3	<i>M. tuberculosis</i>	32	27
MAC	10	7			
<i>M. kansasii</i>	2	2	<i>M. xenopi</i>	3	2
SANG					
<i>M. avium</i>	16	10	<i>M. kansasii</i>	9	6
MAC	68	37	<i>M. scrofulaceum</i>	1	1
<i>M. bovis</i>	9	3	<i>M. tuberculosis</i>	40	29
<i>M. chelonae</i>	2	2	<i>M. xenopi</i>	5	3
<i>M. genavense</i>	8	7	Altres MNT*	1	1
<i>M. intracellulare</i>	2	1			
MOLL D'OS					
<i>M. avium</i>	3	3	<i>M. kansasii</i>	1	1
MAC	7	7	<i>M. tuberculosis</i>	9	9
<i>M. bovis</i>	1	1	<i>M. xenopi</i>	3	1
<i>M. genavense</i>	1	1			

Del total de pacients amb cultius positius, 140 han patit micobacteriosi disseminada, 82 per *M. tuberculosis* complex (apartat 4.4), 48 per *M. avium* complex (32 MAC, 6 *M. avium* i 2 *M. intracellulare*, fins a finals de l'any 1995 no es va disposar de la sonda Accuprobe de *M. avium* i *M. intracellulare*), 7 per *M. xenopi*, 6 per *M. genavense*, en un cas per a *M. scrofulaceum* i dues infeccions disseminades mixtes, una per *M. kansasii* i *M. avium* i l'altra per *M. kansasii* i *M. tuberculosis*. En un pacient s'ha aïllat *M. marinum* en mostres cutànies i limfàtiques.

4.4 *M. tuberculosis* complex. Període 1995–2007

El nombre de casos de tuberculosi des de 1995 al 2007 a l'HSCiSP ha anat en declivi, amb una corba descendent de forma progressiva, tot i presentar un pic l'any 2006, relacionat probablement amb el que es va observar al conjunt de la ciutat de Barcelona el 2005 (15) (figura 36).

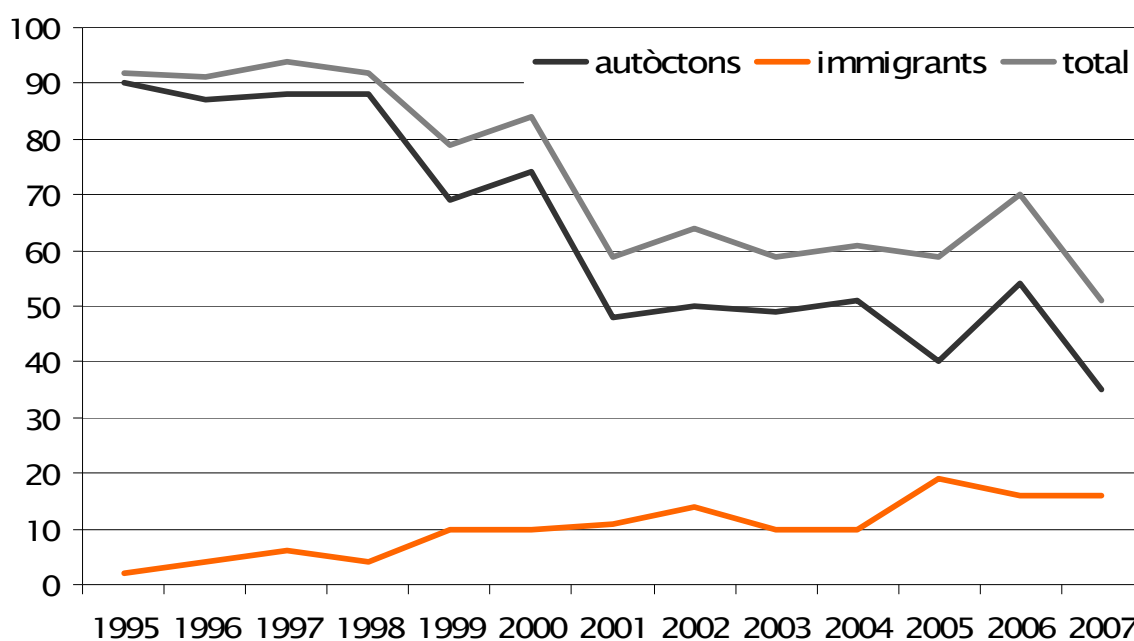


Fig 36: Nombre total i per pacients autòctons i immigrants de casos de tuberculosi des de 1995 al 2007 a l'HSCiSP.

La disminució del nombre de pacients tuberculosos ha estat del 43,47%, valor similar al que s'ha observat en el conjunt de l'Estat Espanyol i un 10% per sota del que s'ha obtingut a Catalunya (20).

Les característiques dels pacients amb tuberculosi en el nostre hospital han anat canviant, s'observa una irregular distribució del nombre de pacients coinfectats pel HIV, amb una tendència general a la disminució, sobre tot en la segona meitat del període estudiat. S'ha detectat un augment progressiu de pacients estrangers, producte del flux migratori de persones infectades provinents de països en vies de desenvolupament i amb alta prevalença de tuberculosi. El percentatge de malalts

tuberculosos d'origen estranger ha anat del 2,17 % l'any 1995 fins el 30,77% el 2007 amb un pic l'any 2005 del 32,20 % (taula 25), percentatges molt semblants al conjunt de la ciutat de Barcelona (15, 20).

Taula 25: Distribució anual dels pacients amb tuberculosi per sexe i origen.

any	Nº pacients	Dones	Homes	Autòctons N (% HIV pos)	Immigrants N (%HIV pos)	% immigrants
1995	92	30	62	90 (14,44)	2	2,17 %
1996	91	23	68	86 (16,27)	5	5,49 %
1997	95	40	55	89 (14,60)	6	6,32 %
1998	93	42	51	89 (14,60)	4 (50)	4,30 %
1999	79	36	43	69 (20,28)	10 (10)	12,66 %
2000	84	31	53	74 (13,51)	10 (10)	11,90 %
2001	59	20	39	48 (16,6)	11 (9,09)	18,64 %
2002	64	21	43	50 (20)	14 (21,42)	21,88 %
2003	59	26	33	49 (8,16)	10 (10)	16,95 %
2004	61	24	37	51 (9,80)	10	16,39 %
2005	59	18	41	40 (15)	19 (15,78)	32,20 %
2006	70	33	37	54 (11,11)	16 (6,25)	22,86 %
2007	52	19	33	36 (5,55)	16	30,77 %

Dels 958 pacients, 595 (62,10%) han estat homes, dels quals el 16,97 % presentaven coinfecció amb HIV i 363 (37,9%) dones de les quals el 4,95% estaven coinfectades per l'HIV. Ambdós gèneres presenten una evolució semblant al llarg dels 12 anys (figures 37 i 38).

Figura 37; Evolució dels casos de tuberculosi diagnosticats al laboratori de l'HPSCiSP en dones immigrants i autòctones en el període 1995-2007.

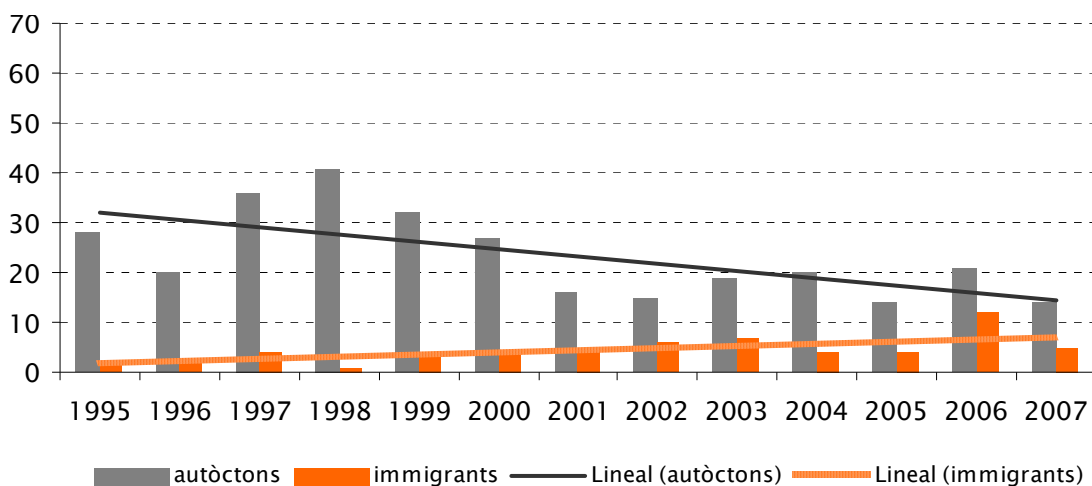
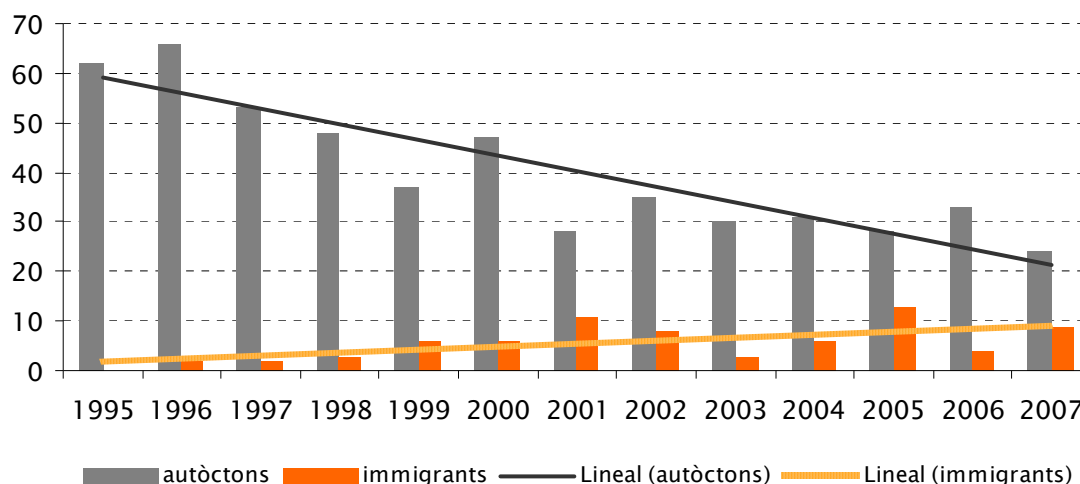


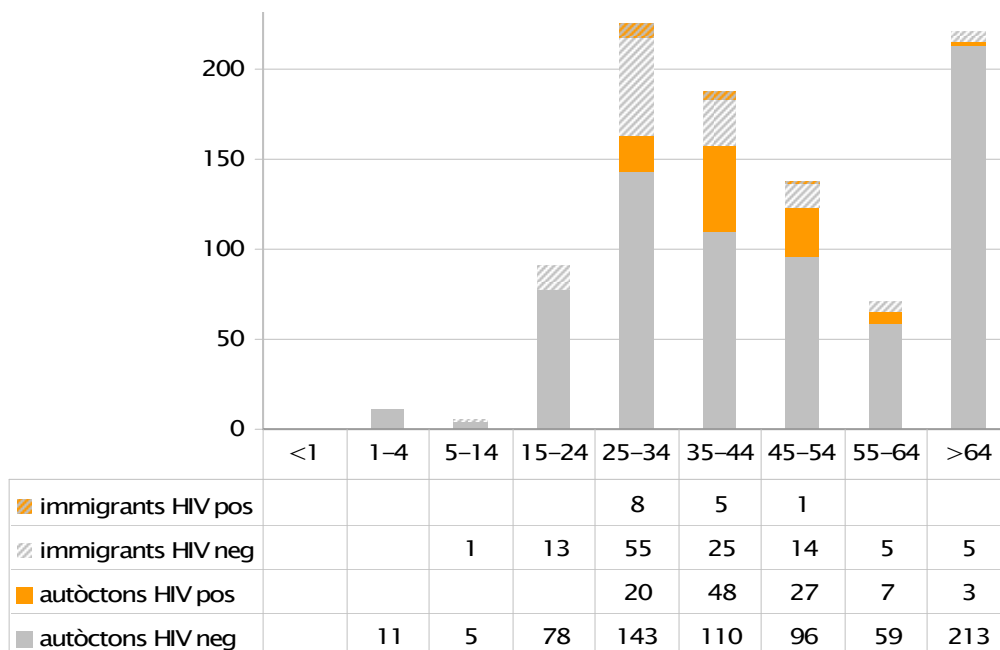
Figura 38; Evolució dels casos de tuberculosi diagnosticats al laboratori de l'HPSCiSP en homes immigrants i autòctons en el període 1995-2007.



Els grup d'edat amb la incidència més elevada ha estat entre els 25 i 54 anys. Els estrangers provinents de països amb una alta incidència de la malaltia, països de renda baixa i amb escassos mitjans per implantar els sistemes de control necessaris, solen ser individus joves. Les circumstàncies desfavorables que es troben a l'arribada al país d'acolliment (mal habitatge, amuntegament, excés de treball, mala alimentació, estrès emocional) afavoreixen que els pacients infectats emmalalteixin. Aquestes circumstàncies es donen sobretot en els primers temps al país d'acolliment, i el més freqüent és que la tuberculosi es presenti en els primers 5 anys després de l'arribada. Per altra banda, l'alta prevalença de la malaltia (superior als estàndards de la regió epidemiològica en la que està situat l'Estat Espanyol) (81, 248) és indicativa d'una important transmissió activa de la mateixa, que també contribueix a una major incidència en aquest grup poblacional. Aquesta distribució és constant en els diferents estudis publicats tant per la ciutat de Barcelona, per Catalunya, com per la resta de l'Estat Espanyol, així com en grans ciutats europees com Londres, Paris i Milà (20, 67). Alhora, altres factors de risc de desenvolupar la tuberculosi, com ara la infecció per l'HIV i el consum d'alcohol es donen sobretot a la població en aquest grup d'edat i contribueixen a que la incidència de la malaltia en sigui més alta (107).

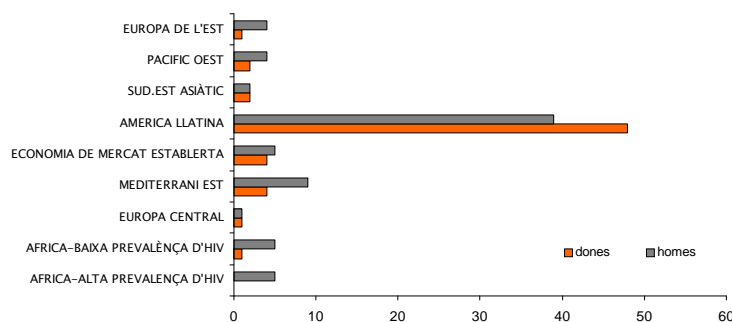
També s'observa un pic d'incidència en la població major de 65 anys, casos que sorgeixen del reservori de persones infectades en la seva joventut (figura 39).

Fig 39 : Distribució dels pacients diagnòsticats de tuberculosi al laboratori de l'HSCiSP per grups d'edat, coinfecció amb l'HIV i origen autòcton o immigrant.



El 50% de la població estrangera prové de 4 països essent el més representat el Perú (23,3%), seguit de Bolívia (12,7%), Equador (6,76%) i Marroc (6,76%), la resta estan repartits entre 33 nacionalitats diferents (figura 40). La distribució per sexes és gaire bé homogènia el 52,63% són homes respecte a 47,36% de dones, tot i que la distribució varia en funció del país d'origen, mentre la majoria de dones provenen de l'Amèrica Llatina, essent la regió epidemiològica de l'OMS amb major representació (63,90 %), el gruix de la resta de regions majoritàriament està representada per homes.

Fig 40: Nombre de pacients immigrants amb tuberculosi distribuïts per sexe i segons la seva regió epidemiològica de procedència.



La forma més freqüent de presentació de la tuberculosi ha estat la pulmonar exclusiva, amb un 70% dels casos. Aquest percentatge es baix, probablement degut a la influència en la nostra població del nombre de pacients coinfectats amb l'HIV, pacients que desenvolupen més fàcilment infeccions extrarespiratòries i disseminades (taula 27). Anteriorment a la epidèmia de l'HIV els percentatges estimats de tuberculosi pulmonar es situaven al voltant del 85% (17, 58, 83, 109). El 21,40% de pacients presentaren localització extrarespiratòria exclusiva, essent la més freqüent la limfàtica (7,8% del total de tuberculosi; 26,34% de extrarespiratòria exclusiva) seguida de la pleural (7,5% del total de tuberculosi; 25,36% d'extrarespiratòria exclusiva) (taula 27). La tuberculosi disseminada es va observar en 82 pacients (8,56%) dels quals el 60,97 % estaven coinfectats per l'HIV, essent les localitzacions més freqüents la respiratòria (88,42%) i les menys representades la cutània i pericàrdica (1,05%) (taula 26). La distribució per localitzacions dels casos de tuberculosi és un reflex gairebé idèntic al que s'observa a la ciutat de Barcelona i al conjunt del país (15, 76).

Taula 26: Localitzacions implicades en les TB disseminades.

Nombre de pacients	82 (60,97% HIV pos)		
Localitzacions implicades			
Pulmonar	88,42 %	Osteoarticular	5,26 %
Renal	41,05 %	Meníngia	3,15 %
Sang i/o moll de l'ós	32,63 %	Pericardíaca	1,05 %
Pleural	21,05 %	Cutània	1,05%
Limfàtica	24,21 %	gastrointestinal	7,36 %
femta	13,68 %	Altres	4,21 %

Resultats i discussió

Taula 27.: Distribució de les tuberculosi (TB) per localitzacions anatòmiques i mostres.

Localització		Mostra	N° mostres	Total	N° malalts		n° mostres per malalt
% del total de TB	única localització %				HIV NEG O DESC. (%)	HIV POS (%)	
Pulmonar			1374	770	681 (88,4)	89 (11,6)	
78,60	88	Esput	1050	599	527 (88)	72 (12)	1,75
		BAL	51	47	26 (55,3)	21 (44,7)	1,80
		BAS	218	210	189 (90)	21 (10)	1,03
		Asp. gàstric	23	16	16 (100)	0	1,43
		B. broquial	15	15	13 (86,7)	2 (13,3)	1
		Altres mostres resp	17	15	13 (86,7)	2 (13,3)	
Limfàtica							
7,82	72	Adenopatia	85	75	53 (70,6)	22 (29,3)	1,13
Osteoarticular							
3,13	86,6	L sinovial	4	4			1,2
		Òssies (biòpsies i exsudats)	32	30			1,06
Cutània							
0,31	75	Biòpsies de pell	4	4	3 (75)	1 (25)	1
Pleural							
7,51	76,4	Total	87	70	64 (91,4)	6 (8,6)	1,24
		Líquid pleural	68	58			1,17
		Biòpsia Pleural	19	18			1,05
Pericàrdica							
0,41	75	L. pericàrdic	7	4	3 (75)	1 (25)	1,75
Meníngia							
0,83	62,5	LCR	9	8	6 (75)	2 (25)	1,12
Genitourinària							
9,29	44,6		97	73	45 (61,6)	24 (36,4)	1,30
		Orina	93	69	45 (65,2)	24 (34,8)	1,30
		Biòpsies genitals	4	4			
Gastrointestinal							
1,87	53,8	L. ascític	18	13	10 (76,9)	3 (23,1)	1,23
		B peritoneal	6	6	6 (85,7)	1 (14,3)	1
Femta							
2,81	22,2		31	27	16 (59,2)	11 (40,78)	1,15
Sang							
3,34	3,12		49	32	7 (21,9)	25 (78,1)	1,53
Moll de l'os							
1,04			10	10	3 (30)	7 (70)	1

4.5 Rendiment de l'examen directe

S'ha disposat de les dades del període de 1995 a 2007 d'un total de 2984 mostres, 2901 amb cultiu positiu i 83 amb bacil·loscòpia positiva i cultiu negatiu.

Sensibilitat de la bacil·loscòpia

Del total 2901 mostres amb aïllament positiu per micobacteris, 1116 (38,5%) han presentat la bacil·loscòpia positiva. La sensibilitat és més alta quan les mostres han presentat cultiu positiu per a espècies pertanyents al complex *M. tuberculosis* (51,17%) respecte a MNT (18,1%). Aquests valors poden ser conseqüència de la diferència relativa en la concentració d'organismes en els dos grups d'espècies, que queda reflectida en la diferència en el temps de creixement en els medis de cultiu d'unes i altres espècies, que s'analitza en el apartat 4.6.2.

També la sensibilitat de la bacil·loscòpia varia en funció del tipus de mostra. Tal i com es mostra a la taula 28, on es reflecteixen les dades les 2901 mostres amb cultiu positiu. Del total, 2373 eren del tracte respiratori, de les quals 989 han presentat bacil·loscòpia positiva (59,2% per a *M. tuberculosis* complex i 17,3% per a MNT) i 1384 negativa (40,8% per a *M. tuberculosis* complex i 82,7% per a MNT). De les 528 mostres extrarespiratòries 127 han presentat bacil·loscòpia positiva (23,7% per a *M. tuberculosis* complex i 25% per a MNT) i 405 negativa (76,3% per a *M. tuberculosis* complex i 75% per a MNT).

En el grup de les mostres respiratòries la que presenta un major rendiment és l'esput (65% per a *M. tuberculosis* complex i 18% per a MNT), i en el context de les extrarespiratòries les mostres osteoarticulares (35,7% per a *M. tuberculosis* complex i 77% en MNT) (taula28).

Taula 28: Sensibilitat de la bacil·loscòpia per espècies micobacterianes i tipus de mostra.

Espècie	Pacients	Mostres	Mostres per pacient	Bacil·loscòpia			
				neg.	pos.	% pos	
Tracte respiratori							
Esput							
<i>M. avium</i>	22	29	1,32	24	5	17,2	
<i>M. bovis</i>	7	8	1,14	1	7	87,5	
<i>M. fortuitum</i> complex	55	58	1,05	57	1	1,7	
<i>M. gordonae</i>	110	117	1,06	117	-	0	
<i>M. intracellulare</i>	30	52	1,73	35	17	32,7	
<i>M. kansasii</i>	62	175	2,82	75	100	57,1	
<i>M. simiae</i>	13	15	1,15	15	-	0	
<i>M. tuberculosis</i>	599	1050	1,75	376	674	64,2	
<i>M. xenopi</i>	233	304	1,30	284	20	6,6	
MAC	10	21	2,10	19	2	9,5	
Altres	43	60	1,40	55	5	8,3	
BAS							
<i>M. avium</i>	4	4	1	4	-	0	
<i>M. fortuitum</i> complex	3	3		3	-	0	
<i>M. gordonae</i>	10	10	1	10	-	0	
<i>M. intracellulare</i>	8	8	1	7	1	12,5	
<i>M. kansasii</i>	22	22	1	14	8	36,4	
<i>M. tuberculosis</i>	210	218	1,04	114	104	47,7	
<i>M. xenopi</i>	47	49	1,04	48	1	2	
MAC	1	1	1	1	-	0	
Altres	7	7	1	7	-	0	
BAL							
			!				
<i>M. avium</i>	1	1	1	1	-	0	
<i>M. fortuitum</i> complex	1	1	1	1	-	0	
<i>M. kansasii</i>	6	6	1	2	4	66,6	
<i>M. simiae</i>	1	1	1	1	-	0	
<i>M. tuberculosis</i>	47	51	1,09	32	19	37,2	
<i>M. xenopi</i>	17	18	1,06	18	-	0	
MAC	2	2	1	2	-	0	
Aspirat gàstric							
<i>M. gordonae</i>	1	2	2,00	2	-	0	
<i>M. intracellulare</i>	1	1	1	1	-	0	
<i>M. kansasii</i>	3	5	1,67	2	3	60	
<i>M. tuberculosis</i>	16	23	1,44	19	4	17,4	
<i>M. xenopi</i>	2	2	1	2	-	0	
MAC	3	3	1	3	-	0	
Biòpsia bronquial							
<i>M. tuberculosis</i>	15	15		12	3	20	
Altres mostres resp.							
<i>M. gordonae</i>	1	1		1	-	0	
<i>M. kansasii</i>	3	5		2	3	60	
<i>M. tuberculosis</i>	15	17		10	7	41,2	
<i>M. xenopi</i>	3	5		4	1	20	
MAC	3	3		3	-	0	

	Espècie	Pacients	Mostres	Mostres per pacient	Bacil · Ioscòpia		
					neg.	pos.	% pos.
Extrarespiratòri							
Limfàtica							
	<i>M. avium</i>	4	4	1	2	2	50
	<i>M. genavense</i>	3	3	1	0	3	100
	<i>M. gordonae</i>	1	1	1	1	-	0
	<i>M. intracellulare</i>	2	2	1	-	2	100
	<i>M. marinum</i>	1	1	1	1	-	0
	<i>M. tuberculosis</i>	75	85	1,13	56	29	34,1
	MAC	1	1	1	1	-	0
	altres	3	3	1	2	1	33,3
Osteoarticular							
Biòpsies i aspirats	<i>M. bovis</i>	1	2	2	1	1	50
	<i>M. fortuitum complex</i>	1	3	3	-	3	
	<i>M. tuberculosis</i>	30	34	1,13	22	12	35,3
	<i>M. xenopi</i>	1	2	2	1	1	50
	MAC	1	1	1	1	-	0
Líquid sinovial	<i>M. bovis</i>	1	2	2	-	2	100
	<i>M. fortuitum complex</i>	1	3	3	0	3	100
	<i>M. tuberculosis</i>	4	4	1	4	-	0
Cutània							
	<i>M. bovis</i>	1	1	1	1	-	0
	<i>M. fortuitum complex</i>	7	9	1,29	4	5	55,6
	<i>M. kansasii</i>	1	1	1	-	1	100
	<i>M. marinum</i>	17	17	1	11	6	35,3
	<i>M. simiae</i>	1	1	1	1	-	0
	<i>M. tuberculosis</i>	4	4	1	4	-	0
	<i>M. xenopi</i>	1	1	1	1	-	0
	<i>Mycobacterium ssp</i>	1	1	1	1	-	0
Pleural							
Biòpsia pleural	<i>M. tuberculosis</i>	18	19	1,06	18	1	5,3
Líquid pleural	<i>M. africanum</i>	1	1	1	1	-	0
	<i>M. fortuitum complex</i>	2	2	1	2	-	0
	<i>M. gordonae</i>	1	1	1	1	-	0
	<i>M. tuberculosis</i>	58	68	1,17	64	4	5,9
	<i>M. xenopi</i>	1	1	1	1	-	0
	MAC	2	2	1	2	-	0
Pericàrdica							
	<i>M. tuberculosis</i>	4	7	1,75	7	-	0
Meníngia							
	<i>M. tuberculosis</i>	8	9	1.12	7	2	22.2

Espècie	Pacients	Mostres	Mostres per pacient	Bacil · loscòpia			
				neg.	pos.	% pos.	
Genitourinària							
<i>M. alvei</i>	1	1	1	1	–	0	
<i>M. avium</i>	2	2	1	2	–	0	
<i>M. bovis</i>	4	4	1	2	2	50	
<i>M. cr pig.</i>	1	1	1	1	–	0	
<i>M. fortuitum</i>	1	1	1	1	–	0	
<i>M. genavense</i>	1	1	1	1	–	0	
<i>M. gordonae</i>	7	7	1	7	–	0	
<i>M. peregrinum</i>	2	2	1	2	–	0	
<i>M. tuberculosis</i>	73	97	1.32	66	31	32	
<i>M. xenopi</i>	24	24	1	24	–	0	
MAC	4	4	1	4	–	0	
Gastrointestinal							
Biòpsies							
<i>M. cr ni pig.</i>	1	1	1	1	–	0	
<i>M. fortuitum complex</i>	4	4	1	4	–	0	
<i>M. gordonae</i>	1	1	1	1	–	0	
<i>M. tuberculosis</i>	6	6	1	6	–	0	
MAC	3	3	1	2	1	33,3	
Líquid ascític							
<i>M. tuberculosis</i>	13	18	1.38	17	1	5.5	
Femta							
<i>M kansasii</i>	2	2	1	1	1	50	
<i>M. avium</i>	3	9	3	9	–	0	
<i>M. tuberculosis</i>	27	31	1,15	23	8	25,8	
<i>M. xenopi</i>	2	3	1,50	3	–	0	
MAC	6	10	1,67	5	5	50	

Especificitat de la bacil · loscòpia

De les 1199 mostres amb bacil · loscòpia positiva, 83 van presentar cultiu negatiu, de les qual tres corresponien a un pacient amb diagnòs de Lepra. Sense analitzar les discrepàncies entre aquest resultat, l'especificitat de la bacil · loscòpia seria del 99,8%. Cal reintrepretar aquestes dades després de resoldre les discrepàncies. S'han descrit diferents supòsits que poden explicar aquests resultats discrepants; 1) pacients en tractament, 2) taxes de contaminació (sobrecrèixement) dels medis de cultiu elevades, 3) temps de descontaminació massa llargs, 4) temperatura o temps d'incubació inadequats, 5) contaminacions creuades, 6) contaminacions de l'aigua de rentat o dels portaobjectes 7) errades de laboratori i 8) tractar-se de micobacteris psicrófils que no creixen a les temperatures en que s'incuben les mostres habitualment (58).

Analitzant les 80 mostres discrepants, les podem agrupar en quatre supòsits (taula 29):

- a. Pacients en tractament: en 28 dels casos el pacient feia més d'un mes que havien iniciat el tractament antituberculós, i correspondria doncs a la presència de bacils suficientment lesionats per l'efecte del tractament que els fa incapaços de desenvolupar-se en el cultiu (44).
- b. Excés o defecte en la descontaminació:
 - ❖ En 29 de les mostres, els pacients varen presentar cultius d'altres mostres positius o la detecció d'àcids nucleics positiva, el que podria manifestar un excés de descontaminació.
 - ❖ 9 de les mostres negatives pertanyien a pacients que tenien infecció disseminada per *M. genavense*, aïllats en mostres no descontaminades. *M. genavense* és làbil, sensible a la descontaminació (191).
 - ❖ En sis de les mostres els medis de cultiu van presentar tots sobrecreixement bacterià, i el pacient presentaven altres mostres amb cultiu positiu.
- c. Errades de laboratori: en 2 de les mostres es podria haver produït un error durant la manipulació de les mostres, ja que el mateix dia es van manipular mostres amb bacil·loscòpia positiva i cultiu positiu. L'explicació més plausible recau en la contaminació creuada, ja sigui en el moment de fer l'extensió o en la cubeta de tinció (58). En altres 2 mostres sembla que es podria haver produït una errada de retolació, ja que el mateix dia de l'inoculació es van processar altres mostres amb cultiu positiu i bacil·loscòpia negativa.
- d. Desconegut: les 4 mostres restants són les úniques mostres dels pacients implicats, dels quals no se'n disposa l'història clínica.

Així doncs, setanta dues de les mostres analitzades són falsos negatius per al cultiu, mentre que 8 de les mostres són veritables falsos positius per a la bacil·loscòpia. Això suposa un 0,61%, per sota del 1% que es recomana com a màxim acceptable (17, 137).

Després de la resolució de les discrepàncies l'especificitat de la bacil·loscòpia seria del 99,9%, i el valor predictiu positiu del 99,4 %.

Taula 29. Mostres amb cultiu negatiu bacil·loscòpia positiva.

nº de mostres	Resolució de discrepàncies entre cultiu i bacil·loscòpia
44*	Altres mostres coetànies dels mateixos pacients amb cultiu o detecció d'àcids nucleics positius Excés o defecte en la descontaminació?
28	Micobacteriosi en tractament
2	Altres mostres cultiu positiu bacil·loscòpia negativa el mateix dia de recepció de la mostra. Errada en la retolació?
2	Altres mostres cultiu positiu bacil·loscòpia positiva el mateix dia de recepció de la mostra. Contaminació creuada?
4	Cap dels supòsits anteriors, mostres úniques

*9/44 Infeccions per *M. genavense*

4.6 Aïllament per cultiu

4.6.1 Taxa de contaminació

Les mostres colonitzades amb flora comensal, és a dir, la majoria de mostres per a l'aïllament de micobacteris, requereixen esser descontaminades a la seva arribada al laboratori. El mètode utilitzat ha de trobar l'equilibri entre l'eliminació de la flora colonitzant i la preservació dels micobacteris que hi pugui haver. Malgrat tot, i sota les millors condicions, els processos de descontaminació destrueixen entre el 10 i el 20 % de micobacteris presents a la mostra.

Es considera que el procediment és òptim quan el percentatge de contaminació dels cultius per flora comensal es troba al voltant del 2 al 5 % (171). Aquests percentatges s'expressen sempre com a contaminacions del medi de Löwenstein-Jensen. El fet d'utilitzar medis líquids, que permeten la complementació amb antibiòtics, fa que es

pugui utilitzar mètodes de descontaminació menys agressius, que caldria reconsiderar en cas de només utilitzar medi sòlid.

El percentatge de contaminació dels dos tubs de medi de Löwenstein–Jensen es troba entre 3,25% i 7,16%, valors lleugerament superiors als recomanats. La utilització de medi líquid, rebaixa el total de sobrecreixement bacterià al 0,7%–2,24%, essent segons la nostra opinió una taxa acceptable.

Taula 30: Percentatge de contaminacions dels medis de cultiu per any.

any	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
medi													
1 tub sòlid	7,23	5,47	7,68	6,13	9,98	7,7	8,8	5,75	5,06	4,17	4,81	3,86	5,41
2 tubs sòlids	7,16	6,28	4,24	4,37	6,71	5,64	6,2	3,82	5,6	4,76	3,55	3,25	4,99
Medi líquid	2,21	1,21	1,03	1,05	1,57	1,93	1	1,18	1,21	0,72	1,44	0,73	1,28
líquid + 1 sòlid	-	-	-	0,58	0,56	-	0,7	-	0,56	0,22	0,33	0,36	0,28
Contaminació total	2,24	0,86	0,92	1,41	1,97	0,65	1,3	1,80	0,98	0,72	1,22	0,93	1,76
Sang i moll d'os	5,77	3,36	2,17	2,82	2,38	1,8	1,8	1,9	2,56	0,91	1,25	8,08	2,81

4.6.2 Rendiment dels medis de cultiu

Per a l'anàlisi de les dades del rendiment dels diferents medis de cultiu s'ha disposat de les dades complertes de 3164 aïllaments de diferents espècies de micobacteris. Del total de mostres, 163 corresponen a aïllaments en sang i 26 en moll de l'os (taula 32). Així doncs per analitzar conjuntament els medis de cultiu líquid i sòlid s'ha disposat de dades de 2975 aïllaments de micobacteris. Amb els quals s'ha pogut comparar les diferències entre el temps que necessita cadascuna de les espècies aïllades en els diferents medis de cultiu líquid utilitzats. S'ha fet l'anàlisi de forma individual per a les espècies més freqüents, i la resta s'han agrupat en funció de la seva velocitat de creixement.

Les mostres van ser sembrades alternativament en un o altre medi de cultiu líquid de forma independent, només un nombre petit de mostres va ser sembrat en ambdós medis de cultiu líquid, encara que no suficients per avaluar-les de forma depenent. Aquestes mostres estan incloses en l'anàlisi general, de manera que estan comptades per duplicat. Les mostres amb aïllaments mixtes s'han exclòs.

A la taula 31, es pot observar els diferents percentatges d'aïllament en cadascun dels tipus de medi. Tal i com està àmpliament descrit, s'observa una major capacitat d'aïllament dels medis de cultiu líquid, recuperant un nombre més alt de cultius positius que el medi sòlid.

Només en un 2,8% dels micobacteris es van aïllar únicament en medi sòlid. La majoria d'espècies es comporten de forma similar, excepte en el cas dels creixedors ràpids, que tenen com a temperatura òptima de creixement al voltant dels 30°C. És per això que les mostres en les que hi ha la possibilitat de la presència d'aquestes espècies, de forma expressa es pot incubar la mostra a 30°, fet que no es possible quan s'inocula la mostra en MB/BacT ALERT ja que caldria tenir tot un armari d'incubació a 28–30° C de temperatura per un volum petit de mostres. Aquesta dificultat queda reflectida en els percentatges d'aïllament, tant en mostres amb la amb bacil·loscòpia positiva com negativa on es van aïllar espècies de creixement ràpid i que es varen sembrar en MB/BacT ALERT, on el percentatge d'aïllament només en medi sòlid es superior al 60%. En les mostres bacil·loscòpia positiva el nombre de bacils/ml és més elevat, fet que es posa de manifest per l'alt percentatge de mostres que creixen en ambdós medis de cultiu, sòlid i líquid, ja sigui aquest últim BACTEC 460TB o MB/BacT ALERT.

Les mostres amb la bacil·loscòpia negativa presenten una distribució més esbiaixada, observant-se un major nombre de cultius positius únicament en medi sòlid (global del 15%). Aquest fet probablement es deu a l'efecte anomenat "inòcul". És a dir només es troben micobacteris viables en la part d'inòcul que s'ha utilitzat per sembrar un o altre dels medis de cultiu.

És en les mostres amb la bacil·loscòpia negativa quan es posa de manifest la complementarietat dels medis líquids i sòlid per l'aïllament de micobacteris.

taula 31: Percentatges dels aïllaments en els diferents medis líquids;(BACTEC 460TB (B460) i MB/BacT ALERT (MB/BacT)) i el medi sòlid (Löwenstein-Jensen).

	<i>M. tuberculosis complex</i>			<i>M. kansasii</i>			<i>M. avium complex</i>			<i>M. xenopi</i>		
	B460	MB/BacT	total	B460	MB/BacT	total	B460	MB/BacT	total	B460	MB/BacT	total
Bacil · loscòpia positiva												
Medi líquid+sòlid	86,9	88,9	87,7	81,5	90	83,9	79,4	88,9	81,6	77,8	88,9	81,5
Medi líquid	10,7	8,8	10	14,50	10	13,3	17,2	11,1	15,8	22,2	11,1	18,5
Medi sòlid	2,4	2,3	2,3	4	0	2,8	3,4	0	2,6			
Bacil · loscòpia negativa												
Medi líquid+sòlid	69	71,7	69,8	53,6	54,8	54	44,4	48,2	45,3	22,2	28,9	23,8
Medi líquid	19	20	19,3	27,,5	42	32	43,3	51,8	45,3	63,6	57,8	62,3
Medi sòlid	12	8,3	10,9	18,9	3,2	14	12,3		9,4	14,2	13,3	13,9

	<i>M. gordonae</i>			Altres MNT de CL			Altres MNT de CR			Total espècies		
	B460	MB/BacT	total	B460	MB/BacT	total	B460	MB/BacT	total	B460	MB/BacT	total
Bacil · loscòpia positiva												
Medi líquid+sòlid	100		50	66,7		28,6	33,3	20	28,6	85,2	86,8	85,8
Medi líquid		100	50	33,3	100	71,4	33,3	20	28,6	11,9	10,4	11,4
Medi sòlid							33,3	60	42,8	2,9	2,8	2,8
Bacil · loscòpia negativa												
Medi líquid+sòlid	16,9	18,7	17,3	24,2	25	24,5	17,1	3,2	14	47	52,2	48,4
Medi líquid	63,5	71,9	65,5	57,6	56,2	57,1	42	32,3	39,7	37,1	35,4	36,6
Medi sòlid	19,6	9,4	17,2	18,2	18,8	18,4	40,9	64,5	46,3	15	12,4	15

En l'anàlisi de les diferències en els temps de creixement entre un o altre medi de cultiu líquid, només es van observar diferències significatives en el cas de les mostres amb bacil · loscòpia negativa i on s'aïlla *M. tuberculosis complex* o micobacteris de creixement ràpid (taula 33). En l'últim dels casos probablement degut major facilitat que ofereix el sistema BACTEC 460TB d'incubar els vials de forma individual a diferents temperatures que, tal i com ja s'ha comentat anteriorment, és més difícil amb el sistema MB/Bact ALERT. Tot i que sembla que el medi de cultiu BACTEC 460TB tindria més capacitat d'aïllament MNT i així s'ha descrit també a la bibliografia, no pot

fer-se una bona avaluació d'aquest supòsit ja que les mostres no es van incubar en paral·lel en ambdós medis.

S'observa també la influència del factor "inòcul" en els temps de creixement de les diferents espècies en funció del resultat de la bacil·loscòpia. Els micobacteris aïllats de mostres amb bacil·loscòpia positiva han requerit menys temps que les que la presentaven negativa, i la diferència ha estat significativa en totes les espècies excepte en el conjunt d'espècies agrupades com a "altres micobacteris de creixement lent" i en el BACTEC460. En aquestes, la mitjana de dies requerits per al seu aïllament ha estat superior en mostres amb bacil·loscòpia positiva que en la negativa, el fet que només hi hagi tres mostres fa que no se'n puguin treure conclusions.

Les mostres de sang i moll de l'os es van incubar en el medi de cultiu BACTEC 460 13A. En la taula 32 s'observa la influència de les necessitats metabòliques de cadascuna de les espècies, ja que en el cas de *M. genavense* i *M. xenopi*, amb dificultats de creixement, els temps requerits d'aïllament són molt superiors a les altres espècies

Taula 32: Espècies aïllades en medi BACTEC 13A.

	<i>M. tuberculosis</i> complex ^a	<i>M. avium</i> complex ^b	<i>M. kansasii</i> ^c	<i>M. genavense</i> ^d	<i>M. xenopi</i> ^e	Altres ^f
nº de mostres	61	96	6	10	8	4
Mitjana temps creixement (rang)	29,4 (6-93)	23,43 (5-91)	20,33 (14-26)	46,1 (14-77)	45,12 (23-93)	17,66 (15-19)
Desviació estàndard	18,1	20,8	4,63	21,49	21,44	2,30

a: 51 *M. tuberculosis* (9 moll d'os), 10 *M. bovis* (1 moll d'os)

b: 19 *M. avium* (3 moll d'os), " *M. intracellulare*, 75 MAC (7 moll de l'os)

c: 1 moll d'os; d: 2 moll d'os; e: 3 moll d'os; f: 2 *M. scrofulaceum*, 1 M CR pigmentada, 1 *M. chelonae*.

4 mostres amb aïllaments mixtes no han estat comptades.

Resultats i discussió

Taula 33: Temps de creixement per a cada espècie en els diferents medis de cultiu i en funció del resultat de la bacil.loscòpia.

	ESPÈCIE													
	<i>M. tuberculosis complex</i>		<i>M. kansasii</i>		<i>M. avium complex</i>		<i>M. xenopi</i>		<i>M. goodii</i>		Altres MNT de CL		Altres MNT de CR	
	BACTEC 460	MB/BacT	B460	MB/BacT	B460	MB/BacT	B460	MB/BacT	B460	MB/BacT	B460	MB/BacT	B460	MB/BacT
	n° de mostres													
Bacil · loscòpia positiva														
medi sòlid + líquid	548	273	62	27	23	8	14	8	1		2		3	1
medi líquid	67	27	11	3	5	1	4	1		1	1	4	3	1
medi sòlid	15	7	3	0	1	0							3	3
Bacil · loscòpia negativa														
medi sòlid + líquid	449	190	37	17	40	13	66	26	18	6	8	4	18	1
medi líquid	124	53	19	13	39	14	189	52	68	23	19	9	44	10
medi sòlid	78	22	13	1	11	0	42	12	21	3	6	3	43	20
TEMPS DE CREIXEMENT														
Bacil · loscòpia positiva	B460	MB/BacT	B460	MB/BacT	B460	MB/BacT	B460	MB/BacT	B460	MB/BacT	B460	MB/BacT	B460	MB/BacT
n° mostres	615	300	73	30	28	9	18	9	1	1	3	4	6	2
mitjana	13,5 (2-68)	14,4 (3-50)	14,3 (3-51)	12 (6-31)	11,2 (3-28)	13 (7-21)	28,9 (7-66)	33,6 (33-53)	24	39	23,3 (7-37)	14,75 (7-20)	8,66 (6-11)	6 (0-6)
Desviació estàndard	8,40	6,73	9,88	4,95	6,24	5,07	17,22	7,8				5,56	1,96	0
	P=0,61		P=0,118		P = 0,481		P=0,185							
Bacil · loscòpia negativa														
n° de mostres	573	243	56	30	79	27	255	78	86	29	27	13	62	11
mitjana	20 (4,68)	24,1 (5,61)	17,6 (7,46)	17,9 (12-37)	16,1 (2-60)	18,6 (9-30)	48,6 (9-87)	50,9 (26-82)	29,6 (5-72)	31,4 (10-55)	18,04 (7-43)	19,9 (12-40)	14,74 (5-60)	22,09 (6-43)
Desviació estàndard	7,96	7,49	7,70	5,88	9,65	5,73	13,25	10,43	15,11	13,74	9,22	8,00	9,43	13,07
	P<0,005		P = 0,871		P = 0,214		p = 0,114		P=0,567		P=0,483		P=0,030	

4.7 Detecció d'àcids nucleics de *M. tuberculosis* complex directament en la mostra clínica

L'any 1997 es va començar a utilitzar la tècnica de detecció d'àcids nucleics directament en la mostra clínica amb el sistema comercial Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct (AMTD) test (Gen-Probe Inc., San Diego Calif.). S'han recollit les dades de l'experiència de deu anys, durant els que s'han analitzat un total de 7452 mostres de les quals 5066 (68%) eren respiratòries i 2386 (32%) extrarespiratòries.

Amb la intenció d'optimitzar l'AMTD, s'ha introduït una modificació a l'algoritme d'interpretació dels resultat proposat pel fabricant. Inicialment, el fabricant considerava el resultat positiu per sobre de 30.000 unitats relatives de llum (URL). Posteriorment, la mateixa casa comercial, proposa una zona gris entre 30.000 i 500.000 URL en la primera anàlisi i, en cas de caure en aquesta zona, en la repetició de l'anàlisi es torna al criteri inicial (positiu >30.000). En el nostre algoritme, ja inicialment varem optar per l'augment de l'interval de zona gris fins a 10^6 URL, i mantenir el resultat com ininterpretable si en la reanàlisi tornava a caure dins la zona gris. Els resultats de les mostres amb anàlisi inicial entre 30.000 i 10^6 estan reflectits a la taula 34.

Taula 34: Mostres amb resultat de AMTD inicial entre 30.000 i 10^6 .

RLU inicial	n primer anàlisi	n repetició anàlisi			
		<30.000	30.000–500.000	500.000– 10^6	> 10^6
30.000–49.999	38	36 ^f	1 ^a	1 ^b	0
50.000–74.999	31	22 ^{b,f}	7 ^a	0	2 ^b
75.000–99.999	18	15 ^{j,k}	2 ^a	0	1 ^a
100.000–149.999	30	22 ^d	3 ^b	1 ^b	4 ^e
150.000–199.999	18	15 ^{b,f,i}	1 ^a	0	2 ^c
200.000–299.999	16	12 ^{b,f}	2 ^b	1 ^a	1 ^b
300.000–399.999	16	13 ^{b,f,g,h}	1 ^b	0	2 ^c
400.000–500.000	15	10 ^b	1 ^h	1 ^a	3 ^c
500.001–750.000	21	13 ^{d,g,h}	1 ^b	0	7 ^c
750.001– 10^6	11	5 ^d	4 ^d	0	2 ^{b,f}
	214	163	23	4	24

^a cultiu negatiu; ^b 1 cultiu positiu per a *M. tuberculosis* complex; ^c totes les mostres cultiu positiu per a *M. tuberculosis* complex; ^d 2 cultius positius per a *M. tuberculosis* complex; ^e 3 cultius positius per a *M. tuberculosis* complex; ^f: una mostra cultiu negatiu diagnòstic de tuberculosi; ^g dues mostres amb cultiu negatiu diagnòstic de tuberculosi; ^h 1 cultiu positiu per MNT; ⁱ dos cultius positius per MNT; ^j tres mostres cultiu positiu per MNT; ^k un pacient ex .tuberculós

❖ **Interpretació dels resultats segons el criteri recomanat per la casa comercial (zona gris entre 30.000 i 500.000 URL)**

De les 182 mostres que en la primera anàlisi van caure en la zona gris, al repetir-la els resultats foren els següents:

- ❖ 145 (79,7%) van donar un valor <30.000 per tant es considerarien negatives.

De les quals 14 (9,6%) eren de pacients amb tuberculosi.

- ❖ 37 (20,3%) van donar un valor superior a 30.000 i per tant s'haurien d'haver considerat positives. Disset (46%) pertanyien a pacients amb diagnòstic de tuberculosi, amb o sense, el cultiu positiu per *M. tuberculosis* complex.

❖ **Interpretació amb zona gris entre 30.000 i 10^6**

La modificació de la interpretació dels resultats que vam incorporar en el nostre laboratori va afectar a 214 mostres. En la repetició de l'anàlisi amb la segona alíquota els resultats foren:

- ❖ 163 (76,2%) mostres presentaren un valor negatiu (<30.000), 20 (12,2%) d'aquestes eren de pacients amb diagnòstic de tuberculosi amb o sense cultiu positiu per a *M. tuberculosis* complex

- ❖ 24 (11,2%) mostres donaren un valor superior a $>10^6$ i es consideraren positives. Vint-i-una de les quals (87,5 %) varen presentar cultiu positiu per a *M. tuberculosis* complex o diagnòstic de tuberculosi.

- ❖ 27 (12,6%) mostres restants va tornar a caure en la zona gris i es van excloure de l'anàlisi final, al considerar el resultat de la tècnica ininterpretable (taula 34). Vuit d'elles (30%) pertanyien a pacients amb diagnòstic de tuberculosi amb o sense cultiu positiu per a *M tuberculosis* complex.

Taula 35: Resultats preliminars i definitius de la AMTD segons els criteris d'interpretació de la casa comercial i de l'HSCiSP.

Proposta Gen-probe					
Primer resultat AMTD (URL)			Resultats definitius després de repetir l'anàlisi		
negatiu	<30.000	6526	negatiu	<30.000	6671
zona gris	30.000–500.000	182			
positiu	>500.000	744	positiu	>30.000	781
Proposta HSCSP					
Primer resultats AMTD (URL)			Resultats definitius després de repetir l'anàlisi		
Negatiu	<30.000	6671	Negatiu	<30.000	6834
Zona gris	30.000–10 ⁶	214	Ininterpretable	30.000–10 ⁶	27
Positiu	>10 ⁶	567	Positiu	>10 ⁶	591

Per una banda la modificació proposada ha suposat un augment en els valors de l'especificitat i del VPP passant del 97,4% al 99,8% i del 77,7% al 97,9% respectivament. Mentre que per una altra banda s'observa una petita disminució en la sensibilitat i el valor predictiu negatiu passant de 85,9 % a 82,9% i de 98,51% a 98,2% respectivament (taula 36). La modificació ha fet possible limitar el nombre de falsos positius. Aquesta modificació ha estat utilitzada per altres autors amb resultats similars (7, 29) (57, 119)

Taula 36: Resum de AMTD, per mostres, després de la resolució de discrepàncies amb i sense zona gris.

PARÀMETRE	AMTD	Diagnòstic de TB		Sensibilitat	Especificitat	VVP ^e	VVP ^f
		Positiu	negatiu				
Sense zona gris							
Total	Positiva >30.000	607	174	85,9	97,4	77,7	98,5
	Negativa <30.000	99	6572				
Amb zona gris 30.000–1.000.000							
Total	Positiva	579 ^c	12 ^d	82,9	99,8	97,9	98,2
	Negativa	119	6715				

^c Vint mostres positives van estar classificades com a negatives erròniament després de repetir la tècnica. Vuit veritables positius van tornar a caure a la zona gris hi ha estat extrets.

^d 143 falsos positius en la primera mesura van ser classificats correctament com a negatius al repetir la tècnica. Dinou falsos positius van tornar a caure a la zona gris hi ha estat extrets.

^e VPP: Valor predictiu negatiu ^fVPN: Valor predictiu negatiu

S'analitzen un total de 5058 mostres, 536 mostres presentàren cultiu positiu per *M. tuberculosis* complex, de les quals 383 (71,5%) tenien la bacil·loscòpia positiva i 153 (28,5%) negativa (taula 37). De les mostres amb bacil·loscòpia positiva el 99,5 % (381) van ser AMTD positiva, així com en 60.1% (92) de les que foren bacil·loscòpia negativa.

En 19 mostres la AMTD va ser positiva i el cultiu per a *M. tuberculosis* complex negatiu (taula 37). Per a la resolució de les discrepàncies s'incorporen a l'anàlisi les dades clíniques i el resultat obtingut en altres mostres dels pacients implicats. Dues mostres amb bacil·loscòpia positiva i cultiu positiu per a *M. tuberculosis* complex varen resultar AMTD negativa. En aquestes mostres probablement els inhibidors foren responsables d'aquest resultat negatiu. Per un apropiada interpretació dels resultats totes les mostres haurien de ser testades per la presència d'inhibidors (29, 49, 89).

Pel càlcul de la sensibilitat, especificitat, VVP i VPN es pren com a referència el diagnòstic de tuberculosi (taula 38).

AMTD en mostres extrarrespiratòries

D'un total de 2367 mostres de 1947 pacients, 134 mostres presentàren cultiu positiu per *M. tuberculosis* complex, de les quals 43 (32,1%) tenien la bacil·loscòpia positiva i 91 (67,9%) negativa (taula 37). De les mostres amb bacil·loscòpia positiva el 95,3 % (41) van ser AMTD positiva, així com en 41.7% (38) de les que foren bacil·loscòpia negativa.

En 20 mostres la AMTD va ser positiva i el cultiu per a *M. tuberculosis* complex negatiu, tal com en les mostres respiratòries, s'incorporen a l'anàlisi les dades clíniques i el resultat obtingut en altres mostres dels pacients implicats (taula 38).

Resultats i discussió

Taula 37: Comparativa entre la AMTD i el cultiu per *M. tuberculosis* complex.

PARÀMETRE	AMTD	Cultiu de <i>M. tuberculosis</i> complex		Sensibilitat	Especificitat	VPP ^a	VPN ^b
		Positiu	negatiu				
Mostres respiratòries							
Total	Positiva	473	19	88,2	99,6	96,1	98,6
	Negativa	63	4503				
Bacil·loscòpia positiva	Positiva	381	6	99,5	92,3	98,4	97,3
	Negativa	2	72				
Bacil·loscòpia negativa	Positiva	92	13	60	99,7	87,8	98,6
	negativa	61	4431				
Mostres extrarespiratòries							
Total	Positiva	79	20	50	99,1	79,8	99,1
	Negativa	55	2213				
Bacil·loscòpia positiva	Positiva	41	9	95,3	66,6	82	90
	Negativa	2	18				
Bacil·loscòpia negativa	Positiva	38	11	41,7	99,5	77,5	97,6
	negativa	53	2195				

^a VPP: Valor predictiu positiu ^b VPN: Valor predictiu negatiu.

Taula 38: Rendiment de la AMTD, per mostres, després de la resolució de discrepàncies.

PARÀMETRE	AMTD	Diagnòstic de TB		Sensibilitat	Especificitat	VVP	VVN
		Positiu	negatiu				
Mostres respiratòries							
Total	Positiva	485	7	88,5	99,8	98,6	98,6
	Negativa	63	4503				
Bacil·loscòpia positiva	Positiva	386	1	99,5	98,6	99,7	97,3
	Negativa	2	72				
Bacil·loscòpia negativa	Positiva	99	6	61,9	99,8	94,3	98,7
	negativa	61	4431				
Mostres extrarespiratòries							
Total	Positiva	94	5	62,7	99,7	95	97,5
	Negativa	56	2212				
Bacil·loscòpia positiva	Positiva	49	1	94,2	94,4	98	85
	Negativa	3	17				
Bacil·loscòpia negativa	Positiva	45	4	46	99,8	91,8	97,6
	negativa	53	2195				

La sensibilitat global de la AMTD és inferior en les mostres extrarespiratòries respecte a les respiratòries. Les mostres respiratòries mostren una sensibilitat global del 88,5% i les extrarespiratòries del 62,7%. La sensibilitat ha estat similar quan la bacil·loscòpia ha estat positiva independentment del tipus de mostra, del 94,2 % per a les mostres extrarespiratòries i del 99,5% per a les respiratòries. En les mostres amb bacil·loscòpia negativa, el valors baixen substancialment fins al 46% en les mostres extrarespiratòries i el 61,9% en les respiratòries. Aquets resultats indiquen, en ambdós casos, un baixa concentració del rRNA en les mostres amb bacil·loscòpia negativa, més aguditzada en les mostres extrarespiratòries. També es podria explicar amb el suggeriment que fan alguns autors que en les mostres extrarespiratòries la presència d'inhibidors podria ser més elevada que en respiratòries (176), tot i que altres autors (168) han trobat la mateixa proporció d'inhibidors en ambdós tipus de mostres.

La sensibilitat en les mostres extrarespiratòries es baixa respecte a altres estudis on s'han observat sensibilitats entre el 74,3 i el 100% (50, 89, 168, 176, 178, 199). Les discrepàncies entre les sensibilitats en els diferents estudis poden ser degudes a les diferències en la proporció de mostres amb bacil·loscòpia positiva i negativa.

De les 461 mostres respiratòries bacil·loscòpia positiva, 388 eren de pacients amb diagnòstic de tuberculosi i en 386 (99,5%) l'AMTD va ser positiva. En 72 mostres es va aïllar un MNT i totes elles varen ser AMTD negativa. Per últim en un cas de bacil·loscòpia positiva el cultiu va ser negatiu i no es va considerar que el malalt fos tuberculós. D'acord amb aquets resultats es podria utilitzar l'AMTD per diferenciar entre infecció per *M. tuberculosis* i MNT en els malalts bacil·loscòpia positiva facilitant la modificació de la terapèutica, així com la interrupció de l'aïllament respiratori i l'estudi de contactes. Malgrat això, s'ha de valorar que hi ha hagut dos pacients amb bacil·loscòpia positiva i cultiu positiu per a *M. tuberculosis* complex i AMTD negativa que haurien representat una font de transmissió no detectada.

Tot i la baixa sensibilitat observada en les mostres amb bacil·loscòpia negativa, la tècnica mostra una excel·lent especificitat, permetent així validar els resultats positius

obtinguts en malalts bacil·loscòpia negativa, en els quals la detecció d'àcids nucleics presenta un major benefici avançant considerablement el diagnòstic (3, 251).

Un acurat i ràpid diagnòstic de la tuberculosi encara és difícil, i no existeix un únic test ideal. Per a la millora del diagnòstic cal la utilització de les diferents tècniques disponibles i tenir sempre en compte les característiques clíniques del pacient (3). Les tècniques d'amplificació no poden substituir les tècniques de diagnòstic convencional tot i ser ràpides i específiques com la AMTD.

Respecte a les mostres amb bacil·loscòpia negativa és interessant la realització de la detecció d'àcids nucleics directament en la mostra clínica, però amb una selecció dirigida en aquelles mostres en que la sospita de tuberculosi sigui alta.

4.8 Seguiment prospectiu de les resistències en malalts tuberculosos sense tractament previ i amb tractament previ als fàrmacs de primera línia

Durant aquest període de 9 anys s'ha fet l'estudi de sensibilitat de les soques aïllades de 534 pacients, dels quals en 37 no se n'ha pogut saber els antecedents de tractament, per tant s'han exclòs de l'anàlisi dels resultats. Un total de 444 (89,3%) pacients no havien estat tractats anteriorment i 53 (10,7%) tenien antecedents de tractament previ.

Dels 497 pacients inclosos en l'anàlisi el 79,2 % són autòctons i el 20,7% immigrants. Els percentatge de pacients immigrants han augmentat de forma important durant el període estudiat del 12,6% el 1999 al 30,77% el 2007. Les dades publicades per Catalunya mostren una tendència similar, del 6,1% de l'any 1996 al 37,9% al 2006 (76). Aquesta tendència és general per a tota la regió epidemiològica d'Europa, on el 2006 un 20% dels casos declarats ho eren en pacients immigrants, i si s'exclou Bulgària i Romania el percentatge augmenta al 31% (81). A l'estat espanyol en les dades publicades per Jiménez, Casal i el *Grupo Español de Micobacteriologia* (GEM) (estudi multicèntric l'any 2006 a 120 laboratoris de l'Estat Espanyol representant 16 comunitats autònomes), el percentatge de pacients immigrants ha estat del 33,3% (117). El creixent nombre de pacients immigrants en les declaracions de tuberculosi i la diferència en els percentatges de resistència entre la població immigrant i la autòctona fa que sigui necessari conèixer l'estat de les resistències al país d'origen, així com els antecedents de tractament de cadascun dels pacients. Avalant també la recomanació d'incloure un quart fàrmac en el tractament inicial fins tenir el resultat de l'estudi de sensibilitat.

4.8.1 Resistència combinada (pacients nous i prèviament tractats)

El percentatge de resistència global a l'HSPiSC ha estat del 8,7% proper al 8,1% de la ciutat de Barcelona durant el període 1995–2003 (Martín Casabona i al. Dades no publicades). De les dades publicades per Jiménez, Casal i el GEM es pot extreure que

la taxa de resistència global a l'Estat Espanyol és del 9,8% (117). La nostra sèrie es situa lleugerament per sota de països com França, Itàlia i Portugal amb uns percentatges del 9,5% ,13,8% i 15,1% respectivament, i semblant al publicat en el mateix informe pel conjunt d'Europa del 8,9% (1994–2007), excloent els països de l'Europa de l'Est on es situa al 48,8% (81). La taxa global mundial es troba en el 20% (247).

Taula 39. Resistència combinada a l'HSCiSP (1999–2007) a Barcelona (BCN) (1995–2003) i a Catalunya (CAT) 2006. Barcelona informe aspb 2006.

	HSCiSP		BCN ^a	CAT	BCN		HSCiSP		BCN ^a	CAT	BCN
	n	%	(1995–2003)	%	2006		n	%	(1995–2003)	%	2006
Sensibles	454	91,3	91,9	-	-						
Resistència a almenys un fàrmac	43	8,7	8,1	-	-	Multiresistència	4	0,8	1,44	1,3	1,9
INH	29	5,8	4,9	5,5	8,1	Monoresistència	32	6	6,4	-	-
RMP	6	1,2	1,6	1,1	2,3	Poliresistència	8	0,2	0,7	-	-
ETB	1	0,2	0,2	0,9	-						
STR	17	3,4	3	4,1	4,9						
PZA	4	0,8	1,4	1,7	2,6						

a: inclou les dades de les soques de la sèrie analitzada en aquesta memòria

Els percentatges de resistència per a cadascun dels fàrmacs són de: 5,8% per la INH, 1,2 % per la RIF, 0,2 % l'ETB 3,4 % l'STR i 0,8% per la PZA. Percentatges similars als del conjunt de la ciutat de Barcelona pel període 1995–2003 (Martín-Casabona i cols ,dades no publicades), tot i que les publicades per l'Agència de Salut Pública de Barcelona pel 2006 els percentatges són lleugerament superiors per a la INH, la RIF, l'STR i la PZA (taula 39) (15). L'informe mundial de la OMS presenta uns percentatges de resistència per a la regió epidemiològica europea de 6,2% per a la INH, 1,9% per la RIF, 1,0% per l'ETB i 4,4 per a l'STR i 1,5% de MDR (247), percentatges semblats als ja comentats anteriorment (taula 39). L'informe d'àmbit Europeu, *Surveillance of tuberculosis in Europe. March 2008* (81), dona dades de resistència combinada en pacients autòctons i immigrants de l'any 2006, on les dades per a l'Estat Espanyol no són representatives de tot el territori ja que actualment a l'Estat espanyol només tres comunitats participen en el *Global Project on Anti-tuberculosis Drug resistance*

surveillance the Who and the International Union Against tuberculosis and Lung-Disease. Tal i com succeeix en la nostra sèrie, els percentatges són més elevats en pacients immigrants que en pacients autòctons (taula 40).

Taula 40: Resistència combinada a l'HSCiSP (1999–2007) per origen geogràfic dels pacients.

	Total		Autòctons		Immigrants	
	n	%	n	%	n	%
Sensible	454		372		82	
Resistència a almenys un fàrmac	43	8,7	22	5,6	21	20,3
INH	29	5,8	20	5,1	9	8,7
RMP	6	1,2	–	–	6	5,8
ETB	1	0,2	–	–	1	1,0
STR	17	3,4	4	1,0	13	12,6
PZA	6	1,2	3	0,8	3	3,0
Multiresistència	4	0,8			4	3,9

Pacients autòctons

La taxa de resistència combinada a almenys un fàrmac en pacients autòctons ha estat del 5,6%. Per a INH es troba en el 5,1%, similar al de Grècia (5,0%), Alemanya (4,8%) i Àustria (4,6%). Mentre que Portugal (6,1%) i el Regne Unit (5,8%) declaren percentatges lleugerament superiors. En condicions més favorables es troben països com França (3,9%), Bèlgica (3,4%), Holanda (3,7%) o Suïssa (1,6%). Les dades de l'informe Europeu per l'Estat Espanyol situen la resistència a l'INH en el 9 %. Molt més preocupant és la situació en els països de la ex Unió Soviètica amb valors entre el 29,1% de Lituana i el 61,6% d'Azerbaijan.

No s'ha aïllat cap soca resistent a la RIF ni a l'ETB. Varis països declaren també percentatges del 0% per ambdós fàrmacs com Xipre, Holanda, Malta, Luxemburg, Suècia i Islàndia.

La taxa de resistència per a l'STR en la nostra sèrie és del 1%, inferior a la declarada per l'Estat Espanyol (3,6%), i una de les més baixes d'Europa, que van entre el 0% a Xipre i Luxemburg i el 62,8% de l'Azerbaijan.

No s'aïlla cap soca MDR en pacients autòctons. La multiresistència declarada a l'informe Europeu és del 2,4% en l'Estat Espanyol (Les dades recollides pel GEM mostren un percentatge del 2,1 (117)) Els percentatges de multiresistència als països Bàltics es mostren al voltant del 15% i arriben al 41,8% a les regions declarants de l'antiga Unió Soviètica.

Pacients immigrants

La taxa de resistència a almenys un fàrmac combinada en pacients immigrants ha estat del 20,3%, del 8,7% per la INH, 5,8% per la RIF, 1% per l'ETB, 12,6% per l'STR del 2,9% per a la PZA i un 3,9% de MDR. Pel conjunt de l'Estat es declaren percentatges similars, lleugerament superiors, 12,3% per a la INH, 7,4% per a la RIF, 2,0% per a l'ETB 6,9% de MDR i només la STR presenta un percentatge inferior del 5,7%. També en aquets cas els percentatges són similars als declarats en els països de l'Europa Occidental, amb valors similars a França, Bèlgica, Alemanya, Anglaterra i Holanda per a la INH, la RF I l'ETB, Grècia i Alemanya per a la STR. Els països Bàltics declaren resistències molt superiors en tots els fàrmacs, tal i com succeeix amb els pacients autòctons. Els països de l'Europa de l'Est no declaren cap pacient immigrant amb tuberculosi.

4.8.2 Resistència en casos nous

El percentatge de resistència primària a almenys un fàrmac ha estat del 7,9%, més alta en pacients immigrants (16,6%) respecte als autòctons (5,7%) ($p < 0,001$). Les nostres dades de resistència primària mostren per a INH, RIF, ETB i STR percentatges del 5,4%, 0,6%, 0% i 2,9% respectivament, amb una taxa de MDR del 0,4% (Taula 41). Les dades recollides pel GEM, mostren uns percentatges de resistència primària a almenys un fàrmac del 8,3%, 4,9% per a la INH, 1,6% per a la RIF, 0,7% per a l'ETB i 0,7% per a l'STR, amb un percentatge de MDR del 1,3%.

Taula 41: Resistències als fàrmacs de primera línia en pacients nous. Període 1999–2007.

	n (%)		
	Total	Autòctons	Immigrants
Sensibles	409 (92,1)	334 (94,3)	75 (83,4)
Resistència a almenys un fàrmac	35 (7,9)	20 (5,7)	15 (16,6)
INH	24 (5,4)	18 (5,1)	6 (6,6)
RMP	3 (0,6)	–	3 (3,3)
ETB	–	–	–
STR	13 (2,9)	3 (0,8)	10 (11,1)
PZA	5 (1,1)	3 (0,8)	2 (2,2)
Monoresistència			
INH	16 (3,6)	14 (3,9)	2 (2,2)
RMP	1 (0,2)	–	1 (1,1)
EMB	–	–	–
STR	7 (1,6)	–	7 (7,7)
PZA	3 (0,7)	2 (0,5)	1 (1,1)
Multiresistència	2 (0,4)	–	2 (2,2)
INH+ RF	1 (0,2)	–	1 (1,1)
INH+RF+STR+PZA	1 (0,2)	–	1 (1,1)
Altres associacions			
INH+STR	5 (1,1)	3(0,8)	2 (2,2)
INH+PZA	1 (0,2)	1 (0,3)	–

A Europa els percentatges de resistència primària a almenys un fàrmac es troben entre els valors del 0% a Islàndia i Andorra, fins el més elevat del 49,2% de Geòrgia i 57,1% a Kazakhstan, alhora el percentatge més alt a nivell mundial. Els valors pels diferents fàrmacs són comparables als de Bèlgica (5,3%, 1,8% , 1,2%, 0%) França (6,0%, 1,4%, 0,7%, 5,1%), i lleugerament inferiors als declarats per Grècia (5,1%, 3,6%, 3,2% 8,7%) i Portugal (7,0%, 1,3%, 1,3%, 8,1%).

Taula 42: Percentatges de resistència a HSCiSP i a la ciutat de Barcelona i Catalunya per origen dels pacients nous.

	HSCiSP		Barcelona		Catalunya	
	Autòctons	immigrants	Autòctons	immigrants	Autòctons	immigrants
Resistència a						
almenys un fàrmac	5,7	16,6	5,6	19,3		
INH	5,1	6,6	3,3	12,4	6,2	7,4
RMP	-	3,3	0,9	4,6	0,6	1,8
ETB	-		0,2	0,5	0,9	1,3
STR	0,8	11,1	2,0	7,6	3,9	8,8
PZA	0,8	2,2	1,1	2,8	2,1	3,3
Multiresistència	0	2,2	0,8	4,6	nd	nd

Pacients autòctons

La taxa de resistència primària a almenys un fàrmac en pacients autòctons ha estat del 5,7%. Per l'INH ha estat del 5,1% , no s'ha aïllat cap soca resistent a la RIF ni a l'ETB i per a l'STR i la PZA ha estat del 0,8%. El GEM publica un percentatge de resistència a almenys un fàrmac del 8,2%, lleugerament superior als que es mostren a la taula 42 per a l'HSPiSC, Barcelona i Catalunya. Per a la INH, RIF, ETB i PZA els percentatges són molt similars als del Grup de Treball de Micobacteris de Barcelona (Martín Casabona i cols, dades no publicades), i per Catalunya. Per a l' STR la taxa de la nostra sèrie és inferior (0,8%) tant a la de Barcelona (2,0%) com a la de Catalunya (3,9%). La MDR a Barcelona és el 0,8%, el GEM publica un percentatge del 1,1% mentre en el nostre hospital no s'ha aïllat cap soca MDR ni XDR.

Pacients immigrants

La taxa de resistència primària a almenys un fàrmac en pacients immigrants ha estat del 16,6%. Per a la INH, la RIF, l'ETB, l'STR i la PZA del 6,6%, 3,3%, 0% ,11,1% i 2,2% respectivament. La taxa de MDR és del 2,2% (2 pacients de Nigèria i Senegal). No s'ha aïllat cap soca XDR. Les dades que es mostren en la taula 42, són força inferiors respecte a les declarades a Barcelona, probablement degut al tipus de població immigrant del nostre centre (taula 43).

Resultats i discussió

Taula 43: Països d'origen dels pacients immigrants i percentatges de resistència a l'HSCiSP i cadascun dels països d'origen.

Regions epidemiològiques de la OMS	N (%)			Percentatges publicats (18, 247)			
	TOTAL	Primària	adquirida	QUALSEVOL FÀRMAC		MDR ESTIMADA*	
				PRIMÀRIA	ADQUIRIDA	PRIMÀRIA	ADQUIRIDA
AMERICA LLATINA							
ARGENTINA	3			10	25	2,2	15,4
BOLIVIA	14	1		25,5	41,1	1,2	4,7
BRASIL	3			8,6	14,4	0,9	5,4
COLOMBIA	5			15,5		1,5	9,7
CUBA	1			7,1	36,8	0	5,3
DOMINICANA	1		1	40,6	52,1	6,6	19,7
ECUADOR	8	2		20,1	43,8	4,9	24,3
EL SALVADOR	1			5,7	22	0,3	7,0
HONDURAS	1	1		12	38,4	1,8	12,3
PERU	22	6 (28,6)	1 (100)	23,2	41,7	5,3	23,6
URUGUAI	3			2,1	9,1	0,0	6,1
VENEZUELA	1			7,5	30,8	0,5	13,5
XILE	2	1	1	10,5	19,9	0,7	3,8
SUD EST ASIÀTIC							
INDIA	2			5,3-27,9	ND	2,8	17,2
PACIFIC OEST							
FILIPINES	2			20,5	37,2	4,0	20,9
HONGKONG	1			11,1	23,3	0,9	8,0
XINA	1			13-42,1	35,1-70,1	5,0	25,6
AFRICA AMB ALTA PREVALENCIA DE HIV							
CAMERUN	1				ND	1,7	8,5
GUINEA	1			14,7	50	2,3	28,1
NIGERIA	2	1			ND	1,9	9,3
EUROPA CENTRAL							
RUMANIA	2					2,8	11,0
GEORGIA	2					6,8	27,4
XIPRE	1			22,7	20	1,1	9,6
EST DEL MEDITERRANI							
MARROC	8		1	7,0	20,4	0,5	12,2
PAKISTAN	4				ND	3,4	36,5
AFRICA AMB BAIXA PREVALENCIA DE HIV							
ANGOLA	1				ND	2,0	3,2
GANHA	1				ND	1,9	2,2
SENEGAL	3	1		10,5	31,0	2,1	3,6
ECONOMIA DE MERCAT ESTABLERTA* per USA Dades declarades 1999-2002,(18).							
ANDORRA	1	1		11,1	0	0	10,4
FRANÇA	1			8,7	21,4	1,1	7,1
GRAN BRETANYA	1			7,1	9,2	0,7	2,6
ITALIA	3			9,7	36,7	1,6	17,7
USA	1			12,0	18,8	1,1*	5,2*

El fet que pel conjunt de Catalunya els immigrants amb més representació provinquin del Marroc, on la taxa de resistència és més significativament més baixa respecte als països d'Amèrica Llatina, fa que els percentatges de resistència per al conjunt del país siguin més baixos(15, 76).

Les dades publicades pel GEM donen un percentatge del 12% en resistència a almenys un fàrmac i del 3,6% de MDR (117).

4.8.3 Resistència en pacients prèviament tractats

Les dades de la nostra sèrie en pacients prèviament tractats són difícilment avaluable per la seva poca entitat ja que els nombres absoluts són baixos, tot i que no deixen de representar el que tenim en el nostre entorn i per tant cal tenir en compte a l'hora de tractar de forma individual cadascun dels pacients diagnosticats.

Taula 44: Resistències als fàrmacs de primera línia en pacients prèviament tractats. Període 1999–2007.

	Total	n (%)	
		Autòctons	Immigrants
Sensibles	45 (84,9)	38 (95)	7 (53,8)
Resistència a almenys un fàrmac	8 (15,1)	2 (5)	6 (46,2)
INH	5 (9,4)	2 (5)	3 (23,1)
RMP	3 (5,6)		3 (23,1)
ETB	1 (1,8)		1 (7,7)
STR	4 (7,5)	1 (2,5)	3 (23,1)
PZA	1(1,8)		1 (7,7)
Monoresistència			
INH	2 (3,7)	1 (2,5)	1 (7,7)
RMP			
EMB			
STR	2 (3,7)		2 (15,4)
PZA			
Multiresistència	2 (3,7)		2 (15,4)
INH+ RF	1 (1,8)		1 (7,7)
INH-F-RIF-ETB+PZA	1 (1,8)		1 (7,7)
Altres associacions			
INH+STR	1(1,88)	1 (2,5)	
STR+RF	1(1,88)		1(7,7)

El percentatge de resistència adquirida a almenys un fàrmac és del 15,1%, essent la INH la més freqüent (9,4%) seguida de la STR (7,5%), la RIF (5,6%), l'ETB i la PZA (1,8%). S'ha aïllat un 3,7% de soques multiresistents corresponents a dos pacients originaris de la República Dominicana i Perú. La resistència a almenys un fàrmac ha estat significativament més elevada en pacients immigrants (46,2%) que en els autòctons (5%) ($p=0,008$). No s'ha aïllat cap soca XDR. En l'estudi del GEM les dades de multiresistència no diferencien entre pacients immigrants i autòctons, donant una taxa de MDR adquirida a almenys un fàrmac del 12,5%.

Pacients autòctons

El percentatge de resistència a almenys un fàrmac adquirida en pacients autòctons és del 5%, per sota del que observa pel conjunt de la ciutat de Barcelona del 9,7%, i molt allunyat del 30,8% que es declara en el recull per l'any 2006 del GEM (117). No s'ha aïllat cap soca MDR ni XDR.

Pacients immigrants

La taxa de resistència adquirida a almenys un fàrmac en pacients immigrants en la nostra sèrie és del 46,2% respecte al 35,9% de la ciutat de Barcelona i del 32% per a tot l'Estat Espanyol. El petit nombre de malalts immigrants amb tractament previ fa difícil avaluar els percentatges observats.

S'han aïllat dues soques MDR, el que representa un percentatge del 15,4% inferior a la publicada pel conjunt de la ciutat del 20,5%.

La presència de soques MDR només en pacients immigrants sembla que confirma la hipòtesi que la tuberculosi procedent de països amb alta incidència, afecta poc als països amb baixa incidència sempre que es prenguin les mesures de control adequades (62)

Taula 45: Percentatges de resistència a HSCISP i a la ciutat de Barcelona per origen dels pacients prèviament tractats.

	HSCISP		BCN	
	Autòctons.	immigrants	Autòctons.	immigrants
Resistència a almenys un fàrmac	5	46,2	9,7	35,9
INH	5	23,1	7,8	25,6
RMP	-	23,1	3,0	23,1
ETB	-	7,7	1,1	12,8
STR	1,1	23,1	2,6	20,5
PZA	-	7,7	1,9	15,4
Multiresistència	-	15,4	3,0	20,5

A nivell mundial, en pacients prèviament tractats no s'ha declarat resistència a Islàndia, Israel i Noruega, i en 16 zones s'han declarat percentatges superiors al 50% entre ells Bakú (Azerbaijan) i Tashkent (Uzbekistan) que mostren taxes de resistència de 84,8% i 85,9% respectivament. Les taxes de MDR òbviament mostren els valors més elevats en els països on les taxes de resistència són més altes, arribant al 60% a Tashkent (Uzbekistan) (247).

4.8.4 Tendències en els percentatges de resistència

S'ha dividit el període arbitràriament en dos per tal de analitzar les tendències en els percentatges de resistència, el primer període de l'any 1999 al 2003, amb 297 pacients (89,56% de casos nous) i el segon entre els anys 2004 i 2007 amb 200 pacients (89% de casos nous) (taules 46 i 47).

Taula 46: Percentatges de resistència als fàrmacs de primera línia en casos nous en els períodes 1999–2003 i 2004–2007.

	total		autòctons		immigrants	
	1999–2003	2004–2007	1999–2003	2004–2007	1999–2003	2004–2007
Resistència a almenys un fàrmac	8.65	6.7	6	5	20	12.5
INH	5.6	5.1	5.1	5	8	5
RIF	0.8	0.6	0	0	4	2.5
ETB	0	0	0	0	0	0
STR	3.8	1.7	0.9	0.7	16	5
PZA	0.8	1.1	0.9	0.7	2	2.5
MDR	0.8	0	0	0	4	0

Taula 47: Percentatges de resistència als fàrmacs de primera línia en pacients prèviament tractats en els períodes 1999–2003 i 2004–2007.

	total		autòctons		immigrants	
	1999–2003	2004–2007	1999–2003	2004–2007	1999–2003	2004–2007
Resistència a almenys un fàrmac	12,9	18,2	7,4	0	50	44,4
INH	9,7	9,1	7,4	0	25	22
RIF	6,4	4,5	0	0	50	11
ETB	0	4,5	0	0	0	11
STR	6,4	9,1	3,7	0	25	22
PZA	0	4,5	0	0	0	11
MDR	3,2	4,5	0	0	25	11

No s'han observat diferències significatives en la tendència entre els dos períodes analitzats en la resistència a almenys un fàrmac ($p=0,46$), ni en cap dels fàrmacs de manera individual.

A la ciutat de Barcelona (Martín Casabona i cols., dades no publicades) la tendència entre els anys 1995 i 2003 mostra només un augment significatiu en la resistència a la STR, fet que ja es contemplava en les dades de la tendència mundial acumulades de 1994 a 2002 en el treball realitzat per la *International Union Against Tuberculosis and Lung disease Global Project on Anti-tuberculosis Drug resistance Surveillance* (18). Aquests augment es detecta en el total de pacients prèviament tractats de la nostra sèrie, del 6,45% en el primer període al 9,09% en el segon, tot i que no és significativa. L'informe esmentat dóna dades de la ciutat de Barcelona (única comunitat de l'estat Espanyol que aporta dades) on la tendència en resistència a almenys un fàrmac es mostra estable.

L'informe mundial on l'OMS analitza les tendències en resistència a almenys un fàrmac, a la INH i de MDR en els 50 països que han subministrat dues o més dades entre el 1994 i 2007 on es mostren diferents escenaris:

- ❖ Tendència decreixent: USA i Hong Kong tant en MDR com en el nombre de tuberculosi. A Hong Kong també s'ha observat davallada en la resistència a almenys un fàrmac en tots el casos i en la resistència a la INH i la MDR en casos nous. Dinamarca també mostra un descens significatiu en la resistència a almenys un fàrmac primària i combinada. I Puerto Rico mostra davallada en resistència a almenys un fàrmac i MDR en resistència combinada, com també succeeix a Singapur.
- ❖ Tendència estable: Els països Bàltics mostren una tendència estable en MDR en casos nous a Estònia i Letònia, a l'hora que un descens en les notificacions de pacients amb tuberculosi. La majoria de països amb baixa prevalença de tuberculosi mostren tendències fluctuants no significatives degut a la seva baixa càrrega global de tuberculosi. Malgrat això alguns d'aquest països com Alemanya, Regne Unit, Canada, Austràlia, França, Cuba, Portugal, Nova Zelanda i Espanya declaren alguns casos de MDR, tot i que en petit nombre.
- ❖ Tendència a l'alça: Els Oblast de Orel i Tomsk a la federació Russa, mostren augments significatius en el percentatge de MDR en casos nous com en el nombre absolut de casos de MDR-TB. També s'observa un increment en la resistència a la INH encara que no significatiu. La República de Corea i Perú mostren un increment en el nombre de MDR, resistència a almenys un fàrmac i resistència a l'INH en casos nous.

El seguiment mundial mostra una proporció baixa de resistència a almenys un fàrmac i MDR a l'Oest i Centre Europa, seguit per l'Àfrica i Amèrica. Les regions de l'Est d'Europa segueixen declarant els percentatges més elevats de resistència a almenys un fàrmac i per a tots els fàrmacs de primera línia.

4.9 Comparació del sistema MB/Bact ALERT i BACTEC MGIT 960 amb el sistema radiomètric BACTEC 460TB per l'estudi de la sensibilitat de *M. tuberculosis* a la INH, la RIF, l'ETB i l'STR (93)

En aquest estudi es va pretendre l'avaluació de dos sistemes automatitzats no radiomètrics, comparant-los de forma independent amb el sistema BACTEC 460TB. Es va avaluar la seva capacitat per a l'estudi de la sensibilitat o resistència als fàrmacs de primera línia isoniazida, rifampicina, etambutol i l'estreptomicina utilitzant 82 soques de l'arxiu del Grup de Treball de Micobacteris de Barcelona les quals eren considerades pel sistema BACTEC 460TB com: 49 resistents a la INH, 14 a la RIF, 12 a l'ETB i 19 a l'STR.

La determinació de la sensibilitat mitjançant els mètodes MB/Bact ALERT, BACTEC MGIT 960 i BACTEC 460TB es realitzà seguint els protocols d'instruccions dels fabricants descrites a l'apartat de material i mètodes, utilitzant les concentracions crítiques citades a la taula 49 per a cada antibiòtic i per els diferents sistemes.

Taula 49: Concentracions crítiques ($\mu\text{g/ml}$) utilitzades.

Fàrmac	MB/Bact	MGIT 960	BACTEC 460 TB
Isoniazida	0,1	0,1	0,1
Rifampicina	1	1	2
Etambutol	5	5	7,5
Estreptomicina	1	1	6

En altres estudis publicats sobre aquests sistemes les discrepàncies es varen resoldre mitjançant la reanàlisi amb els dos mètodes (126) o bé comparant amb el mètode de les proporcions en medi sòlid, ja sigui en Löwenstein-Jensen (14, 27, 28, 233) o en Middelbrook 7H11 agar (200). Aquest estudi és l'únic que, a més de la reanàlisi de les soques implicades en tots els sistemes emprats, determina la CIM dels antibiòtics discrepants, i la caracterització molecular de les mutacions conegudes que, de forma més freqüent, determinen resistència a la isoniazida, rifampicina i etambutol. Les dianes per a la isoniazida foren el codó 315 del gen *katG* i la regió reguladora *mabA-inhA*, per a la rifampicina els 81 pb de la regió central del gen *rpoB* i per a l'etambutol

el codó 306 del gen *embB*. Finalment en els cas de discrepàncies no resoltes es van definir els errors majors (falsa sensibilitat) i menors (falsa resistència) en cadascun dels sistemes. La concordança es va definir com el coeficient d'acord entre els resultats de MB/BacT o BACTEC MGIT 960 i el mètode BACTEC 460TB. L'índex de concordança (IC) entre els resultats es calculà amb l'anàlisi qualitativa *Kappa de Cohen*.

El temps promig final per a l'obtenció dels resultats en el sistema BACTEC MGIT 960 fou de 13,3 dies, respecte als 8,2 del sistema MB/BacT i els 10.6 dels sistema BACTEC 460TB. Els resultats inicials obtinguts per cadascun dels sistemes es recullen a la taula 50.

Taula 50: Resultats inicials sense resolució de les discrepàncies.

Sistema i fenotip	BACTEC 460TB								
	INH		RIF		ETB		STR		
	R	S	R	S	R	S	R	S	
MB/BacT	R	47	2	14	1	9	0	12	0
	S	1	32	0	67	3	70	6	64
MGIT 960	R	45	0	14	1	11	0	17	3
	S	3	34	0	67	1	70	1	61

Resultats inicials

BACTEC MGIT 960 versus BACTEC 460TB: s'observaren discrepàncies en 9 de les 82 soques. Cinc presentaren falsa sensibilitat; tres per a la INH; una per a l'ETB; i una per a l'STR. Quatre falses resistències; una per a la la RIF i 3 per a la l'STR.

MB/BacT versus BACTEC 460TB: s'observaren discrepàncies en 13 de les soques. Deu presentaren falsa sensibilitat; una per la INH; tres per a l'ETB i sis en el cas de la STR. En tres soques es detectà falsa resistència; dues per a la INH i una per a la rifampicina.

Resultats i discussió

Taula 51: resolució dels resultats discrepants dels sistemes MB/BacT i Mgit amb el sistema BACTEC 460TB .

fàrmac	soca	Resultat en:			CIM (µg/ml)	Caracterització molecular	Categorització final	Conclusió
		BACTEC 460TB	MB/BacT	BACTEC MGIT 960				
H	058R	R	R	S	0,125	<i>katG</i> , soca salvatge; <i>mabA-inhA</i> soca salvatge	R	Falsa sensibilitat per a MGIT; error major. La CIM es troba prop de la concentració crítica utilitzada.
	009R	R	R	S	0,25	<i>katG</i> , Trp728Tyr; <i>mabA-inhA</i> soca salvatge	R	Falsa sensibilitat per a MGIT; error major. La CIM es troba prop de la concentració crítica utilitzada.
	059R	R	S	S	1	<i>katG</i> , soca salvatge;; <i>mabA-inhA</i> soca salvatge	R	Falsa sensibilitat para MB/BacT i MGIT; error major.
	04/017	S	R	S	<0,05	<i>katG</i> , soca salvatge; <i>mabA-inhA</i> soca salvatge	S	Falsa resistència para MB/BacT; error menor.
	03/025	S	R	S	<0,05	<i>katG</i> , soca salvatge; <i>mabA-inhA</i> soca salvatge	S	Falsa resistència para MB/BacT; error menor.
R	078R	S	S	R	1	<i>rpoB</i> , Leu533Pro	R	La CIM justifica els resultats obtinguts por les tres tècniques La mutació detectada s'ha trobat en sensibles i resistent(223).
	VH10241	S	R	S	1	<i>rpoB</i> , Asp516Tyr	R	La CIM justifica els resultats obtinguts por les tres tècniques. La mutació detectada pot donar resistències de baix nivell (184).
E	VH10949	R	S	S	4	<i>embB</i> , soca salvatge	S	Soca veritablement sensible. Error menor per a BACTEC 460TB.
	VH8552	R	S	R	4	<i>embB</i> , soca salvatge	S	Falsa resistència per a MGIT i BACTEC 460TB; error menor.
	VH9511	R	S	R	8	<i>embB</i> , soca salvatge	R	Falsa sensibilitat per al MB/BacT; error major.
S	058R	S	S	R	0,5		S	Falsa resistència per MGIT; error menor
	006R	R	R	S	8 ^a		R	.Falsa sensibilitat per a MGIT; error major
	019R	R	S	R	8		R	
	062R	R	S	R	8		R	
	VH10241	R	S	R	8		R	
	03/033	R	S	R	8		R	Falsa sensibilitat per a MB/BacT; error major
	080R	R	S	R	8		R	
	082R	R	S	R	>8		R	
	017R	S	S	R	8		R	Veritable resistent per a MGIT i falsa sensibilitat
	018R	S	S	R	>8		R	per a MB/BacT i BACTEC 460TB; error major

^a La CIM de S en soques sensibles es troba entre 2 i 8 µg/ml

A la taula 51 es mostra l'anàlisi conjunta en les 20 soques (24,39%) en les que es van detectar discrepàncies persistents entre algun dels dos sistemes i el de referència. Es pot observar el resultat final en cadascun dels sistemes després de la reanàlisi de la sensibilitat, la CIM de la soca per a cada un dels antibiòtics i la caracterització molecular per a la INH, la RIF i l' ETB, on amb totes les dades a la mà, es va poder donar una categorització final respecte a la sensibilitat o resistència per a cada una de les soques discrepants. En alguns dels casos va caldre reconsiderar alguns dels resultats, del sistema de referència BACTEC 460TB. La categorització final va confirmar el resultat en 14 soques per a BACTEC 460TB, en 3 en el sistema MB/BacT i en 4 en sistema BACTEC MGIT 960.

Resolució de discrepàncies per fàrmac

❖ **Isoniazida:**

Després de la resolució de les discrepàncies no es van observar canvis en la categorització inicial pel mètode BACTEC 460TB.

BACTEC MGIT 960: va cometre tres errors majors. Dos d'ells en soques amb CIM de 0,125 µg/ml i 1 µg/ml, sense cap mutació de les estudiades i l'altre en una soca amb una CIM de 0,25 µg/ml i una mutació al gen *katG* (Trp728Tyr).

Dues de les CIM eren molt properes a la concentració crítica utilitzada (0,1 µg/ml), i això podria explicar l'aparició de discrepàncies quan es fan estudis en dos sistemes diferents. Estudis anteriors que comparaven ambos sistemes mostraren resultats molt similars (2, 14, 28, 200, 233)

MB/BacT Alert : va cometre un error major i dos errors menors.

Una de les soques presentava una CIM de 1 µg/ml i les altres dues CIM <0,05 µg/ml. Cap de les tres soques va presentar mutacions en les regions estudiades.

La falsa sensibilitat a la INH determinada per MB/BacT ALERT amb el sistema BACTEC 460 de referència ja ha estat descrita anteriorment (41, 234), tot i que no es tracta d'una troballa freqüent. Els dos errors menors observats etiqueten com inefectiva una droga important que podria ser utilitzada amb èxit, tot i que

és considerat com a un problema menor respecte a la falsa sensibilitat, aquests resultats representen un desavantatge seriós, i poden portar a un fracàs del tractament antituberculós (177).

❖ **Rifampicina**

BACTEC MGIT 960: Va considerar resistent la soca VH10241, considerada sensible pel BACTEC 460 i MB/BacT ALERT amb una CIM de 1 µg/ml i amb la mutació al gen *rpoB* Asp516Tyr.

MB/BacT ALERT: Va considerar resistent la soca 078/R, considerada sensible pel BACTEC 460 i pel MGIT 960 amb una CIM de 1 µg/ml i amb la mutació al gen *rpoB* Leu533Pro.

La CIM per a la RIF considerada com a bactericida per a les soques salvatges *M. tuberculosis* és 0,5 µg/ml (250), així les dues soques han estat finalment considerades com a resistents. Canviant doncs la categorització inicial de sensible a resistent.

❖ **Etambutol**

La CIM per a dues de les soques inicialment considerades resistents a l'ETB en BACTEC 460TB fou de 4 µg/ml, per tant segons aquest criteri cal considerar-les sensibles, canviant doncs la categorització inicial del BACTEC 460TB. D'altra banda, la CIM de la tercera soca discrepant fou de 8 µg/ml, tot i no presentar cap mutació a la regió estudiada, fou considerada resistent.

BACTEC MGIT 460: inicialment va cometre un error major i un error menor, però la categorització final de les soques després de la resolució de les discrepàncies va resoldre l'error major deixant finalment els resultats en un error menor.

Diversos estudis on s'avalua el sistema BACTEC MGIT 960, l'ETB ha estat el fàrmac amb la menor concordança dels antibiòtics de primera línia (2, 28, 233), en el nostre estudi la concordança ha estat bona.

MB/BacT ALERT: Inicialment va presentar 3 errors majors, dos es van resoldre deixant-ho en un de sol.

La concentració crítica final per a l'etambutol en el sistema MB/BacT ha estat modificada força vegades pel fabricant. En una sèrie de 115 soques Brunello i Fontana (41) van descriure 5 errors menors amb 2,5 µg/ml com a concentració crítica (72). En una altra sèrie de 36 soques varen descriure tres errors majors i 5 errors menors amb una concentració crítica de 2 µg/ml. Aquests resultats van conduir a la modificació de la concentració fins a 3,5 µg/ml. Utilitzant aquesta concentració, Bermer i altres no trobaren falses resistències i cap increment en el nombre de falses susceptibilitats (un error major en una sèrie de 166 soques) (27). Malgrat això, el fabricant va tornar a modificar la concentració crítica fins a 5 µg/ml, concentració a la que es va fer aquest estudi.

❖ Estreptomicina

La CIM per a dues de les soques inicialment considerades sensibles a l'STR en el sistema BACTEC 460TB fou ≥ 8 µg/ml, reconsiderant doncs les soques com a resistents. El sistema BACTEC MGIT 960, va cometre un error major i un error menor i el MB/BacT ALERT, va cometre 8 errors majors.

Índex i percentatges de concordança

A la taula 52 es recullen els percentatges i índex de concordança per a cadascun dels sistemes avaluats després de la resolució de les discrepàncies.

Taula 52: Valors dels sistemes MB/BacT i MGIT després de la resolució de les discrepàncies.

Fàrmac	Sistema MB/BacT		Sistema MGIT 960	
	%	IC Kappa	%	IC Kappa
Isoniazida	96,3	0,924	96,3	0,926
Rifampicina	98,8	0,960	98,8	0,960
Etambutol	98,8	0,940	98,8	0,945
Estreptomicina	90,2	0,694	90,2	0,934

IC: índex de concordança, <0 sense acord, 0–0,2 insignificant, 0,2–0,4 baix, 0,4–0,6 moderat, 0,6–0,8 bo, 0,8–1 molt bo.

BACTEC MGIT 960

El nivell de concordança entre el BACTEC MGIT 960 i els resultats en BACTEC 460TB fou del 97,2%. De 96,3% per a la INH (valor Kappa 0,926), 98,8% per a la RIF (valor Kappa 0,960), 98,8% per a l'ETB (valor Kappa 0,945) i 97,5% per a la STR (valor Kappa 0,934). En resum, el sistema MGIT 960 va cometre 5 errors majors (tres per a la INH, un per a la RIF i un per a l'STR) i dos errors menors (un per a l'ETB i un per a l'estreptomicina). El percentatge obtingut de falsa sensibilitat per a la STR es correspon amb la majoria d'estudis trobats a la literatura, que presenten resultats similars al del present estudi (14, 28, 200, 233).

Les diferències metodològiques podrien explicar algunes de les discrepàncies. En altres estudis s'ha suggerit que el fet que per a la inoculació dels vials en el mètode BACTEC MGIT 960 s'utilitzin pipetes enlloc de xeringues d'agulla fina pugui facilitar agafar grumolls de micobacteris, el que fa que l'estandardització de l'inòcul sigui més difícil (177). Aquestes diferències metodològiques ho podrien explicar si afectessin a l'estudi de tots el fàrmacs, però no és el cas dels resultats obtinguts. Per altra banda, les concentracions utilitzades per a l'estudi de cada antibiòtic en MB/Bact i MGIT 960 són idèntiques i diferents a les que utilitza el sistema BACTEC 460TB, més altes excepte en el cas de la INH.

MB/BacT ALERT

El nivell total de concordança entre els resultats del MB/BacT i els obtinguts amb BACTEC 460TB ha estat del 96%. De 96,3 % per la INH (valor Kappa 0,924), 98,8% per a la RIF (valor kappa 0,960), 98,8% per a l'ETB (valor kappa 0,940) i 90,2% per a l'STR (valor kappa 0,694). En resum, el sistema avaluat MB/BacT ALERT va cometre 11 errors majors (1 per INH, RIF i ETB i 8 per a la S) i 2 errors menors (INH). Els valors per a la INH, la RIF i l'ETB han estat acceptables. El nivell per a l'STR és considerablement més baix que les sèries publicades en altres estudis que es situen en valors entre el 95 i el 100% (27, 41). Cap de les dades complementàries que s'han avaluat poden explicar aquets resultats per a l'STR i es pot especular que al realitzat tots els tests amb el

mateix lot d'antibiòtic rebut de la casa comercial, fos un problema concret del lot facilitat per a l'estudi.

En resum, els sistemes MB/BacT i BACTEC MGIT 960 són una bona alternativa per als test de sensibilitat als fàrmacs de primera línia. El major avantatge d'ambdós mètodes és l'automatització, que comporta una menor laboriositat que el BACTEC 460TB, la monitorització continua i la no utilització d'isòtops radioactius.

4.10 Avaluació del sistema MB/BacT per a l'estudi de sensibilitat a la PZA amb el sistema BACTEC 460TB com a sistema de referència (13)

Els estudis de sensibilitat a la PZA in vitro requereixen pH àcid per a que aquesta sigui activa. Aquets és un dels problemes fonamentals en els sistemes d'estudi de sensibilitat ja que el pH àcid redueix sensiblement la capacitat de creixement dels micobacteris. El sistema BACTEC 460TB (semiautomàtic i amb isòtops radioactius) està essent utilitzat com a vàlid des de fa 20 anys per a molts laboratoris com a mètode ràpid per al test de la PZA per a *M. tuberculosis* complex. Els sistema MB/BacT és un sistema d'aïllament no radiomètric automàtic, inicialment es va dissenyar per l'estudi de sensibilitat a STR INH, RIF i ETB però recentment s'ha desenvolupat la possibilitat d'acidificar els vials de creixement permetent l'estudi de sensibilitat a la PZA. La majoria (72% a 97%) de soques resistents a la PZA mostren mutacions en el gen *pncA* o en la seva regió promotora, que els fa perdre l'activitat pirazinamidasa (23, 213). Per a l'avaluació es van seleccionar 50 soques de *M. tuberculosis* de la col·lecció de cultius del Grup de Treball de Micobacteris de Barcelona. Segons el mètode radiomètric BACTEC 460TB, 30 d'aquestes soques havien estat prèviament considerades sensibles a la PZA, i 20 resistents totes elles amb mutacions en el gen *pncA* (taula 53).

Taula 53: *pncA* mutacions de soques PZA resistents.

Soca	Mutació <i>pncA</i>	Soca	Mutació <i>pncA</i>
118r	T359G	285r	A-11G
184r	A23G	301r	A-11G
209r	Deleció C103 nt	238r	T104C
210r	A502C	254r	A226C
212r	Deleció C361 nt	310r	C28A
216r	A29C	322r	T417G
218r	Inserció	44r	G203T
225r	Deleció 375-383 nt	48r	T104C
233r	A-11G	92r	C161T
262r	A-11G	99r	G136C

La determinació de la sensibilitat mitjançant els mètodes MB/BacT ALERT i BACTEC 460TB es realitzà seguint les instruccions dels protocols dels fabricants descrites a l'apartat de material i mètodes. Com a control de qualitat es van incloure les soques de *M. tuberculosis* H37rv (ATCC 27294) sensible a la PZA i *M. bovis* BCG (ATCC 3545) resistent a la PZA en cadascuna de les sèries i en ambdós mètodes.

Quan es va observar un discrepància entre els dos mètodes o no s'acomplien els criteris de validació es repetiren els estudis en ambdós dels sistemes.

No es van detectar problemes tècnics a l'hora de la realització de cap dels dos sistemes, només fou necessària la reanàlització en tres soques, dues a causa de no detectar creixement en el test amb BACTEC 460TB i l'altre per no seguir el criteris de validació en el sistema MB/BacT. El percentatge de concordança fou del 100 % entre els dos sistemes. Altres treballs publicats prèviament mostres resultats similars (24, 27, 209). Cal destacar que aquets és el primer estudi amb el kit comercial.

El temps necessari des de la preparació de l'inòcul fins al resultat final fou de 13,87 dies per al sistema MB/BacT ALERT i de 12,39 per al sistema BACTEC 460TB. El temps necessari per a l'obtenció de l'antibiograma des de la seva inoculació ha estat de 6,69 dies per a MB/BacT i 8,7 dies per a BACTEC 460TB. L'automatització del sistema MB/BacT i la no utilització d'isòtops radioactius fa que el sistema sigui una bona alternativa al BACTEC 460TB.

4.11 Estudi de resistència als fàrmacs de segona línia

L'aïllament en els últims anys de soques de *M. tuberculosis* resistents a tots els fàrmacs de primera línia i a pràcticament a tots els de segona línia, representa una amenaça per a la salut pública i dificulta extraordinàriament el tractament dels casos de tuberculosi en els que s'aïllen aquestes soques (48). Una conseqüència clínica de la resistència és la dificultat afegida pel canvi que s'origina en la pauta terapèutica a la que s'han d'incorporar fàrmacs de segona línia, ja que incrementa de manera important tant el cost com la toxicitat. La taxa de resistència que s'observa en les diferents zones del planeta té relació directa amb les pautes de tractament instaurades en cada zona i el seu compliment.

El desconeixement de la realitat dels fàrmacs de segona línia en el nostre entorn, feu que l'any 2000 ens plantegéssim fer durant un període (un any i 4 mesos) l'estudi de sensibilitat a alguns d'aquests fàrmacs a totes les soques de *M. tuberculosis* complex aïllades al nostre centre. Posteriorment i fins l'actualitat, l'estudi ha continuat només en aquelles soques que presenten alguna resistència als fàrmacs de primera línia.

L'estudi de sensibilitat als fàrmacs de segona línia i la CIM a la INH es fa mitjançant el mètode radiomètric BACTEC 460TB, descrit a l'apartat 3.7.1 de material i mètodes. La interpretació dels resultats es fa d'acord als criteris establerts per a la determinació de sensibilitat i resistència en el mètode radiomètric, essent el mateix que pels fàrmacs de 1era línia (71, 163, 172).

Els antituberculosos estudiats són l'etionamida, la capreomicina, la kanamicina, l'amikacina, l'ofloxacina, la clofacimina i la rifabutina.

S'ha fet estudi de sensibilitat a un total de 136 aïllaments de *M. tuberculosis* complex. En el primer període (gener de 2000 a abril de 2001) s'analitzaren 88 aïllaments consecutius i en el segon període (maig 2001 a desembre de 2007) 22 aïllaments amb algun tipus de resistència als fàrmacs de primera línia. Catorze dels pacients havien estat tractats prèviament, i 120 eren pacients nous. En 2 pacients no es va poder

recollir aquesta dada. El 84% dels pacients eren autòctons i el 16% immigrants, dels quals 12 eren llatinoamericans, 7 africans, 2 europeus i un del Sud-est Asiàtic.

Totes les soques sensibles als antituberculosos de primera línia també ho foren als de segona. Dels 30 aïllaments resistents (8 del primer període i 22 del segon), 24 (80%) ho foren a la INH, 10 (33.3%) a la STR, 5 (16,6 %) a la PZA, 4 (13.3%) a la RIF, i 1 (3,3%) a l'ETB. Dels fàrmacs de segona línia estudiats 10 (33.3%) soques vAren ser resistents a la ETH i 3 (12,5%) a la RB.

Taula 48: soques de *M tuberculosis* complex amb estudi de sensibilitat als fàrmacs de segona línia.

Pacients nous	n= 120	CIM INH
Sensible	96	
INH	5	0,2-12,8
INH+ ETH	7	≤ 0,4
INH + STR	4	1,25-6,4
INH+RIF+STR+ PZA	1	>12,8
INH+RIF+ETH+ RB	1	0,2
INH+ETH+PZA	1	>12,8
STR	2	
RIF+ RB	1	
PZA	1	
<hr/>		
Pacients prèviament tractats	14	CIM INH
Sensible	8	
STR	2	
INH	2	>12,8
INH+STR	1	>12,8
INH+RIF+ETB+PZA+ETH+RB	1	>12,8
<hr/>		
Antecedents tractament desconegut	2	CIM INH
Sensible	1	
INH+ETH+PZA	1	>12,8

El 100% de les 11 soques resistents a la Etionamida presenten resistència creuada a la INH de les quals el 72,3% tenien una CIM a la INH inferior a 0,4 µg/ml (resistència de baix nivell). S'ha pogut fer la caracterització molecular en 4 de les 11 soques i en totes elles s'ha detectat la mateixa mutació a la regió reguladora dels gens *mabA-inhA*, el canvi d'una citosina per una timina en la posició -15. Segons Banerjee i cols. Les mutacions en els gens *inhA*, *mabA* o a la regió reguladora confereixen resistència

creuada a la isoniazida i etionamida en soques de *M. tuberculosis*, *M. bovis* i *M. smegmatis* (22).

En la nostra sèrie el 75% de les soques resistents a la RIF tenen resistència creuada amb la RB. Dins de les rifamicines, la rifabutina es considera un fàrmac de segona línia. Al voltant del 80% de les soques resistents a la rifampicina presenten resistència creuada amb la rifabutina (55, 184). Esta àmpliament descrit a la bibliografia que les mutacions als codons 526 i 531 confereixen resistència d'alt nivell a la rifampicina i resistència creuada amb la rifabutina, la rifapentina i el rifalacil. Es disposa de la caracterització molecular de les soques resistents a la RIF i les soques que presenten resistència creuada amb la rifabutina i totes elles han mostrat la mateixa mutació, Ser531Leu. La soca RIF resistent RB sensible mostra una mutació al codó 516 substituint una Asp per una Val, que es correspon amb el descrit a la bibliografia (11, 184).

No s'ha trobat cap soca resistent a la STR amb resistència associada a altres aminoglicòsids, encara que Di Pierri i cols., afirmen que la resistència a la STR pot presentar associada la resistència a la kanamicina però no a l'amikacina i la capreomicina (71).

No s'ha aïllat cap soca XDR-TB. El percentatge d'aïllaments de soques XDR-TB a la ciutat de Barcelona és baix, el Grup de Treball de Micobacteris de Barcelona durant el període 1994-2003 n'ha detectat 2. (Martín Casabona i al. Dades no publicades). Un estudi multicètric de tretze laboratoris de la xarxa de Supranacional Reference laboratories (SRL), han participat en la recollida de dades de resistència als fàrmacs de primera i segona línia de tots els aïllaments de *M. tuberculosis* durant el període 2000-2004, cobrint 79 països (204). L'estudi mostra uns percentatges de resistència de 8,7% pels aminoglicòsids diferents de l'amikacina i la kanamicina, 4,5% per a la capreomicina, 5,3% per a les fluoroquinolones (ofloxacina, ciprofloxacina, levofloxacina i moxifloxacina), 10,8% per a les tionamides (prothionamida i etionamida), 2,6% per a la Cicloserina i un 7,3% pel PAS. De les soques multiresistents, el 48,8% presentaven també resistència a almenys un fàrmac de segona línia. Els

patrons més comuns han estat la resistència als aminoglicòsids amb un 18,3%, les fluoroquinolones amb un 19,3% i les tionamides amb un 19,3% . El 9,9% de les soques multiresistents van resultar ser XDR. La XDR-TB és un indicador indirecte d'un diagnòstic i tractament inadequat, on hi poden intervenir varis factors:

- ❖ monoteràpia no intencionada per interaccions entre fàrmacs o malabsorció, poca adherència al tractament.
- ❖ errades en la supervisió de l'acompliment del tractament.
- ❖ limitat subministrament i/o baixa qualitat dels fàrmacs.
- ❖ pobres o inexistentes polítiques nacionals de recolzament als *Programes Nacionals de Control* de la tuberculosi.

El percentatge global de soques multiresistents del nostre laboratori en el període 1999–2007 ha estat del 0,8%, per sota del 1,3% declarat pel conjunt de Catalunya l'any 2006, i el 1,8% en l'estudi del Grup de Treball de Micobacteris de Barcelona (15).

L'OMS publica a l'informe del 2008 una MDR-Tb del 5,3%, destacant el 22,3% de Bakú a l'Azerbaidjan.

Quaranta cinc països han declarat com a mínim un cas de XDR-TB, els percentatges més elevats són a l'antiga unió Soviètica amb una proporció de XDR-TB entre les soques MDR de fins el 24% a Estònia.

4.12 Caracterització molecular dels mecanismes de resistència a la INH, RIF, STR i PZA

Com és ben conegut, la resistència als fàrmacs antituberculosos ve determinada per mutacions cromosòmiques puntuals als gens que codifiquen per les dianes sobre les que actuen els fàrmacs o els enzims encarregats de la seva activació. El fenotip multiresistent o poliresistent es deu a l'adquisició seqüencial i independent de diferents mutacions.

L'estudi fenotípic de les resistències comporta necessàriament un retard en l'obtenció de resultats, que fa que l'orientació del tractament en funció de les característiques de la soca aïllada no es pugui dur a terme fins transcorregudes unes 5 setmanes. Es per això que darrerament es fan esforços pel desenvolupament d'un "antibiograma molecular" que pretén detectar les mutacions responsables de resistència directament a la mostra clínica. L'aproximació metodològica és una múltiplex PCR de les dianes escollides amb hibridació posterior (sobre tira de cel·lulosa o sobre xips de DNA amb PCR a temps real) amb sondes complementàries de les dianes salvatges o mutades.

Donat que la distribució de les mutacions responsables de resistència és geogràficament heterogènia, és important dur a terme estudis de caracterització molecular en diferents llocs, com el presentat, a fi i efecte de definir quins loci genètics han d'incloure aquests "antibiogrames moleculars".

Així doncs, la identificació de les alteracions genètiques responsables de la resistència als fàrmacs de primera línia és un dels objectius del Grup de Treball de Micobacteris de Barcelona. Es disposa d'aquesta anàlisi en 35 de les 43 soques resistents detectades al nostre centre durant el període 1999–2007 (taula 54). Així com de la CIM a la INH, la RIF i l'STR en cas de ser-ne resistents.

L'estudi del polimorfisme genètic associat amb el fenotip de resistència a la INH, s'ha fet analitzant el codó 315 del gen *katG* i la regió reguladora de l'operó *mabA-inhA*. Per a la RIF s'ha analitzat la regió central del gen *rpoB*. Per a la STR les mutacions en el

gen *rpsI* i en el gen *rrs*, per a la PZA el gen analitzat ha estat el *pncA* (veure material i mètodes apartat 3.8)

En un 39,3% de les soques resistents a la INH es detectaren alteracions genètiques al codó 315 del gen *katG* de les quals el 90,9 % tenen una CIM a la INH $> 2 \mu\text{g}/\text{m}$ (resistència d'alt nivell). L'associació de la resistència d'alt nivell a la isoniazida amb les mutacions al codó 315 del gen *katG* ha estat àmpliament descrita a la bibliografia, i també s'ha trobat en les soques de l'estudi que la Dra. Aragón, objecte de la seva tesi doctoral, feu pel conjunt de l'àrea Metropolitana de Barcelona (1, 12, 120, 208). La majoria (90,0%) han presentat la substitució aminoacídica d'una serina per una treonina, és conegut que aquesta és la mutació més prevalent a tot el món, encara que la seva distribució no és homogènia (12). El 32,1% presentaren alteracions a la regió reguladora dels gens *mabA-inhA*. De les quals el 100% presentaren la mateixa alteració, el canvi d'una citosina per una timina en la posició -15, i una CIM a la isoniazida $\leq 0,4 \mu\text{g}/\text{ml}$ (resistència de baix nivell). Aquesta associació entre el baix nivell de resistència a la isoniazida i les mutacions en la regió reguladora *mabA-inhA* ha estat també descrita anteriorment (12, 105). Cap de les soques que presentaren mutacions en la regió reguladora *mabA-inhA* va tenir conjuntament mutacions al codó 315 del gen *katG*. El 28.5% no presentaren cap alteració en les dianes analitzades.

La resistència a la RIF en totes les soques estudiades s'ha correlacionat al 100% amb mutacions en la regió central del gen *rpoB*. De les 4 soques, 3 (75%) presentaren alteracions en el codó 531. Aquesta mutació s'associa a la resistència creuada a la rifabutina, rifapentina i rifalacil (apartat 1.2.7.1.2).

El 60% de les soques resistents a la STR presentaren alguna alteració, el 30% en *rpsI* i l'altre 30% en el gen *rrs*. (Dr. J. González, Comunicació personal).

La soca resistent a la PZA estudiada presentava la deleció de nou nucleòtids al gen *pcnA*. El 70% de les soques resistents presenten alteracions en aquest gen, que codifica la pirazinamidasa que transforma la pirazinamida en àcid pirazinoic, compost actiu.

Taula 54 Caracterització molecular soques resistents.

Patró de resistència	CIM µg/ml			Resultat de l'anàlisi genotípic						
	INH	RF	STR	INH		RF	STR		PZA	
				<i>katG</i> codó 315	<i>mabA-inhA</i>	<i>rpoB</i> seqüència mutada Codó Canvi AA	Mutació <i>rpsL</i> (codó)	Mutació <i>rrs530</i> (nt)	Seq PZA Mutació	Pos nt (nº codó)
INH	0,4	-	-	W	- 15 C T	-	-	-	-	-
INH	6,4	-	-	315 SerThr	W	-	-	-	-	-
INH	12,8	-	-	315 SerArg	W	-	-	-	-	-
INH	12,8	-	-	315 SerThr	W	-	-	-	-	-
INH	0,4	-	-	W	- 15 C T	-	-	-	-	-
INH	12,8	-	-	315 SerThr	W	-	-	-	-	-
INH	12,8	-	-	315 SerThr	W	-	-	-	-	-
INH	>12,8	-	-	W	W	-	-	-	-	-
INH	0,4	-	-	W	- 15 C T	-	-	-	-	-
INH	0,4	-	-	315 SerThr	W	-	-	-	-	-
INH	0,4	-	-	W	- 15 C T	-	-	-	-	-
INH	3,2	-	-	315 SerThr	W	-	-	-	-	-
INH	12,8	-	-	W	W	-	-	-	-	-
INH	>12,8	-	-	W	W	-	-	-	-	-
INH	>12,8	-	-	315 SerThr	W	-	-	-	-	-
INH	0,2	-	-	W	W	-	-	-	-	-
INH	0,4	-	-	W	- 15 C T	-	-	-	-	-
INH	0,4	-	-	W	- 15 C T	-	-	-	-	-
INH	0,4	-	-	W	- 15 C T	-	-	-	-	-
INH	0,2	-	-	W	- 15 C T	-	-	-	-	-
INH RF	>12,8	2	-	W	W	GAC TAC Asp516Tyr	-	-	-	-
INH RF	12,8	8	-	315 SerThr	W	TCG TTG Ser531Leu	-	-	-	-
INH RF	3,2	32	-	W	W	TCG TTG Ser531Leu	-	-	-	-
INH RF	3,2	16	-	W	W	TCG TGG 531 SerTrp	-	-	-9 n	375-383 (125-128)
INH STR	6,4	-	16	315 SerThr	W	-	w	w	-	-
INH STR	0,4	-	>128	W	- 15 C T	-	43(AAG-AGG)	w	-	-
INH STR	>12,8	-	8	315 SerThr	W	-	w	w	-	-
INH STR	3,2	-	>128	w	W	-	43(AAG-AGG)	w	-	-
STR	-	-	16	-	-	-	-	513 (A-T)	-	-
STR	-	-	16	-	-	-	w	w	-	-
STR	-	-	>128	-	-	-	43(AAG-AGG)	w	-	-
STR	-	-	16	-	-	-	-	491(C-T)	-	-
STR	-	-	16	-	-	-	w	w	-	-
STR	-	-	16	-	-	-	-	491(C-T)	-	-

4.13 Estudi dels llinatges de les soques resistents aïllades a l'HSCiSP

Del total de soques resistents aïllades a l'HSCiSP (n=47), s'han estudiat per la tècnica molecular del "*Spoligotyping*" 45 soques, essent la majoria d'elles procedents de pacients espanyols (66,6%, 30/45) i sud-americans (24,4%, 11/45). Les altres 4 soques pertanyien a dos pacients asiàtics i dos marroquins. Els resultats dels espoligotips es van comparar amb els dipositats a la base de dades en línia SPOLDB 4.0, disponible a http://www.pasteur-quadeloupe.fr/tb/bd_myco.html).

Majoritàriament les soques estudiades pertanyen a la super-família LAM (*Latin-American Mediterranean*, 11/45) i a la família o H (*Haarlem*) (11/45), seguides per la família T (9/45). Les deu restants es distribuïxen dues en el llinatge S, 1 X, 1 *Beijing*, 3 desconegudes i 3 no classificables (taula 55).

Dins del llinatge LAM, s'han trobat famílies descrites per primer cop al nostre país (91), com la LAM12-MAD1 (n=3, 2 pacients espanyols i un peruà) i la T5-MAD2 (n=2), corroborant la seva presència en el nostre entorn i la seva transmissió dins la població immigrant. Els dos pacients als que se'ls ha aïllat la soca T5-MAD2 són ambdós immigrants, del Marroc i Equador, formen part del mateix clúster, un clúster mixt.

Tal i com s'ha documentat en altres estudis (149, 185) els pacients llatinoamericans i espanyols comparteixen els mateixos llinatges d'espoligotips, degut a que presenten un origen filogenètic comú, fent difícil determinar si han estat o no soques importades. Així, com es pot observar en la taula 55, els aïllaments de soques LAM s'han distribuït de forma idèntica en pacients espanyols i llatinoamericans. Mentre que el llinatge Haarlem, més prevalent a Europa, no s'aïlla en pacients immigrants.

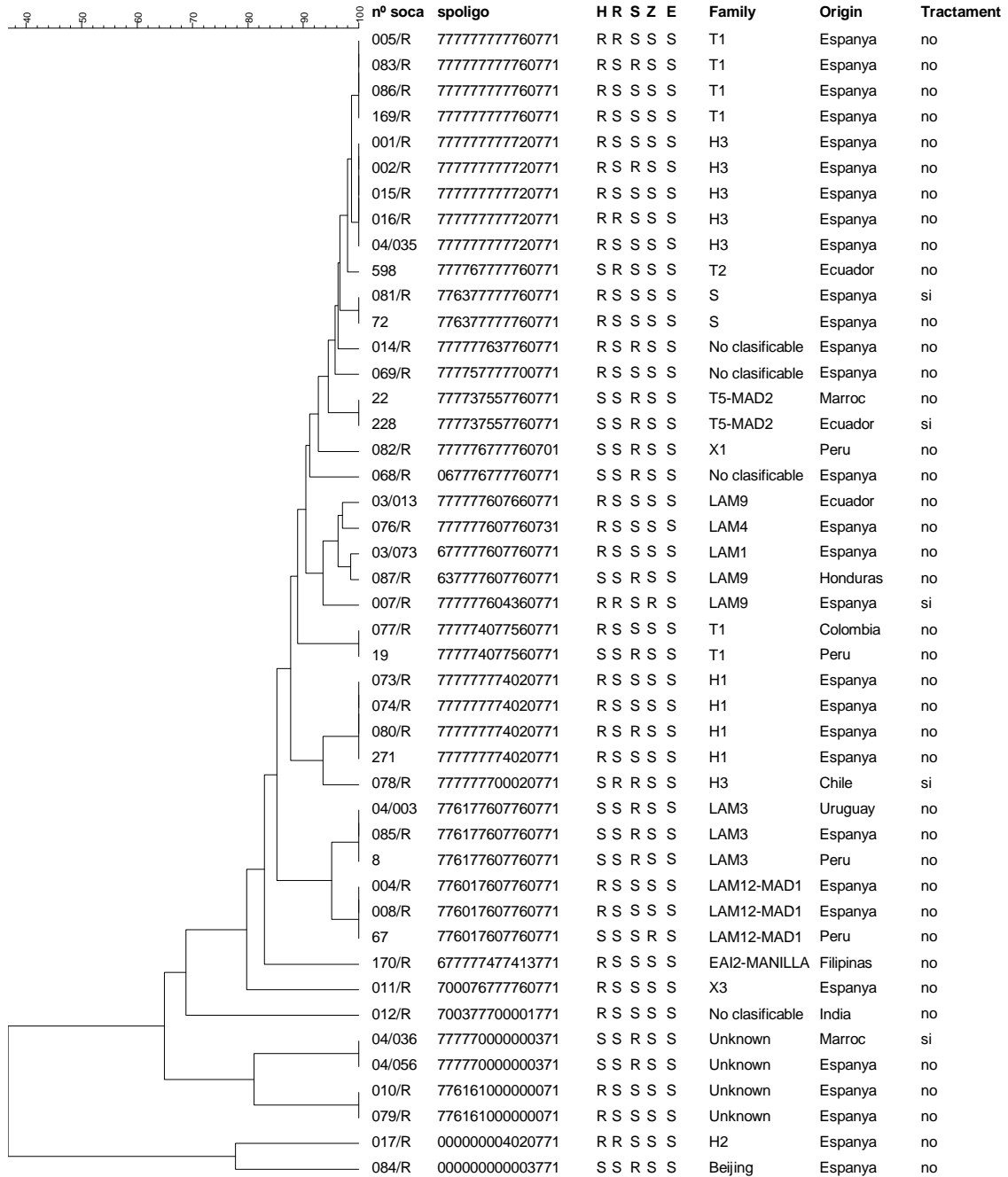
Del total de les 45 soques estudiades, 2 casos procedeixen de pacients de països asiàtics. En el cas de les soques asiàtiques, la diferència filogenètica entre les soques autòctones i les endèmiques d'aquesta zona, fan més evidents els fenòmens d'importació de soques. Una de les soques, presenta un espoligotip EIA-MANILLA prevalent a Filipines (185) i l'altre, procedent de l'Índia, presenta un espoligotip no descrit a la base de dades internacional (SPOLDB 4.0) (39).

Referent a la família Beijing, família de gran importància a nivell mundial associada a soques resistents i de gran capacitat de transmissió (185). Estudis previs realitzats en la nostra zona han documentat que la prevalença de les soques Beijing és baixa i que la majoria són sensibles als antituberculosos. En en les nostres soques es va detectar un pacient espanyol amb una soca resistent a l'estreptomicina de la família Beijing. En un estudi d'epidemiologia molecular de totes les soques aïllades durant el període 2003–2006 a la ciutat de Barcelona realitzat per Borrell i cols., es va detectar que aquest pacient amb la soca de la família Beijing formava part d'una agrupació mixta, on el cas índex era un pacient immigrant. En l'estudi comentat, el 39% de les agrupacions detectades foren mixtes, el 49% estaven formades només per autòctons i el 12% únicament per immigrants (32).

Taula 55: Llinatges aïllats en les 45 de les soques resistent aïllades a l'HSCiSP .

Família	espanyols	llatinoamericans	Marroc	Asiàtics	Localització prevalent
LAM	6	5			Països mediterranis, Amèrica Llatina i Africa
T	4	4	1		Ubiqua
H	11				Nord i Est d'Europa, Carib i Africa central i Iran
S	2				
X	1	1			Regne Unit, USA, antigues colònies Britàniques. Mèxic
EIA				1	sud est d'asia, Africa de l'est i Sud de l'india
Beijing	1				Sud est d'Asia, Xina, Rússia i Japó.
Desconegut	3		1		
No classificable	1				

Figura 41: Dendrograma dels esplogotips de les 45 soques resistents de l'HSCiSP.



5. Conclusions



Conclusions

1. Poques vegades s'aconsegueix l'estudi seriat de tres mostres pel diagnòstic de les infeccions per micobacteris.
2. S'ha observat un augment de l'aïllament de micobacteris no tuberculosos coincidint amb la pandèmia de la SIDA, així com la seva disminució a partir de la introducció del tractament combinat d'alta eficàcia. Aquesta corba és especialment rellevant per les espècies del complex *M. avium* i per *M. kansasii*.
3. De manera semblant a la resta de la ciutat de Barcelona, hem observat una davallada en els aïllaments de *M. tuberculosis*. Aquesta davallada és deguda a una disminució en els malalts autòctons, mentre que s'observa un increment de malalts immigrants. Tanmateix, a la distribució etària es veuen dos pics corresponents a adults joves, amb major presència de malalts immigrants, i gent gran fonamentalment autòctons.
4. La sensibilitat de la bacil·loscòpia pel diagnòstic de la tuberculosi respiratòria ha estat del 52,2% essent l'esput la mostra més rendible (64,4%). A la tuberculosi extrarrespiratòria la sensibilitat de la bacil·loscòpia ha estat del 23,7%, essent les mostres osteoarticulares les més freqüentment positives (35,7%).
5. L'especificitat de la bacil·loscòpia ha estat del 99,9% amb un VPP del 99,4% .
6. Al llarg del període d'estudi la taxa de sobrecreixement bacterià dels cultius ha oscil·lat entre el 0,7% i 2,2%.

7. S'observa globalment una major capacitat d'aïllament dels medis de cultiu líquid, amb l'excepció dels micobacteris de creixement ràpid, que s'aïllen amb més freqüència als medis sòlids degut major facilitat que ofereixen d'esser incubats de forma individual a la temperatura idònia requerida. En les mostres bacil·loscòpia negativa, els dos tipus de medis d'aïllament són complementaris (efecte inòcul).
8. *M. xenopi* s'ha aïllat amb més freqüència en BACTEC 460TB que en MB/BacT ALERT donada la possibilitat d'incubar el flascó de BACTEC 460TB a 42°C al detectar l'inici de creixement en el flascó.
9. Al comparar el temps de creixement dels dos medis líquids emprats, no s'observen diferències significatives amb l'excepció dels aïllaments de *M. tuberculosis* i dels micobacteris de creixement ràpid en mostres amb bacil·loscòpia negativa, que creixen abans al BACTEC 460TB.
10. L'especificitat del AMTD a l'hora de detectar àcids nucleics de *M. tuberculosis* complex ha estat bona. La seva sensibilitat també ho ha estat en mostres bacil·loscòpia positiva. En mostres bacil·loscòpia negativa disminueix considerablement, especialment a la tuberculosi extrarespiratòria.
11. Resistències en casos nous:
 - ❖ El percentatge de resistència a almenys un fàrmac ha estat del 7,9%, significativament més alta en pacients immigrants (16,7%) que en pacients autòctons (5,7%).
 - ❖ En els pacients autòctons tant la resistència a la INH (5,1%), com a la RIF (0%), l'STR (0,8%) i la PZA (0.8%) ha estat inferior a la dels casos immigrants; INH (6.6%), RIF (3.3%), STR (11.1%) i PZA (2.2%).

- ❖ No s'ha observat multiresistència en els pacients autòctons però sí en els immigrants (2,2%).
12. Resistències en pacients prèviament tractats:
- ❖ El percentatge de resistència a almenys un fàrmac ha estat del 15.1% significativament més alta en pacients immigrants (46.2%) que en pacients autòctons (5%).
 - ❖ En els casos autòctons tant la resistència a la INH (5%), com a la RIF (0%), l'STR (2.5%) i la PZA (0%) ha estat inferior a la dels casos immigrants; INH (23.1%), RIF (23.1%), STR (23.1%) i PZA (7.7%).
 - ❖ No s'ha observat multiresistència en els pacients autòctons però sí en els immigrants (15.4%).
13. A diferència del publicat per tota la ciutat de Barcelona, no s'ha observat diferències significatives en la tendència en els dos períodes analitzats en la resistència a almenys un fàrmac ni en cap dels fàrmacs de manera individual.
14. El sistema MB/BacT ALERT i BACTEC MGIT 960 són una bona alternativa no radiomètrica al sistema BACTEC 460 per l'estudi de la sensibilitat als fàrmacs de primera línia.
15. El sistema MB/BacT ALERT és una bona alternativa no radiomètrica al sistema BACTEC 460 per l'estudi de la sensibilitat a la PZA.
16. Resistència als fàrmacs de segona línia:
- ❖ Totes les soques resistents a la ETH presentaven resistència creuada amb la INH essent en els tres quarts dels casos de baix nivell.

- ❖ Tres de les quatre soques resistents a la rifampicina presentaven resistència creuada amb la rifabutina mentre que l'altre era sensible.
 - ❖ No s'han trobat resistències a altres fàrmacs de segona línia.
17. La resistència a la INH s'ha degut en el 39,3% dels casos a alteracions al codó 315 del gen *katG* i en el 32,1% a la regió reguladora del operó *mabA-inhA*. Un 28,6 % de les soques no presentaven alteracions en aquests loci.
 18. Totes les soques resistents a la RIF presentaven mutacions a la regió central del gen *rpoB* (75% al codó 531 i 25% al codó 516). La soca que presentava una mutació al codó 516 era sensible a la rifabutina.
 19. El 30% de les soques resistents a la STR presentaven mutacions al gen *rpsL* i un altre 30% al gen *rrs*.
 20. La soca resistent a la PZA presentava una deleció de 9 nucleòtids al gen *pncA*.
 21. Les soques resistents dels pacients llatinoamericans i espanyols comparteixen els mateixos llinatges d'espilgotips (LAM).

6. Bibliografia



Bibliografia

1. **Abate, G., S. E. Hoffner, V. O. Thomsen, and H. Miorner.** 2001. Characterization of isoniazid-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of phenotypic properties and mutations in *katG*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **20**:329–33.
2. **Adjers-Koskela, K., and M. L. Katila.** 2003. Susceptibility testing with the manual mycobacteria growth indicator tube (MGIT) and the MGIT 960 system provides rapid and reliable verification of multidrug-resistant tuberculosis. *J Clin Microbiol* **41**:1235–9.
3. **Al Zahrani, K., H. Al Jahdali, L. Poirier, P. Rene, M. L. Gennaro, and D. Menzies.** 2000. Accuracy and utility of commercially available amplification and serologic tests for the diagnosis of minimal pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **162**:1323–9.
4. **Alangaden, G. J., and S. A. Lerner.** 1997. The clinical use of fluoroquinolones for the treatment of mycobacterial diseases. *Clin Infect Dis* **25**:1213–21.
5. **Alcaide, F., González, J., Palacios, J.J.** 2005. *Micobacterias. A: E. Cercenado, Cantón, R.* (ed.), *Procedimientos en Microbiología Clínica*. SEIMC.
6. **Alcaide, F., G. E. Pfyffer, and A. Telenti.** 1997. Role of *embB* in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:2270–3.
7. **Alcalá, L., M. J. Ruiz-Serrano, S. Hernangómez, M. Marín, D. García de Viedma, R. San Juan, and E. Bouza.** 2001. Evaluation of the upgraded amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test (gen-probe) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and non-respiratory specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* **41**:51–6.
8. **Alland, D., T. S. Whittam, M. B. Murray, M. D. Cave, M. H. Hazbon, K. Dix, M. Kokoris, A. Duesterhoeft, J. A. Eisen, C. M. Fraser, and R. D. Fleischmann.** 2003. Modeling bacterial evolution with comparative-genome-based marker systems: application to *Mycobacterium tuberculosis* evolution and pathogenesis. *J Bacteriol* **185**:3392–9.
9. **Almeida da Silva P., A. J. A.** 2007. *Drugs and Drugs Interactions*, p. 593–620. *A: J. C. Palomino, Leao, S. C., Ritacco, V.* (ed.), *Tuberculosis 2007. From basic science to patient care*. www.TuberculosisTextbook.com, first ed.
10. **Andriole, V. T.** 2000. *The Quinolones*. Academic Press, San Diego(California).
11. **Anthony, R. M., A. R. Schuitema, I. L. Bergval, T. J. Brown, L. Oskam, and P. R. Klatser.** 2005. Acquisition of rifabutin resistance by a rifampicin resistant mutant of *Mycobacterium tuberculosis* involves an unusual spectrum of mutations and elevated frequency. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **4**:9.
12. **Aragón, L. M.** 2005. *Caracterización molecular de la resistencia de Mycobacterium tuberculosis a la Isoniacida y Rifampicina*. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
13. **Aragón, L. M., M. Garrigó, C. Moreno, M. Español, and P. Coll.** 2007. Evaluation of the BacT/ALERT PZA kit in comparison with the BACTEC 460TB PZA for

- testing *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility to pyrazinamide. J Antimicrob Chemother **60**:655–7.
14. **Ardito, F., B. Posteraro, M. Sanguinetti, S. Zanetti, and G. Fadda.** 2001. Evaluation of BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT 960) automated system for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol **39**:4440–4.
 15. **ASPB.** 2007. La tuberculosi a Barcelona. Informe 2006. Ajuntament de Barcelona. Agència de Salut Pública.
 16. **ATS.** 2007. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. This official statement of the American Thoracic Society was approved by the Board of Directors, March 1997. Medical Section of the American Lung Association. Am J Respir Crit Care Med **175**:367–416.
 17. **ATS.** 2000. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. Am J Respir Crit Care Med **161**:1376–95.
 18. **Aziz, M. A., A. Wright, A. Laszlo, A. De Muynck, F. Portaels, A. Van Deun, C. Wells, P. Nunn, L. Blanc, and M. Raviglione.** 2006. Epidemiology of antituberculosis drug resistance (the Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance): an updated analysis. Lancet **368**:2142–54.
 19. **Baker, L., T. Brown, M. C. Maiden, and F. Drobniowski.** 2004. Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*. Emerg Infect Dis **10**:1568–77.
 20. **Balagué M., Orcau A., Sánchez F., Tortajada C., and J. A. Caylà.** 2002. Epidemiología Actual de la Tuberculosis en España: hacia una mejor vigilancia y control. Control de Calidad de la SEIMC.
 21. **Bandera, A., A. Gori, L. Catozzi, A. Degli Esposti, G. Marchetti, C. Molteni, G. Ferrario, L. Codecasa, V. Penati, A. Matteelli, and F. Franzetti.** 2001. Molecular epidemiology study of exogenous reinfection in an area with a low incidence of tuberculosis. J Clin Microbiol **39**:2213–8.
 22. **Banerjee, A., E. Dubnau, A. Quemard, V. Balasubramanian, K. S. Um, T. Wilson, D. Collins, G. de Lisle, and W. R. Jacobs, Jr.** 1994. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Science **263**:227–30.
 23. **Barco, P., R. F. Cardoso, R. D. Hirata, C. Q. Leite, J. R. Pandolfi, D. N. Sato, M. L. Shikama, F. F. de Melo, E. M. Mamizuka, P. A. Campanerut, and M. H. Hirata.** 2006. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from the southeast region of Brazil. J Antimicrob Chemother **58**:930–5.
 24. **Barreto, A. M., J. B. Araujo, R. F. de Melo Medeiros, and P. C. de Souza Caldas.** 2003. Evaluation of indirect susceptibility testing of *Mycobacterium*

- tuberculosis* to the first- and second-line, and alternative drugs by the newer MB/BacT system. Mem Inst Oswaldo Cruz **98**:827–30.
25. **Beavis, K. G., M. B. Lichty, D. L. Jungkind, and O. Giger.** 1995. Evaluation of Amplicor PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. J Clin Microbiol **33**:2582–6.
 26. **Belanger, A. E., G. S. Besra, M. E. Ford, K. Mikusova, J. T. Belisle, P. J. Brennan, and J. M. Inamine.** 1996. The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. Proc Natl Acad Sci U S A **93**:11919–24.
 27. **Bemer, P., T. Bodmer, J. Munzinger, M. Perrin, V. Vincent, and H. Drugeon.** 2004. Multicenter evaluation of the MB/BACT system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol **42**:1030–4.
 28. **Bemer, P., F. Palicova, S. Rusch-Gerdes, H. B. Drugeon, and G. E. Pfyffer.** 2002. Multicenter evaluation of fully automated BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol **40**:150–4.
 29. **Bergmann, J. S., G. Yuoh, G. Fish, and G. L. Woods.** 1999. Clinical evaluation of the enhanced Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test for rapid diagnosis of tuberculosis in prison inmates. J Clin Microbiol **37**:1419–25.
 30. **Bloch, K. C., L. Zwerling, M. J. Pletcher, J. A. Hahn, J. L. Gerberding, S. M. Ostroff, D. J. Vugia, and A. L. Reingold.** 1998. Incidence and clinical implications of isolation of *Mycobacterium kansasii*: results of a 5-year, population-based study. Ann Intern Med **129**:698–704.
 31. **Bodmer, T., G. Zurcher, P. Imboden, and A. Telenti.** 1995. Mutation position and type of substitution in the beta-subunit of the RNA polymerase influence in-vitro activity of rifamycins in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother **35**:345–8.
 32. **Borrell, S., M. Español, A. Orcau, G. Tudó, F. March, J. A. Caylà, J. M. Jansá, F. Alcaide, N. Martín-Casabona, M. Salvadó, J. A. Martínez, R. Vidal, F. Sánchez, N. Altet, P. Coll, and J. González-Martín.** 2009. Factors associated with differences between conventional contact tracing and molecular epidemiology in study of tuberculosis transmission and analysis in the city of Barcelona, Spain. J Clin Microbiol **47**:198–204.
 33. **Bottger, E. C., B. Springer, M. Pletschette, and P. Sander.** 1998. Fitness of antibiotic-resistant microorganisms and compensatory mutations. Nat Med **4**:1343–4.
 34. **Braden, C. R., G. L. Templeton, M. D. Cave, S. Valway, I. M. Onorato, K. G. Castro, D. Moers, Z. Yang, W. W. Stead, and J. H. Bates.** 1997. Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a state with a large rural population. J Infect Dis **175**:1446–52.

35. **Brosch, R., S. V. Gordon, M. Marmiesse, P. Brodin, C. Buchrieser, K. Eiglmeier, T. Garnier, C. Gutierrez, G. Hewinson, K. Kremer, L. M. Parsons, A. S. Pym, S. Samper, D. van Soolingen, and S. T. Cole.** 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:3684–9.
36. **Brosch, R., W. J. Philipp, E. Stavropoulos, M. J. Colston, S. T. Cole, and S. V. Gordon.** 1999. Genomic analysis reveals variation between *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and the attenuated *M. tuberculosis* H37Ra strain. *Infect Immun* **67**:5768–74.
37. **Brown–Elliott B. A., W. R. J. j.** 2007. *Mycobacterium*: Clinical and Laboratory Characteristics of Rapidly Growing Mycobacteria, p. 589–600. *A*: P. R. Murray, Baron E.J., Jorgensen J.H., Landry M.L., Pfaller M.A. (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, vol. 1. ASM PRESS, Washington, D.C.
38. **Brown–Elliott, B. A., D. E. Griffith, and R. J. Wallace, Jr.** 2002. Newly described or emerging human species of nontuberculous mycobacteria. *Infect Dis Clin North Am* **16**:187–220.
39. **Brudey, K., J. R. Driscoll, L. Rigouts, W. M. Prodinger, A. Gori, S. A. Al–Hajoj, C. Allix, L. Aristimuno, J. Arora, V. Baumanis, L. Binder, P. Cafrune, A. Cataldi, S. Cheong, R. Diel, C. Ellermeier, J. T. Evans, M. Fauville–Dufaux, S. Ferdinand, D. García de Viedma, C. Garzelli, L. Gazzola, H. M. Gomes, M. C. Gutierrez, P. M. Hawkey, P. D. van Helden, G. V. Kadival, B. N. Kreiswirth, K. Kremer, M. Kubin, S. P. Kulkarni, B. Liens, T. Lillebaek, M. L. Ho, C. Martín, I. Mokrousov, O. Narvskaia, Y. F. Ngeow, L. Naumann, S. Niemann, I. Parwati, Z. Rahim, V. Rasolofo–Razanamparany, T. Rasolonalona, M. L. Rossetti, S. Rusch–Gerdes, A. Sajduda, S. Samper, I. G. Shemyakin, U. B. Singh, A. Somoskovi, R. A. Skuce, D. van Soolingen, E. M. Streicher, P. N. Suffys, E. Tortoli, T. Tracevska, V. Vincent, T. C. Victor, R. M. Warren, S. F. Yap, K. Zaman, F. Portaels, N. Rastogi, and C. Sola.** 2006. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol* **6**:23.
40. **Brudey, K., M. C. Gutierrez, V. Vincent, L. M. Parsons, M. Salfinger, N. Rastogi, and C. Sola.** 2004. *Mycobacterium africanum* genotyping using novel spacer oligonucleotides in the direct repeat locus. *J Clin Microbiol* **42**:5053–7.
41. **Brunello, F., and R. Fontana.** 2000. Reliability of the MB/BacT system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates to antituberculous drugs. *J Clin Microbiol* **38**:872–3.
42. **Brunello, F., M. Ligozzi, E. Cristelli, S. Bonora, E. Tortoli, and R. Fontana.** 2001. Identification of 54 mycobacterial species by PCR–restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. *J Clin Microbiol* **39**:2799–806.
43. **Cambau, E., and V. Jarlier.** 1996. Resistance to quinolones in mycobacteria. *Res Microbiol* **147**:52–9.
44. **Caminero Luna, J. A., M. Casal Roman, V. Ausina Ruiz, J. M. Pina Gutierrez, and J. Sauret Valet.** 1996. Diagnostico de la Tuberculosis. *Arch Bronconeumol* **32**:85–99.

45. **Casal, M.** 1992. *Mycobacterium tuberculosis*, p. 754–66. A: J. E. Perea (ed.), Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, vol. 2. Ediciones Doyma, Barcelona.
46. **Cave, M. D., K. D. Eisenach, P. F. McDermott, J. H. Bates, and J. T. Crawford.** 1991. IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. *Mol Cell Probes* **5**:73–80.
47. **CDC.** 1996. Clinical update: impact of HIV protease inhibitors on the treatment of HIV-infected tuberculosis patients with rifampin. *MMWR Rep* **45**:921–5.
48. **CDC.** 2006. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs--worldwide, 2000–2004. *MMWR Rep* **55**:301–5.
49. **CDC.** 2000. Update: Nucleic acid amplification tests for tuberculosis. *MMWR Rep* **49**:593–4.
50. **Chedore, P., and F. B. Jamieson.** 1999. Routine use of the Gen-Probe MTD2 amplification test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens in a large public health mycobacteriology laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis* **35**:185–91.
51. **Chen, P., J. Gearhart, M. Protopopova, L. Einck, and C. A. Nacy.** 2006. Synergistic interactions of SQ109, a new ethylene diamine, with front-line antitubercular drugs in vitro. *J Antimicrob Chemother* **58**:332–7.
52. **Chimara, E., L. Ferrazoli, S. Y. Ueky, M. C. Martins, A. M. Durham, R. D. Arbeit, and S. C. Leao.** 2008. Reliable identification of mycobacterial species by PCR–restriction enzyme analysis (PRA)–*hsp65* in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA–*hsp65* patterns. *BMC Microbiol* **8**:48.
53. **Cole, S. T.** 1996. Rifamycin resistance in mycobacteria. *Res Microbiol* **147**:48–52.
54. **Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, 3rd, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, B. G. Barrell, and et al.** 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**:537–44.
55. **Coll, P.** 2003. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **21**:299–307.
56. **Coll, P., R. Costa, F. March, and G. Prats.** 1995. IS6110 en la tipificación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*: aplicación de un protocolo estandarizado con análisis informatizado de las imágenes. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **13**:391–7.
57. **Coll, P., M. Garrigó, C. Moreno, and N. Marti.** 2003. Routine use of Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct (MTD) test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* with smear-positive and smear-negative specimens. *Int J Tuberc Lung Dis* **7**:886–91.

58. **Collins C.H., G. J. M., Yates M.D.** 1985. Organization and practice in tuberculosis bacteriology. Butterworth & Co, Cambridge.
59. **Cooksey, R. C.** 2003. Recent advances in laboratory procedures for pathogenic mycobacteria. *Clin Lab Med* **23**:801–21.
60. **Costa, R.** 1996. Epidemiologia Molecular de *Mycobacterium tuberculosis*. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
61. **Cuzin, M.** 2001. DNA chips: a new tool for genetic analysis and diagnostics. *Transfus Clin Biol* **8**:291–6.
62. **Dahle, U. R., V. Eldholm, B. A. Winje, T. Mannsaker, and E. Heldal.** 2007. Impact of immigration on the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in a low-incidence country. *Am J Respir Crit Care Med* **176**:930–5.
63. **Dale, J. W.** 1995. Mobile genetic elements in mycobacteria. *Eur Respir J Suppl* **20**:633s–648s.
64. **David, H. L.** 1970. Probability distribution of drug-resistant mutants in unselected populations of *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl Microbiol* **20**:810–4.
65. **David, H. L.** 1971. Resistance to D-cycloserine in the tubercle bacilli: mutation rate and transport of alanine in parental cells and drug-resistant mutants. *Appl Microbiol* **21**:888–92.
66. **Davidson, P. T.** 1988. Treatment of mycobacterial infections. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis* **63**:23–5.
67. **deColombani, P.** 2007. Epidemiology of tuberculosis in Europe. WHO. Regional office for Europe.
68. **Del Olmo, E. L.-P., JL. San Feliciano, A. Gracia AE.** 2005. Desarrollo de nuevos agentes antituberculosos. *Enf Emerg* **7**:22–33.
69. **Della-Latta.** 2004. Digestion-Decontamination Procedures. *Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing*, p. 7.1.2.1–7.1.2.9. A: H. D. Isenberg (ed.), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2 ed, vol. 2. ASM PRESS, Washington D C.
70. **Devallois, A., K. S. Goh, and N. Rastogi.** 1997. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol* **35**:2969–73.
71. **Di Perri, G., and S. Bonora.** 2004. Which agents should we use for the treatment of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*? *J Antimicrob Chemother* **54**:593–602.
72. **Díaz-Infantes, M. S., M. J. Ruiz-Serrano, L. Martínez-Sánchez, A. Ortega, and E. Bouza.** 2000. Evaluation of the MB/BacT Mycobacterium detection system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **38**:1988–9.
73. **Domínguez, J., and J. Ruiz-Manzano.** 2006. Prueba de la tuberculina: ¿es la hora del cambio? *Arch Bronconeumol* **42**:47–8.

74. **Donnabella, V., J. Salazar-Schicchi, S. Bonk, B. Hanna, and W. N. Rom.** 2000. Increasing incidence of *Mycobacterium xenopi* at Bellevue hospital: An emerging pathogen or a product of improved laboratory methods? *Chest* **118**:1365–70.
75. **Drobniewski, F., S. Rusch-Gerdes, and S. Hoffner.** 2007. Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* (EUCAST document E.DEF 8.1)--report of the Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). *Clin Microbiol Infect* **13**:1144–56.
76. **DSGC.** 2008. Situació epidemiològica i tendència de l'epidèmia tuberculosa a Catalunya. Informe anual 2006. Direcció General de Salut Pública. Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya. Programa de Prevenció i control de la tuberculosi.
77. **Dukes, C. S., J. Sugarman, J. P. Cegielski, G. J. Lallinger, and D. H. Mwakyusa.** 1992. Severe cutaneous hypersensitivity reactions during treatment of tuberculosis in patients with HIV infection in Tanzania. *Trop Geogr Med* **44**:308–11.
78. **Ehlers, S.** 2003. Pathomorphogenesis of tubercular histologic changes: mechanisms of granuloma formation, maintenance and necrosis. *Internist (Berl)* **44**:1363–73.
79. **Espasa, M., J. González-Martín, F. Alcaide, L. M. Aragón, J. Lonca, J. M. Manterola, M. Salvadó, G. Tudó, P. Orus, and P. Coll.** 2005. Direct detection in clinical samples of multiple gene mutations causing resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampicin using fluorogenic probes. *J Antimicrob Chemother* **55**:860–5.
80. **Estrada, G. I., M. J. Colston, and R. A. Cox.** 1989. Determination and evolutionary significance of nucleotide sequences near to the 3'-end of 16S ribosomal RNA of mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett* **52**:285–90.
81. **EuroTB.** 2008. Surveillance of tuberculosis in Europe. Report on tuberculosis cases notified in 2006. Euro TB and the national coordinators for tuberculosis surveillance in the WHO European Region.
82. **Ezekiel, D. H., and J. E. Hutchins.** 1968. Mutations affecting RNA polymerase associated with rifampicin resistance in *Escherichia coli*. *Nature* **220**:276–7.
83. **Farer, L. S., A. M. Lowell, and M. P. Meador.** 1979. Extrapulmonary tuberculosis in the United States. *Am J Epidemiol* **109**:205–17.
84. **Filliol, I., A. S. Motiwala, M. Cavatore, W. Qi, M. H. Hazbon, M. Bobadilla del Valle, J. Fyfe, L. García-García, N. Rastogi, C. Sola, T. Zozio, M. I. Guerrero, C. I. León, J. Crabtree, S. Angiuoli, K. D. Eisenach, R. Durmaz, M. L. Joloba, A. Rendon, J. Sifuentes-Osornio, A. Ponce de León, M. D. Cave, R. Fleischmann, T. S. Whittam, and D. Alland.** 2006. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting

- systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *J Bacteriol* **188**:759–72.
85. **Fitzgerald D., H. D. W.** 2005. *Mycobacterium tuberculosis*, p. 2852–86. *A: B. Madell G.L., J.E., Dolin, R. (ed.), Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practices of Infectious Diseases, Sixth ed, vol. 2. Elsevier. Churchill Livingstone, Philadelphia.*
 86. **Fleischmann, R. D., D. Alland, J. A. Eisen, L. Carpenter, O. White, J. Peterson, R. DeBoy, R. Dodson, M. Gwinn, D. Haft, E. Hickey, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, L. A. Umayam, M. Ermolaeva, S. L. Salzberg, A. Delcher, T. Utterback, J. Weidman, H. Khouri, J. Gill, A. Mikula, W. Bishai, W. R. Jacobs Jr, Jr., J. C. Venter, and C. M. Fraser.** 2002. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol* **184**:5479–90.
 87. **Frothingham, R., and W. A. Meeker-O'Connell.** 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* **144** (Pt 5):1189–96.
 88. **Gagneux, S., K. DeRiemer, T. Van, M. Kato-Maeda, B. C. de Jong, S. Narayanan, M. Nicol, S. Niemann, K. Kremer, M. C. Gutierrez, M. Hilty, P. C. Hopewell, and P. M. Small.** 2006. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:2869–73.
 89. **Gamboa, F., G. Fernandez, E. Padilla, J. M. Manterola, J. Lonca, P. J. Cardona, L. Matas, and V. Ausina.** 1998. Comparative evaluation of initial and new versions of the Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol* **36**:684–9.
 90. **García de Viedma, D.** 2003. Rapid detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review discussing molecular approaches. *Clin Microbiol Infect* **9**:349–59.
 91. **García de Viedma, D., E. Bouza, N. Rastogi, and C. Sola.** 2005. Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in Madrid and identification of two new families specific to Spain-related settings. *J Clin Microbiol* **43**:1797–806.
 92. **García de Viedma, D., M. S. Díaz Infantes, F. Lasala, F. Chaves, L. Alcalá, and E. Bouza.** 2002. 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* **40**:988–95.
 93. **Garrigó, M., L. M. Aragón, F. Alcaide, S. Borrell, E. Cardeñosa, J. J. Galán, J. González-Martín, N. Martín-Casabona, C. Moreno, M. Salvadó, and P. Coll.** 2007. Multicenter laboratory evaluation of the MB/BacT *Mycobacterium* detection system and the BACTEC MGIT 960 system in comparison with the BACTEC 460TB system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **45**:1766–70.
 94. **Gerner-Smidt, P., L. M. Graves, S. Hunter, and B. Swaminathan.** 1998. Computerized analysis of restriction fragment length polymorphism patterns:

- comparative evaluation of two commercial software packages. *J Clin Microbiol* **36**:1318–23.
95. **Godfrey–Faussett, P., P. Sonnenberg, S. C. Shearer, M. C. Bruce, C. Mee, L. Morris, and J. Murray.** 2000. Tuberculosis control and molecular epidemiology in a South African gold–mining community. *Lancet* **356**:1066–71.
 96. **Goguet de la Salmoniere, Y. O., C. C. Kim, A. G. Tsolaki, A. S. Pym, M. S. Siegrist, and P. M. Small.** 2004. High–throughput method for detecting genomic–deletion polymorphisms. *J Clin Microbiol* **42**:2913–8.
 97. **Goulding, J. N., J. Stanley, N. Saunders, and C. Arnold.** 2000. Genome–sequence–based fluorescent amplified–fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **38**:1121–6.
 98. **Griffith, D. E., T. Aksamit, B. A. Brown–Elliott, A. Catanzaro, C. Daley, F. Gordin, S. M. Holland, R. Horsburgh, G. Huitt, M. F. Iademarco, M. Iseman, K. Olivier, S. Ruoss, C. F. von Reyn, R. J. Wallace, Jr., and K. Winthrop.** 2007. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* **175**:367–416.
 99. **Groenen, P. M., A. E. Bunschoten, D. van Soolingen, and J. D. van Embden.** 1993. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol Microbiol* **10**:1057–65.
 100. **Grosset, J., C. Truffot–Pernot, C. Lacroix, and B. Ji.** 1992. Antagonism between isoniazid and the combination pyrazinamide–rifampin against tuberculosis infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **36**:548–51.
 101. **Gutacker, M. M., B. Mathema, H. Soini, E. Shashkina, B. N. Kreiswirth, E. A. Graviss, and J. M. Musser.** 2006. Single–nucleotide polymorphism–based population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from 4 geographic sites. *J Infect Dis* **193**:121–8.
 102. **Gutacker, M. M., J. C. Smoot, C. A. Migliaccio, S. M. Ricklefs, S. Hua, D. V. Cousins, E. A. Graviss, E. Shashkina, B. N. Kreiswirth, and J. M. Musser.** 2002. Genome–wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. *Genetics* **162**:1533–43.
 103. **Haas, W. H.** 1998. Molekularbiologische Methoden in der Epidemiologie der Tuberkulose. *Pneumologie* **52**:271–6.
 104. **Heifets, L., Desmond, E.** 2005. Chapter 4: Clinical Mycobacteriology (Tuberculosis) Laboratory: Services and Methods, p. 49–69. A: S. T. Cole, Davis Eisenach, K.D., McMurray, D.N., Jacobs W.R. Jr. (ed.), *Tuberculosis and the Tubercle bacillus*. ASM PRESS, Washington, D.C.
 105. **Heym, B., B. Saint–Joanis, and S. T. Cole.** 1999. The molecular basis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis* **79**:267–71.
 106. **Hirsh, A. E., A. G. Tsolaki, K. DeRiemer, M. W. Feldman, and P. M. Small.** 2004. Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:4871–6.

107. **Holmes, C. B., H. Hausler, and P. Nunn.** 1998. A review of sex differences in the epidemiology of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* **2**:96–104.
108. **Honore, N., and S. T. Cole.** 1994. Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **38**:238–42.
109. **Hopewell, P. C., Jasmer, R.M.** 2005. Chapter 2: Overview of Clinical Tuberculosis, p. 15–31. *A:* S. T. Cole, Davis Eisenach, K.D., McMurray, D.N., Jacobs W.R. Jr. (ed.), *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*. ASM PRESS, Washington, D.C.
110. **Hu, Y., A. R. Coates, and D. A. Mitchison.** 2003. Sterilizing activities of fluoroquinolones against rifampin-tolerant populations of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:653–7.
111. **Inderlied, C. B., Nash, K.A..** 2005. Antimycobacterial Agents: In vitro Susceptibility Testing and Mechanisms of Action and Resistance, p. 155–225. *A:* V. Lorian (ed.), *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Fifth ed. Lippincott Williams & Wilkins, New York.
112. **Inge, L. D., and J. W. Wilson.** 2008. Update on the treatment of tuberculosis. *Am Fam Physician* **78**:457–65.
113. **Jarlier, V., and H. Nikaido.** 1994. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* **123**:11–8.
114. **Jasmer, R. M., and C. L. Daley.** 2003. Rifampin and pyrazinamide for treatment of latent tuberculosis infection: is it safe? *Am J Respir Crit Care Med* **167**:809–10.
115. **Ji, B., N. Lounis, C. Truffot-Pernot, and J. Grosset.** 1995. In vitro and in vivo activities of levofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:1341–4.
116. **Jia, L., J. E. Tomaszewski, C. Hanrahan, L. Coward, P. Noker, G. Gorman, B. Nikonenko, and M. Protopopova.** 2005. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of SQ109, a new diamine-based antitubercular drug. *Br J Pharmacol* **144**:80–7.
117. **Jiménez, M., and M. Casal.** 2008. Situación de las resistencias a fármacos de *Mycobacterium tuberculosis* en España. *Rev Esp Quimioter* **21**:22–5.
118. **Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, and J. van Embden.** 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* **35**:907–14.
119. **Kerleguer, A., J. L. Koeck, M. Fabre, P. Gerome, R. Teyssou, and V. Herve.** 2003. Use of equivocal zone in interpretation of results of the amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* **41**:1783–4.
120. **Kim, S. Y., Y. J. Park, W. I. Kim, S. H. Lee, C. Ludgerus Chang, S. J. Kang, and C. S. Kang.** 2003. Molecular analysis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from South Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* **47**:497–502.

121. Kivi, M., X. Liu, S. Raychaudhuri, R. B. Altman, and P. M. Small. 2002. Determining the genomic locations of repetitive DNA sequences with a whole-genome microarray: IS6110 in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **40**:2192–8.
122. Kocagoz, T., C. J. Hackbarth, I. Unsal, E. Y. Rosenberg, H. Nikaido, and H. F. Chambers. 1996. Gyrase mutations in laboratory–selected, fluoroquinolone–resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:1768–74.
123. Kremer, K., J. R. Glynn, T. Lillebaek, S. Niemann, N. E. Kurepina, B. N. Kreiswirth, P. J. Bifani, and D. van Soolingen. 2004. Definition of the Beijing/W lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of genetic markers. *J Clin Microbiol* **42**:4040–9.
124. Kremer, K., D. van Soolingen, R. Frothingham, W. H. Haas, P. W. Hermans, C. Martín, P. Palittapongarnpim, B. B. Plikaytis, L. W. Riley, M. A. Yakrus, J. M. Musser, and J. D. van Embden. 1999. 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* **37**:2607–18.
125. Kruuner, A., S. E. Hoffner, H. Sillastu, M. Danilovits, K. Levina, S. B. Svenson, S. Ghebremichael, T. Koivula, and G. Kallenius. 2001. Spread of drug–resistant pulmonary tuberculosis in Estonia. *J Clin Microbiol* **39**:3339–45.
126. Kruuner, A., M. D. Yates, and F. A. Drobniewski. 2006. Evaluation of MGIT 960–based antimicrobial testing and determination of critical concentrations of first– and second–line antimicrobial drugs with drug–resistant clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **44**:811–8.
127. Kulski, J. K., and T. Pryce. 1996. Preparation of mycobacterial DNA from blood culture fluids by simple alkali wash and heat lysis method for PCR detection. *J Clin Microbiol* **34**:1985–91.
128. Laal, S., Skeiky, Y.A.W.. 2005. Chapter 5: Immune–Based Methods, p. 71–83. A: S. T. Cole, Davis Eisenach, K.D., McMurray, D.N., Jacobs W.R. Jr. (ed.), *Tuberculosis and the Tubercle bacillus*. ASM PRESS, Washington, D.C.
129. Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115–175. A: G. M. Stackebrandt E. (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, Chichester, United Kingdom.
130. Lappayawichit, P., S. Rienthong, D. Rienthong, C. Chuchottaworn, A. Chaiprasert, W. Panbangred, H. Saringcarinkul, and P. Palittapongarnpim. 1996. Differentiation of *Mycobacterium* species by restriction enzyme analysis of amplified 16S–23S ribosomal DNA spacer sequences. *Tuber Lung Dis* **77**:257–63.
131. Leal Arranz, M. V., A. Gaafar, M. J. Unzaga Baranano, J. A. Crespo Notario, R. Cisterna Cáncer, and F. García Cebrian. 2005. Estudio clinicoepidemiológico de la enfermedad por *Mycobacterium kansasii* en el área urbana de Bilbao. *Arch Bronconeumol* **41**:189–96.

132. **Lebrun, L., F. Espinasse, J. D. Poveda, and V. Vincent-Levy-Frebault.** 1992. Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol* **30**:2476–8.
133. **Lee L.V., S. M., Siddiqi S.** 2004. Procedures for Identification from Culture, p. 7.6.1.1–7.6.1.12. *A:* H. D. Isenberg (ed.), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, vol. 2. ASM PRESS, Washington, D.C.
134. **Lee, L. V.** 2004. Solid Media for Isolation, p. 7.3.1–7.3.4. *A:* H. D. Isenberg (ed.), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, vol. 2. ASM PRESS, Washington, D.C.
135. **Levis W.R., E. J. D.** 2005. *Mycobacterium leprae* (Leprosy, Hansen's Disease), p. 2886–96. *A:* B. Madell G.L., J.E., Dolin, R. (ed.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practices of Infectious Diseases*, Sixth ed, vol. 2. Elsevier. Churchill Livingstone, Philadelphia.
136. **Levy-Frebault, V. V., and F. Portaels.** 1992. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *Int J Syst Bacteriol* **42**:315–23.
137. **Lipsky, B. A., J. Gates, F. C. Tenover, and J. J. Plorde.** 1984. Factors affecting the clinical value of microscopy for acid-fast bacilli. *Rev Infect Dis* **6**:214–22.
138. **Lonca, J., J. M. Manterola, F. Alcaide, M. Espasa, J. González, E. Verdu, and P. Coll.** 2002. The relationship between the isoniazid resistant molecular mechanisms with the minimum inhibitory concentration and the catalase activity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect* **8 (suppl.1)**:529.
139. **López-Cerero, L., J. Esteban-Moreno, and J. González-Martín.** 2007. Recomendaciones sobre bioseguridad en el laboratorio de micobacterias y revisión de la normativa. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **25 Suppl 3**:52–9.
140. **Loudon, R. G., and R. M. Roberts.** 1968. Singing and the dissemination of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* **98**:297–300.
141. **March, F.** 1998. La Tuberculosis a les presons del l'àrea de Barcelona. Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.
142. **March, F., P. Coll, R. Costa, P. Rodríguez, C. Moreno, M. Garrigó, and G. Prats.** 1996. Utilidad de DR, PGRS y *Spoligotyping* en la tipificación de *Mycobacterium tuberculosis*. Comparación con IS6110. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **14**:160–6.
143. **March, F., X. Garriga, P. Rodríguez, C. Moreno, M. Garrigó, P. Coll, and G. Prats.** 1997. Acquired drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from compliant patients with human immunodeficiency virus-associated tuberculosis. *Clin Infect Dis* **25**:1044–7.
144. **Martín A., P. F.** 2007. Drug Resistance and Drug Resistance Detection, p. 635–660. *A:* J. C. Palomino, Leao, S. C., Ritacco, V. (ed.), *Tuberculosis 2007. From basic science to patient care.* www.TuberculosisTextbook.com.
145. **Martín Casabona, N., and J. Rossello Urgell.** 2000. Micobacterias ambientales en España: aislamientos en el período 1976–1996]. *Med Clin (Barc)* **115**:663–70.

146. **Martín-Casabona, N., F. Alcaide, P. Coll, J. González, J. M. Manterola, M. Salvadó, and J. A. Caylà.** 2000. Farmacorresistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. Estudio multicéntrico en el área de Barcelona. Grupo de Trabajo sobre Resistencias en Tuberculosis. *Med Clin (Barc)* **115**:493–8.
147. **Martín-Casabona, N., A. R. Bahrmand, J. Bennedsen, V. O. Thomsen, M. Curcio, M. Fauville-Dufaux, K. Feldman, M. Havelkova, M. L. Katila, K. Koksalan, M. F. Pereira, F. Rodrigues, G. E. Pfyffer, F. Portaels, J. R. Urgell, S. Rusch-Gerdes, E. Tortoli, V. Vincent, and B. Watt.** 2004. Non-tuberculous mycobacteria: patterns of isolation. A multi-country retrospective survey. *Int J Tuberc Lung Dis* **8**:1186–93.
148. **Marttila, H. J., H. Soini, E. Eerola, E. Vyshnevskaya, B. I. Vyshnevskiy, T. F. Otten, A. V. Vasilyef, and M. K. Viljanen.** 1998. 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* **42**:2443–5.
149. **Mathema, B., N. E. Kurepina, P. J. Bifani, and B. N. Kreiswirth.** 2006. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clin Microbiol Rev* **19**:658–85.
150. **Maus, C. E., B. B. Plikaytis, and T. M. Shinnick.** 2005. Mutation of *tlyA* confers capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:571–7.
151. **Mazars, E., S. Lesjean, A. L. Banuls, M. Gilbert, V. Vincent, B. Gicquel, M. Tibayrenc, C. Locht, and P. Supply.** 2001. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:1901–6.
152. **McClatchy, J. K., W. Kanes, P. T. Davidson, and T. S. Moulding.** 1977. Cross-resistance in *M. tuberculosis* to kanamycin, capreomycin and viomycin. *Tubercle* **58**:29–34.
153. **McClure, W. R., and C. L. Cech.** 1978. On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. *J Biol Chem* **253**:8949–56.
154. **Meier, A., P. Sander, K. J. Schaper, M. Scholz, and E. C. Bottger.** 1996. Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:2452–4.
155. **Mensa, J., J. M. Gatell, J. R. Aranzo, A. Domínguez-Gil, J. E. García, M. T. Jiménez de Anta, and G. Prats.** 2007. Guía de Terapéutica Antimicrobiana, 17 ed. Elsevier Doyma, Barcelona.
156. **Middlebrook, G., and M. L. Cohn.** 1953. Some observations on the pathogenicity of isoniazid-resistant variants of tubercle bacilli. *Science* **118**:297–9.
157. **Mitchison, D. A.** 1985. The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. *Tubercle* **66**:219–25.
158. **Mitchison, D. A.** 1979. Basic mechanisms of chemotherapy. *Chest* **76**:771–81.

159. **Moreno, C., M. Garrigó, F. Sánchez, and P. Coll.** 1994. Valor del examen directo (Ziehl–Neelsen) del cultivo en sistema Bactec para la identificación presuntiva de: *Mycobacterium tuberculosis complex*, *Mycobacterium avium complex*, *Mycobacterium xenopi*, and *Mycobacterium kansasii*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **12**:241–5.
160. **Mostowy, S., D. Cousins, J. Brinkman, A. Aranaz, and M. A. Behr.** 2002. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Infect Dis* **186**:74–80.
161. **Mostrom, P., M. Gordon, C. Sola, M. Ridell, and N. Rastogi.** 2002. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin Microbiol Infect* **8**:694–704.
162. **Musser, J. M.** 1995. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev* **8**:496–514.
163. **NCCLS.** 2004. Susceptibility Testing of Mycobacteria, *Nocardiae*, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard. NCCLS document M24–A, USA.
164. **Nuermberger, E. L., T. Yoshimatsu, S. Tyagi, R. J. O'Brien, A. N. Vernon, R. E. Chaisson, W. R. Bishai, and J. H. Grosset.** 2004. Moxifloxacin-containing regimen greatly reduces time to culture conversion in murine tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **169**:421–6.
165. **Nunn, P., J. Porter, and P. Winstanley.** 1993. Thiacetazone—avoid like poison or use with care? *Trans R Soc Trop Med Hyg* **87**:578–82.
166. **O'Brien, R. J., M. A. Lyle, and D. E. Snider, Jr.** 1987. Rifabutin (ansamycin LM 427): a new rifamycin–S derivative for the treatment of mycobacterial diseases. *Rev Infect Dis* **9**:519–30.
167. **Onyebujoh, P., A. Zumla, I. Ribeiro, R. Rustomjee, P. Mwaba, M. Gomes, and J. M. Grange.** 2005. Treatment of tuberculosis: present status and future prospects. *Bull World Health Organ* **83**:857–65.
168. **O'Sullivan, C. E., D. R. Miller, P. S. Schneider, and G. D. Roberts.** 2002. Evaluation of Gen–Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test by using respiratory and nonrespiratory specimens in a tertiary care center laboratory. *J Clin Microbiol* **40**:1723–7.
169. **Otal, I., S. Samper, M. P. Asensio, M. A. Vitoria, M. C. Rubio, R. Gomez–Lus, and C. Martín.** 1997. Use of a PCR method based on IS6110 polymorphism for typing *Mycobacterium tuberculosis* strains from BACTEC cultures. *J Clin Microbiol* **35**:273–7.
170. **Parsons, L. M., R. Brosch, S. T. Cole, A. Somoskovi, A. Loder, G. Bretzel, D. Van Soolingen, Y. M. Hale, and M. Salfinger.** 2002. Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR–based genomic deletion analysis. *J Clin Microbiol* **40**:2339–45.
171. **Pfyffer, G. E.** 2007. *Mycobacterium*: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures., p. 543–72. A: P. R. Murray, Baron E.J., Jorgensen J.H., Landry M.L., Pfaller M.A. (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed, vol. 1. ASM PRESS, Washington, D.C.

172. **Pfyffer, G. E., D. A. Bonato, A. Ebrahimzadeh, W. Gross, J. Hotaling, J. Kornblum, A. Laszlo, G. Roberts, M. Salfinger, F. Wittwer, and S. Siddiqi.** 1999. Multicenter laboratory validation of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against classical second-line and newer antimicrobial drugs by using the radiometric BACTEC 460 technique and the proportion method with solid media. *J Clin Microbiol* **37**:3179–86.
173. **Picard, B.** 2000. Molecular epidemiology of large bacterial endemics in Sub-Saharan Africa. *Bull Soc Pathol Exot* **93**:219–23.
174. **Picard, F. J., and M. G. Bergeron.** 2002. Rapid molecular theranostics in infectious diseases. *Drug Discov Today* **7**:1092–101.
175. **Picardeau, M., G. Prod'Hom, L. Raskine, M. P. LePennec, and V. Vincent.** 1997. Genotypic characterization of five subspecies of *Mycobacterium kansasii*. *J Clin Microbiol* **35**:25–32.
176. **Piersimoni, C., A. Callegaro, C. Scarparo, V. Penati, D. Nista, S. Bornigia, C. Lacchini, M. Scagnelli, G. Santini, and G. De Sio.** 1998. Comparative evaluation of the new gen-probe *Mycobacterium tuberculosis* amplified direct test and the semiautomated abbot LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* **36**:3601–4.
177. **Piersimoni, C., A. Olivieri, L. Benacchio, and C. Scarparo.** 2006. Current Perspectives on Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Complex: the Automated Nonradiometric Systems. *J Clin Microbiol* **44**:20–8.
178. **Piersimoni, C., and C. Scarparo.** 2003. Relevance of commercial amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. *J Clin Microbiol* **41**:5355–65.
179. **Piersimoni, C., C. Scarparo, P. Piccoli, A. Rigon, G. Ruggiero, D. Nista, and S. Bornigia.** 2002. Performance assessment of two commercial amplification assays for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex from respiratory and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* **40**:4138–42.
180. **Plikaytis, B. B., J. T. Crawford, C. L. Woodley, W. R. Butler, K. D. Eisenach, M. D. Cave, and T. M. Shinnick.** 1993. Rapid, amplification-based fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Gen Microbiol* **139 (Pt 7)**:1537–42.
181. **Poulet, S., and S. T. Cole.** 1995. Characterization of the highly abundant polymorphic GC-rich-repetitive sequence (PGRS) present in *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Microbiol* **163**:87–95.
182. **Poulet, S., and S. T. Cole.** 1995. Repeated DNA sequences in mycobacteria. *Arch Microbiol* **163**:79–86.
183. **Protopopova, M., C. Hanrahan, B. Nikonenko, R. Samala, P. Chen, J. Gearhart, L. Einck, and C. A. Nacy.** 2005. Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. *J Antimicrob Chemother* **56**:968–74.

184. **Ramaswamy, S., and J. M. Musser.** 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis* **79**:3–29.
185. **Rastogi, N., Sola C.** 2007. Molecular evolution of the *Mycobacterium*, p. 53–92. A: J. C. Palomino, Leao, S. C., Ritacco, V. (ed.), *Tuberculosis 2007. From basic science to patient care*. www.TuberculosisTextbook.com, first ed.
186. **Raviglione, M. C., O'Brien, R.J..** 1998. Tuberculosis, p. 1149–61. A: A. Fauci, E. Braunwald, K. Isselbacher, J. Wilson, J. Martín, D. Kasper, S. Hauser, and D. Longo (ed.), *Harrison. Principios de Medicina Interna*, vol. 1. McGraw–Hill–Interamericana, Madrid.
187. **Raynaud, C., M. A. Laneelle, R. H. Senaratne, P. Draper, G. Laneelle, and M. Daffe.** 1999. Mechanisms of pyrazinamide resistance in mycobacteria: importance of lack of uptake in addition to lack of pyrazinamidase activity. *Microbiology* **145 (Pt 6)**:1359–67.
188. **Rengarajan, J., C. M. Sasseti, V. Naroditskaya, A. Sloutsky, B. R. Bloom, and E. J. Rubin.** 2004. The folate pathway is a target for resistance to the drug para-aminosalicylic acid (PAS) in mycobacteria. *Mol Microbiol* **53**:275–82.
189. **Richter, E., S. Niemann, S. Rusch–Gerdes, and S. Hoffner.** 1999. Identification of *Mycobacterium kansasii* by using a DNA probe (AccuProbe) and molecular techniques. *J Clin Microbiol* **37**:964–70.
190. **Riley, R. L.** 1957. Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Tuberc* **76**:931–41.
191. **Rodríguez, P., F. March, M. Garrigó, C. Moreno, J. Barrio, M. Gurgui, M. A. Sambeat, and P. Coll.** 1996. Infeccion diseminada por *Mycobacterium genavense* en pacientes con infeccion por HIV. Descripcion de 5 casos y revision de la literatura. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **14**:220–6.
192. **Ross, B. C., K. Raios, K. Jackson, and B. Dwyer.** 1992. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J Clin Microbiol* **30**:942–6.
193. **Rouse, D. A., J. A. DeVito, Z. Li, H. Byer, and S. L. Morris.** 1996. Site-directed mutagenesis of the *katG* gene of *Mycobacterium tuberculosis*: effects on catalase–peroxidase activities and isoniazid resistance. *Mol Microbiol* **22**:583–92.
194. **Sacchettini, J. C., and J. S. Blanchard.** 1996. The structure and function of the isoniazid target in *M. tuberculosis*. *Res Microbiol* **147**:36–43.
195. **Santin, M., and F. Alcaide.** 2003. *Mycobacterium kansasii* disease among patients infected with human immunodeficiency virus type 1: improved prognosis in the era of highly active antiretroviral therapy. *Int J Tuberc Lung Dis* **7**:673–7.
196. **Santin, M., F. Alcaide, M. A. Benitez, A. Salazar, C. Ardanuy, D. Podzamczer, G. Rufi, J. Dorca, R. Martín, and F. Gudiol.** 2004. Incidence and molecular typing of *Mycobacterium kansasii* in a defined geographical area in Catalonia, Spain. *Epidemiol Infect* **132**:425–32.

197. **Saraigas, M.** 2004. Gen-Probe AccuProbe Mycobacterial Culture Identification Test, p. 7.6.2.1–7.6.2.3. A: H. D. Isenberg (ed.), Clinical Microbiology Procedures Handbook, vol. 2. ASM PRESS, Washington, D.C.
198. **Saribas, Z., T. Kocagöz, A. Alp, and A. Günalp.** 2003. Rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates by heteroduplex analysis and determination of rifamycin cross-resistance in rifampin-resistant isolates. J Clin Microbiol **41**:816–8.
199. **Scarparo, C., P. Piccoli, A. Rigon, G. Ruggiero, M. Scagnelli, and C. Piersimoni.** 2000. Comparison of enhanced *Mycobacterium tuberculosis* amplified direct test with COBAS AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and extrapulmonary specimens. J Clin Microbiol **38**:1559–62.
200. **Scarparo, C., P. Ricordi, G. Ruggiero, and P. Piccoli.** 2004. Evaluation of the fully automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide, streptomycin, isoniazid, rifampin, and ethambutol and comparison with the radiometric BACTEC 460TB method. J Clin Microbiol **42**:1109–14.
201. **Schwoebel, V., C. S. Lambregts-van Weezenbeek, M. L. Moro, F. Drobniowski, S. E. Hoffner, M. C. Raviglione, and H. L. Rieder.** 2000. Standardization of antituberculosis drug resistance surveillance in Europe. Recommendations of a World Health Organization (WHO) and International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) Working Group. Eur Respir J **16**:364–71.
202. **Scorpio, A., P. Lindholm-Levy, L. Heifets, R. Gilman, S. Siddiqi, M. Cynamon, and Y. Zhang.** 1997. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother **41**:540–3.
203. **Scorpio, A., and Y. Zhang.** 1996. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. Nat Med **2**:662–7.
204. **Shah, N. S., A. Wright, G. H. Bai, L. Barrera, F. Boulahbal, N. Martín-Casabona, F. Drobniowski, C. Gilpin, M. Havelkova, R. Lepe, R. Lumb, B. Metchock, F. Portaels, M. F. Rodrigues, S. Rusch-Gerdes, A. Van Deun, V. Vincent, K. Laserson, C. Wells, and J. P. Cegielski.** 2007. Worldwide emergence of extensively drug-resistant tuberculosis. Emerg Infect Dis **13**:380–7.
205. **Shinnick, T. M.** 1987. The 65-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol **169**:1080–8.
206. **Siddiqi, S., Saraigas M., LaBombardi V., Lee L.V.,.** 2004. Liquid Media for Isolation, p. 7.4.1.1–7.4.5.1. A: H. D. Isenberg (ed.), Clinical Microbiology Procedures Handbook, vol. 2. ASM PRESS, Washington, D.C.
207. **Siddiqi, S. H.** 1995. BACTEC 460 TB System. Product and procedure manual, revision D. Becton Dickinson Microbiology Systems.
208. **Silva, M. S., S. G. Senna, M. O. Ribeiro, A. R. Valim, M. A. Telles, A. Kritski, G. P. Morlock, R. C. Cooksey, A. Zaha, and M. L. Rossetti.** 2003. Mutations in *katG*,

- inhA*, and *ahpC* genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 41:4471–4.
209. Singh, P., C. Wesley, G. P. Jadaun, S. K. Malonia, R. Das, P. Upadhyay, J. Faujdar, P. Sharma, P. Gupta, A. K. Mishra, K. Singh, D. S. Chauhan, V. D. Sharma, U. D. Gupta, K. Venkatesan, and V. M. Katoch. 2007. Comparative evaluation of Lowenstein–Jensen proportion method, BacT/ALERT 3D system, and enzymatic pyrazinamidase assay for pyrazinamide susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 45:76–80.
 210. Small, P. M., P. C. Hopewell, S. P. Singh, A. Paz, J. Parsonnet, D. C. Ruston, G. F. Schecter, C. L. Daley, and G. K. Schoolnik. 1994. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. N Engl J Med 330:1703–9.
 211. Small, P. M., G. F. Schecter, P. C. Goodman, M. A. Sande, R. E. Chaisson, and P. C. Hopewell. 1991. Treatment of tuberculosis in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. N Engl J Med 324:289–94.
 212. Snider, D. E., Jr., G. D. Kelly, G. M. Cauthen, N. J. Thompson, and J. O. Kilburn. 1985. Infection and disease among contacts of tuberculosis cases with drug-resistant and drug-susceptible bacilli. Am Rev Respir Dis 132:125–32.
 213. Somoskovi, A., J. Dormandy, L. M. Parsons, M. Kaswa, K. S. Goh, N. Rastogi, and M. Salfinger. 2006. Sequencing of the *pncA* gene in members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex has important diagnostic applications: Identification of a species-specific *pncA* Mutation in *Mycobacterium canettii*, and the Reliable and Rapid Predictor of Pyrazinamide Resistance. J Clin Microbiol:595–9.
 214. Somoskovi, A., L. M. Parsons, and M. Salfinger. 2001. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Respir Res 2:164–8.
 215. Sreevatsan, S., X. Pan, K. E. Stockbauer, N. D. Connell, B. N. Kreiswirth, T. S. Whittam, and J. M. Musser. 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proc Natl Acad Sci U S A 94:9869–74.
 216. Sreevatsan, S., K. E. Stockbauer, X. Pan, B. N. Kreiswirth, S. L. Moghazeh, W. R. Jacobs, Jr., A. Telenti, and J. M. Musser. 1997. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. Antimicrob Agents Chemother 41:1677–81.
 217. Stead, W. W., K. D. Eisenach, M. D. Cave, M. L. Beggs, G. L. Templeton, C. O. Thoen, and J. H. Bates. 1995. When did *Mycobacterium tuberculosis* infection first occur in the New World? An important question with public health implications. Am J Respir Crit Care Med 151:1267–8.
 218. Steingrube, V. A., J. L. Gibson, B. A. Brown, Y. Zhang, R. W. Wilson, M. Rajagopalan, and R. J. Wallace, Jr. 1995. PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for

- taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* **33**:149–53.
219. Supply, P., C. Allix, S. Lesjean, M. Cardoso-Oelemann, S. Rusch-Gerdes, E. Willery, E. Savine, P. de Haas, H. van Deutekom, S. Roring, P. Bifani, N. Kurepina, B. Kreiswirth, C. Sola, N. Rastogi, V. Vatin, M. C. Gutierrez, M. Fauville, S. Niemann, R. Skuce, K. Kremer, C. Locht, and D. van Soolingen. 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **44**:4498–510.
220. Supply, P., E. Mazars, S. Lesjean, V. Vincent, B. Gicquel, and C. Locht. 2000. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* **36**:762–71.
221. Takiff, H. E., M. Cimino, M. C. Musso, T. Weisbrod, R. Martínez, M. B. Delgado, L. Salazar, B. R. Bloom, and W. R. Jacobs, Jr. 1996. Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:362–6.
222. Takiff, H. E., L. Salazar, C. Guerrero, W. Philipp, W. M. Huang, B. Kreiswirth, S. T. Cole, W. R. Jacobs, Jr., and A. Telenti. 1994. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother* **38**:773–80.
223. Taniguchi, H., H. Aramaki, Y. Nikaido, Y. Mizuguchi, M. Nakamura, T. Koga, and S. Yoshida. 1996. Rifampicin resistance and mutation of the *rpoB* gene in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* **144**:103–8.
224. Taylor, T. B., C. Patterson, Y. Hale, and W. W. Safranek. 1997. Routine use of PCR–restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. *J Clin Microbiol* **35**:79–85.
225. Telenti, A. 1998. Genetics and pulmonary medicine. 5. Genetics of drug resistant tuberculosis. *Thorax* **53**:793–7.
226. Telenti, A., F. Marchesi, M. Balz, F. Bally, E. C. Bottger, and T. Bodmer. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* **31**:175–8.
227. Telenti, A., W. J. Philipp, S. Sreevatsan, C. Bernasconi, K. E. Stockbauer, B. Wieles, J. M. Musser, and W. R. Jacobs, Jr. 1997. The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat Med* **3**:567–70.
228. Tenover, F. C., J. T. Crawford, R. E. Huebner, L. J. Geiter, C. R. Horsburgh, Jr., and R. C. Good. 1993. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Microbiol* **31**:767–70.
229. Tomioka, H. 2000. Prospects for development of new antimycobacterial drugs. *J Infect Chemother* **6**:8–20.
230. Tomioka, H., K. Sato, T. Akaki, H. Kajitani, S. Kawahara, and M. Sakatani. 1999. Comparative in vitro antimicrobial activities of the newly synthesized quinolone HSR-903, sitafloxacin (DU-6859a), gatifloxacin (AM-1155), and levofloxacin

- against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex. Antimicrob Agents Chemother **43**:3001–4.
231. **Torres, M. J., A. Criado, J. C. Palomares, and J. Aznar.** 2002. Detection of *rpoB* mutations in *Mycobacterium tuberculosis* with LightCycler technology. J Clin Microbiol **40**:735.
 232. **Tortoli, E.** 2006. The new mycobacteria: an update. FEMS Immunol Med Microbiol **48**:159–78.
 233. **Tortoli, E., M. Benedetti, A. Fontanelli, and M. T. Simonetti.** 2002. Evaluation of automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to four major antituberculous drugs: comparison with the radiometric BACTEC 460TB method and the agar plate method of proportion. J Clin Microbiol **40**:607–10.
 234. **Tortoli, E., R. Mattei, A. Savarino, L. Bartolini, and J. Beer.** 2000. Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility testing performed with BACTEC 460TB (Becton Dickinson) and MB/BacT (Organon Teknika) systems. Diagn Microbiol Infect Dis **38**:83–6.
 235. **Toungoussova, O. S., P. Sandven, A. O. Mariandyshev, N. I. Nizovtseva, G. Bjune, and D. A. Caugant.** 2002. Spread of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype in the Archangel Oblast, Russia. J Clin Microbiol **40**:1930–7.
 236. **Tsolaki, A. G., A. E. Hirsh, K. DeRiemer, J. A. Enciso, M. Z. Wong, M. Hannan, Y. O. Goguet de la Salmoniere, K. Aman, M. Kato-Maeda, and P. M. Small.** 2004. Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains. Proc Natl Acad Sci U S A **101**:4865–70.
 237. **Tudó, G.** 2004. Estudi de la transmissió de la tuberculosi en el context nosocomial i poblacional. Caracterització fenotípica i genotípica de soques de *Mycobacterium tuberculosis*. Universitat de Barcelona, Barcelona.
 238. **UITB.** 2000. Documento de consenso sobre tratamientos directamente observados en tuberculosis. Med Clin (Barc) **115**:749–57.
 239. **van Embden, J. D., M. D. Cave, J. T. Crawford, J. W. Dale, K. D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martín, R. McAdam, T. M. Shinnick, and et al.** 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol **31**:406–9.
 240. **Van Rie, A., R. Warren, M. Richardson, R. P. Gie, D. A. Enarson, N. Beyers, and P. D. Van Helden.** 2000. Classification of drug-resistant tuberculosis in an epidemic area. Lancet **356**:22–5.
 241. **Van Soolingen, D.** 2001. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. J Intern Med **249**:1–26.
 242. **van Soolingen, D., M. W. Borgdorff, P. E. de Haas, M. M. Sebek, J. Veen, M. Dessens, K. Kremer, and J. D. van Embden.** 1999. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. J Infect Dis **180**:726–36.

243. **Vidal, R., M. Miravittles, J. A. Caylà, M. Torrella, N. Martín, and J. de Gracia.** 1997. Estudio de contagio en 3071 contactos de enfermos con tuberculosis. *Med Clin (Barc)* **108**:361–5.
244. **Vincent V., G. M. C.** 2007. *Mycobacterium*: Laboratory Characteristics of Slowly Growing Mycobacteria, p. 573–88. A: P. R. Murray, Baron E.J., Jorgensen J.H., Landry M.L., Pfaller M.A (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed, vol. 1. ASM PRESS, Washington.
245. **Vukovic, D., S. Rusch-Gerdes, B. Savic, and S. Niemann.** 2003. Molecular epidemiology of pulmonary tuberculosis in belgrade, central serbia. *J Clin Microbiol* **41**:4372–7.
246. **Weitzman, I.** 2004. Acid-Fast Stains, p. 7.2.1–7.2.4. A: H. D. Isenberg (ed.), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2nd ed, vol. 2. ASM PRESS, Washington, D.C.
247. **WHO.** 2008. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report n° 4. WHO.
248. **WHO.** 2008. Global tuberculosis control-surveillance, planning, financing. WHO report 2008. WHO.
249. **Wilhelm, J., and A. Pingoud.** 2003. Real-time polymerase chain reaction. *ChemBiochem* **4**:1120–8.
250. **Woods G. L., W. N. G., Inderlied C.B.** 2007. Susceptibility Test Methods: Mycobacteria, *Nocardiae* and Other Actinomycetes, p. 1223–47. A: P. R. Murray, Baron E.J., Jorgensen J.H., Landry M.L., Pfaller M.A (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed, vol. 1. ASM PRESS, Washington, D.C.
251. **Woods, G. L.** 2001. Molecular techniques in mycobacterial detection. *Arch Pathol Lab Med* **125**:122–6.
252. **Yang, B., H. Koga, H. Ohno, K. Ogawa, M. Fukuda, Y. Hirakata, S. Maesaki, K. Tomono, T. Tashiro, and S. Kohno.** 1998. Relationship between antimycobacterial activities of rifampicin, rifabutin and KRM-1648 and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* **42**:621–8.
253. **Zahrt, T. C.** 2003. Molecular mechanisms regulating persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes Infect* **5**:159–67.
254. **Zhang, Y., B. Heym, B. Allen, D. Young, and S. Cole.** 1992. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* **358**:591–3.
255. **Zierski, M., and E. Bek.** 1980. Side-effects of drug regimens used in short-course chemotherapy for pulmonary tuberculosis. A controlled clinical study. *Tubercle* **61**:41–9.
256. **Zimhony, O., J. S. Cox, J. T. Welch, C. Vilcheze, and W. R. Jacobs, Jr.** 2000. Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med* **6**:1043–7.

Així, de la guerra de la natura, de la fam i de la mort, se segueix directament l'objecte més excels que podem concebre, és a dir, la producció dels animals superiors. Hi ha grandesa en aquesta concepció que la vida, amb els seus poders diversos, fou insuflada originàriament en unes poques formes o en una de sola; i que, mentre aquest planeta ha anat girant d'acord amb la llei fixa de la gravetat, hi evolucionem i hi evolucionem, a partir d'un comerç tan simple, infinitat de formes de les més belles i maravolloses.

L'origen de les espècies.
Charles Darwin, 1859.

