

## **RESISTÈNCIES ALS PRINCIPALS FÀRMACS ANTITUBERCULOSOS. IMPORTÀNCIA, DETECCIÓ I ALTERACIONS GENÈTIQUES ASSOCIADES**

JULIÀ GONZÁLEZ I GRISELDA TUDÓ

*Servei de Microbiologia, Hospital Clínic de Barcelona, IDIBAPS.*

Adreça per a la correspondència: Julià González. Servei de Microbiologia,  
Hospital Clínic. Villarroel, 170. 08036 Barcelona. Adreça electrònica: *juliangonzalez@ub.edu*.

### **RESUM**

Anualment es declaren de vuit a nou milions de casos de tuberculosi al món, amb gairebé dos milions de morts. El 10 % dels casos són resistents a algun dels fàrmacs. Diferents factors influeixen en les resistències, com el tractament previ, la immigració, i les condicions socioeconòmiques. Per determinar les resistències existeixen diferents mètodes. Els fenotípics, basats en l'antibiograma, són els més estesos i de referència, però presenten l'inconvenient de necessitar de tres a quatre setmanes per al resultat. En els darrers anys s'han comercialitzat variants basades en medis líquids, amb lectura semiautomatitzada, que escurcen el temps a una o dues setmanes. Els mètodes genotípics, basats en la detecció de mutacions responsables de resistència, es preveuen com l'alternativa potencial. Tot i que no es coneixen totes les mutacions responsables de resistència, les dels fàrmacs més importants han estat estudiades a bastament. Actualment es treballa en la implementació de tècniques per detectar directament les mutacions en les mostres. La tecnologia de PCR a temps real suposa una eina útil per a aquesta estratègia. Els reptes de futur són incrementar la sensibilitat de les tècniques de detecció directa en les mostres i establir clarament el poder de transmissió i la virulència de les soques resistents.

**Paraules clau:** tuberculosi, tractament, resistència, mutacions i transmissió.

### **SUMMARY**

From 8-9 million cases of tuberculosis and two million deaths from this disease are declared yearly around the world. Ten percent of the cases are resistant to some of the drugs used in the treatment of tuberculosis. Different factors are related to drug resistance such as previous treatment and immigration as well as economic conditions. Different techniques may be used to determine drug resistance, with phenotypic methods based on sensitivity tests being the most commonly used, and these methods are considered to be the reference ones. Nonetheless, 3-4 weeks are required to achieve reliable results. In recent years attempts have been made to

shorten the incubation time with methods based on liquid media and semi-automatic readings providing results within 1-2 weeks. Another potential alternative is genotyping methods based on the detection of resistance mutations. Although, to date, not all resistance mutations have been determined, those with resistance to the most important drugs have been widely studied and techniques for direct detection of mutations in samples are currently under study. Future challenges include the development of techniques which increase the sensitivity of direct detection methods in samples and the establishment of the transmission power and virulence of resistant strains.

**Keywords:** tubercle, treatment, resistance, mutations, transmission.

## LA TUBERCULOSI AL MÓN: INCIDÈNCIA I SITUACIÓ ACTUAL

La tuberculosi acompanya l'espècie humana des de fa milers d'anys i continua essent a l'inici del segle XXI una de les malalties infeccioses amb més incidència i mortalitat del món (OMS, 2003). Durant la llarga etapa preantibiòtica, el 50 % dels malalts morien i el 25 % es curaven amb seqüeles.

En gran mesura, la seva persistència és deguda a la capacitat d'adaptació que té el bacteri que causa la malaltia, *Mycobacterium tuberculosis*. Aquesta capacitat d'adaptació s'evidencia en diferents aspectes vinculats a l'estructura lipídica de la seva paret i al seu metabolisme lent que, contràriament al que podria semblar, li proporciona avantatges, com la resistència a condicions ambientals adverses, la resistència a la immunitat local i sistèmica, la lenta resposta als antibiòtics i la capacitat de romandre latent durant anys. En la pràctica es tradueix en tres de les barreres més importants que es troben els programes de control i eradicació de la malaltia: primer, les persones infectades, que mantenen de manera latent un petit nombre de bacteris i poden desenvolupar la malaltia en qualsevol moment de la seva vida. Per tant, mentre hi hagi infectats hi haurà malalts. Segon, la llarga durada del tractament afavoreix que s'incompleteixi, sobretot després de les primeres setmanes, quan ja han desaparegut els símptomes, cosa que dificulta el guariment total. Tercer, no existeix una vacuna eficaç que permeti iniciar una cam-

panya mundial de gran abast per prevenir o disminuir la incidència de la malaltia o de la infecció.

Dades recents de l'OMS (OMS, 2003) indiquen que un terç de la població mundial està infectada. Tanmateix, es declaren al voltant de vuit a nou milions de casos anuals de tuberculosi, amb gairebé dos milions de morts (aproximadament cinc mil cada dia). Aquestes xifres tan elevades no repercuteixen a tot arreu per igual. Així, més del 80 % dels casos es localitzen en vint-i-dos països, que, amb l'excepció de Rússia i el Brasil, que poden considerar-se emergents, són països pobres. Entre els factors més importants que influeixen en la incidència destaquen la pobresa, cada cop més agreujada per l'augment demogràfic i la manca de millora econòmica, i la pandèmia del VIH, que des de la seva aparició ha causat un augment dels casos de tuberculosi fins i tot als països industrialitzats, en causar una supressió de la immunitat cel·lular. Per aquestes raons, l'OMS va llençar el 1994 una campanya on considerava la tuberculosi com una emergència mundial i es proposà la difusió de tractaments directament supervisats per assegurar-ne el compliment íntegre i la curació. Aquesta estratègia s'anomena *DOT* (*direct observed treatment*) i constitueix la base del control actual de la malaltia. Malgrat tot, l'epidèmia segueix sense disminucions significatives, llevat dels països desenvolupats, fonamentalment pel seu lligam amb el VIH i les condicions socioeconòmiques.

A Espanya la situació és heterogènia a les

diferents comunitats autònomes, i es concentra més en ciutats grans i regions del nord, com Galícia. En conjunt es pot considerar que la incidència mitjana estaria al voltant de trenta-dos casos per cada cent mil habitants. Durant els darrers anys vuitanta i els primers anys noranta, hi hagué un important augment del nombre de casos, atribuïts en gran mesura a l'epidèmia del VIH (Balagué *et al.*, 2003). A partir de la introducció dels tractaments antiretrovirals actuals i la millora del control, hi ha hagut una disminució, que en alguns llocs com Catalunya ha estat fins i tot del 54 % (Balagué *et al.*, 2003).

El repte de la tuberculosi a curt i mig termini no és el mateix a tot arreu del món. Als països pobres és un problema de control molt lligat a les condicions socioeconòmiques i al VIH. Als països industrialitzats el repte és la tuberculosi en immigrants. No únicament per la repercussió que té en la incidència, sinó perquè presenta problemes de control que requereixen solucions diferents a les utilitzades per a la població autòctona.

## **BASES DEL TRACTAMENT I POBLACIONS BACTERIANES EN LES LESIONS TUBERCULOSES**

El 1944 s'inicià l'etapa antibiòtica en el tractament de la tuberculosi, amb la introducció de l'estreptomicina. Poc després s'introduïren el PAS (àcid p-aminosalicílic, 1946) i la isoniazida (1952). Inicialment s'usaren en règim de monoteràpia, però ràpidament es veié que després d'unes setmanes de millora clínica i radiològica la malaltia tornava a la situació anterior. La millora inicial s'atribuí a l'eliminació dels bacteris sensibles, amb la selecció dels resistents, que assoleixen la concentració inicial coincidint amb el retorn de la clínica. El 1958 s'introdueix la primera pauta combinada, usant els fàrmacs existents. Més tard apareixen l'etambutol (1968) i la rifampicina (1972), i comencen les pautes de nou mesos.

En els anys vuitanta, amb la introducció de la pirazinamida, s'iniciaren les pautes de sis mesos. Actualment, l'esquema de tractament es compon de dues fases, una inicial d'atac amb tres o quatre fàrmacs, en la qual s'eliminen la majoria dels bacteris de les lesions, i una segona fase de seguiment, amb dos fàrmacs, en la qual s'elimina la població latent, menys activa metabòlicament.

Les resistències de *M. tuberculosis* als fàrmacs són d'origen cromosòmic i no s'han trobat resistències relacionades amb plasmidis o altres mecanismes coneguts. Actualment s'accepta que poden sorgir mutants resistents de manera espontània, sense haver-se exposat prèviament al tractament, cosa que explicaria casos de resistència inicial sense que es coneguin antecedents de resistència en els seus contactes. A més, els mutants resistents poden ser seleccionats per tractament inadequat, i poden causar resistència a altres fàrmacs i augmentar el grau de resistència al fàrmac inicial.

En estudis duts a terme en els anys seixanta, Canetti i Grosset (1961) van establir que la freqüència de les mutacions espontànies no era la mateixa per als diferents fàrmacs. Determinaren que els mutants resistents apareixien en un de cada  $10^{5-10^7}$  bacteris per a la isoniazida, l'etambutol i l'estreptomicina, un de cada  $10^7-10^9$  per a la rifampicina i un de cada  $10^2-10^4$  per a la pirazinamida. La freqüència d'aparició de mutants resistents a més d'un fàrmac serà igual a la suma de les freqüències individuals. També s'establí el nombre de bacteris presents en els diferents tipus de lesions, des de  $10^3-10^5$  en infiltrats de poca extensió fins a  $10^8-10^9$  en lesions cavitades, i va quedar pales que el tractament amb un sol fàrmac és insuficient i en una alta proporció de casos desembocaria en resistència. La utilització de tres o quatre fàrmacs de manera simultània fa impossible l'aparició de mutants resistents a tots.

El 1979 Mitchison va definir les diferents poblacions bacilars presents a les lesions. Hi

hauria una primera població metabòlicament activa, extracel·lular, que creix en pH neutre i amb tensió d'oxigen elevada, que correspondria a la major part dels bacteris ( $10^8$ - $10^9$ ). La isoniazida seria el fàrmac més actiu per a aquesta població. Una segona població estaria formada per  $10^3$ - $10^5$  bacteris intracel·lulars que creixen a pH àcid. La pirazinamida seria el fàrmac més eficaç. Una tercera població seria la formada per bacteris poc actius, que es multipliquen esporàdicament i que estarien a l'interior de lesions de *caseum*. Quedaria una darrera població, molt poc nombrosa, no activa i latent durant llargs períodes i, per tant, no susceptible als fàrmacs (Mitchison, 1979). Tret de la primera població, les altres estarien implicades en les recidives, en les reactivacions endògenes i en l'explicació de per què el tractament ha de ser tan llarg. Aquest esquema de poblacions bacil·lars no explica totalment aspectes relacionats amb la latència i amb la reactivació ni la bona resposta que té en general el tractament profilàctic de la infecció. Malgrat això, continua essent vàlid.

No tots els fàrmacs actuen igual pel que fa a les lesions. El que interessa és que hi hagi acció bactericida per disminuir de manera important el nombre de bacteris i acció esterilitzant per eliminar els bacteris poc actius. La isoniazida seria el fàrmac més bactericida, mentre que la rifampicina i la pirazinamida serien els més esterilitzants. La resta dels fàrmacs, llevat dels aminoglucòsids, tindrien activitat bacteriostàtica.

### CONCEPTE DE RESISTÈNCIA ALS FÀRMACS. RESISTÈNCIA MICROBIOLÒGICA I RESISTÈNCIA CLÍNICA

En termes generals, parlem de resistència quan el tractament perd parcialment o totalment la seva eficàcia. Des d'un punt de vista clínic, l'evolució esperada del pacient envers

la curació no succeeix com s'espera, amb persistència o reaparició dels símptomes i signes. Per diferenciar la resistència d'una resposta lenta o un mal acompliment del tractament, s'estableixen uns criteris de resistència en el maneig dels pacients: a) persistència de la clínica als dos mesos d'iniciar el tractament, b) recaiguda de la malaltia pocs mesos després de finalitzar correctament el tractament, c) persistència de bacil·loscòpia positiva en les mostres als quatre mesos de tractament. Un factor addicional que recolza la sospita és l'antecedent de tuberculosi anterior sense resposta al tractament.

El concepte epidemiològic de resistència es basa en l'observació i l'aïllament de bacteris en cultius de les mostres després d'iniciar el tractament. Es considera que cal esperar quatre mesos abans no considerem que el tractament fracassa, tot i que en molts països els programes de control indiquen canvis en el tractament si als dos mesos s'observen bacteris a les mostres.

No obstant això, la confirmació de la resistència només pot fer-se amb mitjans microbiològics que comprovin l'eficàcia de cada fàrmac. L'antibiograma és la prova de referència que permet confirmar la resistència a cada fàrmac. Actualment es considera que quan l'1 % de la població bacteriana present és resistent a una concentració prèviament fixada de l'antibiòtic, cal entendre que el bacteri és resistent al fàrmac.

### CLASSIFICACIÓ EPIDEMIOLÒGICA DE LES RESISTÈNCIES

Des d'una perspectiva individual, tenir una soca resistent presenta pocs matisos. Però des del punt de vista epidemiològic és important definir l'origen de la resistència. La classificació de les resistències ha canviat diverses vegades al llarg dels anys. L'objectiu sempre ha estat diferenciar els casos previsibles dels que no ho són. Recentment l'OMS ha definit

les següents categories (OMS/IUATLD, 2000; Schwoebel *et al.*, 2000):

a) Resistències en casos nous: soques aïllades de malalts sense antecedents de tractament previ o que n'han rebut durant menys d'un mes. Corresponen al que es coneixia com a *resistències primàries*.

b) Resistències en casos tractats: soques aïllades en malalts que ja han rebut tractament previ durant més d'un mes. Corresponen al que es coneixia com a *resistències adquirides*.

c) Resistència combinada: suma de totes les resistències en una àrea determinada. Indica la càrrega de soques resistents que hi ha en una comunitat.

d) Multiresistència: resistència conjunta com a mínim a la isoniazida i a la rifampicina.

e) Poliresistència: resistència a més d'un fàrmac però sense que inclogui simultàniament la isoniazida i la rifampicina.

La nova denominació de resistències en casos nous i casos prèviament tractats, en lloc de primàries i adquirides, és una diferenciació semàntica que classifica més adequadament les resistències pel que fa a l'antecedent de tractament previ, sense entrar en la discussió de com es va generar la resistència, aspecte que en molts casos és impossible de provar. Així, en el concepte de *primàries* podrien entrar casos que es van contagiar amb una soca resistent, casos que han generat espontàniament la resistència durant el tractament i també casos tractats prèviament que desenvolupen resistència per a una soca que no correspon a l'episodi previ, sinó a un nou contagi. De la mateixa manera, el concepte de *resistència adquirida* va incloure malalts que havien fet bé el tractament i malalts que no i, per tant, amb gènesi o no de resistències vinculades a aquest tractament.

La diferenciació entre aquests dos tipus de resistències té importants implicacions epidemiològiques, ja que tradicionalment s'entén que les resistències en casos prèviament tractats tradueixen mancances de funcionament dels programes de control, ja que es generen

durant el tractament i són les que amb una bona gestió es poden corregir per no comprometre el control futur.

## SITUACIÓ ACTUAL DE LES RESISTÈNCIES AL MÓN

Entre 1994 i 1999 es va dur a terme un estudi de l'OMS i de la UNION (International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases) per avaluar les resistències a fàrmacs de primera línia en diferents països del món (OMS/IUATLD, 2000; Espinal, 2003). Malgrat que només participaren setanta-dos països o zones geogràfiques i que el 50 % dels vint-i-dos països amb més tuberculosi no hi estaven inclosos, ha estat l'estudi de més abast que s'ha fet mai. En el 58 % dels països participants s'observa una incidència de resistència a algun fàrmac en més del 10 % dels casos nous.

Les resistències més elevades s'observen en països africans, del sud-est asiàtic, algunes zones de l'Amèrica del Sud i zones de l'antiga URSS. Catorze països tenen 3 % o més de casos multiresistents en casos nous i en quatre són més del 9 % (la Xina, Rússia, Lituània i Estònia). Als països africans la situació és poc coneguda a causa de la baixa participació, però les dades disponibles fan pensar que com a mínim es mouen en resistències en casos nous superiors al 10 %. A l'Àsia la situació és preocupant en zones de la Xina on no hi ha cobertura del tractament DOT i on s'han comptat centenars de casos multiresistents. Tanmateix, es desconeix la situació exacta en cinc dels països amb més casos de tuberculosi del món (Xina, Índia, Indonèsia, Bangladesh i Pakistan).

Als EUA s'observà una incidència de resistències en casos nous superior al 10 %, sobretot a causa de brots de multiresistència en diferents punts del país, sobretot a Nova York (Frieden *et al.*, 1993).

En alguns punts d'Europa de l'Est, com Estònia, Lituània i àrees de Rússia, sobretot en

institucions penitenciàries, la prevalença de resistències és la més elevada del món, probablement relacionada amb mancances de finançament dels programes sanitaris després de la caiguda de la Unió Soviètica i el descontrol en l'administració dels fàrmacs del tractament. Tampoc no es coneix la situació en zones políticament inestables com alguns països balcànics i repúbliques asiàtiques exsoviètiques.

A Europa occidental s'observen dues situacions diferents: països que han augmentat la seva prevalença respecte a anys anteriors, a causa de l'arribada de població immigrant, que constitueixen el gruix de les resistències i dels casos de tuberculosi, com són Holanda, Dinamarca, França o la Gran Bretanya, i països que han disminuït respecte a la situació anterior i que reben poca població immigrant, com pot ser Portugal (March, 2001).

A Espanya les resistències en casos nous estan al voltant del 4,5 % amb un 0,4 % de multiresistents. Les resistències en casos tractats estarien entre l'11 i el 45 % amb una mitjana del 24 % (March, 2001). Aquestes xifres de resistència comparables a les de molts països europeus criden l'atenció en un país amb una de les incidències de tuberculosi i sida més elevades del continent (OMS, 1998; Global AIDS, 2000) i amb una manca de política de control nacional ben organitzada. Alguns autors (March, 2001) han assenyalat que seria a causa de la conjunció de diferents factors, com la inexistència d'augment de les resistències a causa del VIH l'existència d'una xarxa interdisciplinària no organitzada de professionals que cobreixen els diferents aspectes de la tuberculosi.

## **IMPACTE DE DIFERENTS FACTORS EPIDEMIOLÒGICS EN LA RESISTÈNCIA AL TRACTAMENT DE LA TUBERCULOSI**

Segons les dades de l'estudi de l'OMS i la UNION (OMS/IUATLD, 2000), actualment

cal considerar la influència de quatre factors: la immigració de països pobres a països industrialitzats, l'edat dels pacients, l'antecedent de tractament previ i l'epidèmia del VIH.

### **Immigració**

En països industrialitzats que reben població immigrant des de fa anys, la prevalença de tuberculosi entre la població immigrant és superior a l'autòctona (OMS/IUATLD, 2000; March, 2001). La majoria d'immigrants desenvolupen tuberculosi en els dos a cinc anys següents a la seva arribada, cosa que suggereix que la major part de contactes es van fer al país d'origen. La prevalença de tuberculosi resistent també és superior en immigrants, cosa que probablement tradueix la situació en l'origen. No obstant això, la prevalença de multiresistència és similar a l'autòctona, cosa que possiblement indica que és un fenomen d'uns pocs països i la majoria d'immigrants no en provenen.

### **Tractament previ**

L'antecedent de tractament previ és un important predictor de resistència, sobretot de multiresistència (OMS/IUATLD, 2000). Malgrat tot, no tots els pacients que han rebut tractament previ tenen més risc que els que es diagnostiquen per primera vegada. Hi ha pacients que recidiven després d'un tractament correcte, per manca de total eliminació de les poblacions bacterianes; n'hi ha que tenen un segon episodi per reinfecció amb una soca diferent, altres recauen després d'abandonar completament el tractament abans d'acabar i altres tenen un segon episodi després de seguir el tractament de manera parcial, ja sigui voluntàriament o per intolerància o manca d'absorció d'algun dels fàrmacs. Aquests darrers són els candidats a desenvolupar resistència. Malgrat aquests importants matisos,

en la pràctica es fa difícil esbrinar exactament davant de quin cas ens trobem i s'analitzen conjuntament.

### Edat

S'ha relacionat l'edat superior a seixanta-cinc anys amb més risc de resistència (OMS/IUATLD, 2000). Diverses hipòtesis ho podrien explicar. Podria ser degut a una disminució actual de les soques resistents, ja que les persones de més edat serien dipositàries de soques resistents del passat. També s'ha dit que per l'edat haurien tingut major possibilitat d'exposició a les soques resistents. La primera hipòtesi es refermaria amb la constatació que la prevalença de resistències a rifampicina i etambutol no seria major en aquesta franja d'edat. Això s'explica pel fet que són fàrmacs d'introducció més recent en el temps.

### VIH

Segons una perspectiva teòrica seria raonable pensar que hi ha relació entre VIH i resistència al tractament de la tuberculosi, ja que la tuberculosi té més incidència en els seropositius, la contribució de la immunitat en la curació és menor, amb una major proporció de recidives i part dels malalts VIH pertanyen a col·lectius marginats que poden seguir amb més dificultats el tractament.

Durant els anys noranta es van descriure als EUA una sèrie de brots de tuberculosi que afectaven població marginal i amb VIH, amb resistències en casos nous del 23 % i multiresistències del 7 % (Frieden *et al.*, 1993). Aquests brots aparegueren en un context de relaxament de les mesures de control i foren causa d'alarma a tot el món, i es va considerar que la infecció de VIH tenia un paper fonamental en el desenvolupament de les resistències. A la resta de països industrialitzats, tret d'alguns brots, aquestes previsions no es

confirmaren. A Espanya s'han dut a terme més de vint estudis en els darrers quinze anys i la majoria recolzen la tesi de la no-influència del VIH en les resistències (March, 2001).

L'únic estudi realitzat a escala mundial (OMS/IUATLD, 2000) conclou que no existeix aquesta relació, tot i que el VIH pot afavorir la disseminació de soques resistents en comunitats tancades. Tot i així, en els països on més coexistència hi ha de VIH i tuberculosi, subsaharians i sud-est asiàtic, gairebé no s'han realitzat estudis i cal ser prudents abans de descartar aquesta relació amb investigacions més extenses.

### MÈTODES PER A LA DETECCIÓ DE RESISTÈNCIES

Els mètodes per detectar les resistències de *M. tuberculosis* als fàrmacs es poden classificar en tres grans categories: mètodes fenotípics, basats a demostrar l'acció directa dels antibiòtics sobre els bacteris, mètodes fenotípics no convencionals, que es basen en la demostració de propietats o característiques fenotípiques per mètodes diferents a la interacció microorganisme/fàrmac i mètodes genètics, que demostren directament les mutacions o alteracions genètiques que causen la resistència.

### MÈTODES FENOTÍPICIS CONVENCIONALS

Es basen en la realització de l'antibiograma amb els fàrmacs utilitzats en el tractament. En els anys seixanta, l'OMS va encomanar a un grup d'experts el disseny de la metodologia per realitzar l'antibiograma. La principal peculiaritat de *M. tuberculosis* era la lentitud en el creixement que feia invàlids els mètodes usats per a altres bacteris. Es va proposar la utilització de medis sòlids amb tres sistemes diferents d'interpretació, que es van anomenar *mètode de les concentracions absolutes*, *mètode*

de la ratio de resistència i mètode de les proporcions crítiques. Tots es basen en la utilització de concentracions fixes d'antibiòtic capaces de diferenciar sensibilitat de resistència. El mètode de les proporcions crítiques va esdevenir ràpidament el més utilitzat, perquè era menys estricta en el càlcul de l'inòcul i actualment la majoria de mètodes se'n deriven (Canetti *et al.*, 1963).

En el mètode de les proporcions crítiques s'analitza la resposta de dues concentracions conegudes de bacteri a una determinada concentració d'antibiòtic (crítica). Quan més de l'1 % de la població del bacteri és capaç de créixer en presència del fàrmac, es considera que la soca en qüestió és resistent al fàrmac. El mètode fou validat en models animals i posteriorment s'ha usat com a referència a l'hora d'estandarditzar nous mètodes. Inicialment s'avaluà en medi de Lowenstein-Jensen, tot i que poc després als EUA es validà pels medis Middlebrook 7H10 i 7H11. Des de l'inici de la utilització dels antibiogrames diferents factors n'han limitat la difusió: *a)* la lentitud de creixement del bacteri, que feia necessàries tres o quatre setmanes per obtenir un resultat; *b)* certa complexitat en la realització, que va recloure la tècnica a centres grans i de referència; *c)* la bioseguretat, que restringí l'ús a centres amb instal·lacions adients i *d)* el cost, que feia i fa que no s'assumeixi en molts centres de països desenvolupats i en pràcticament cap país pobre, on hi ha la majoria dels malalts.

Per aquestes raons, des dels anys setanta i vuitanta es realitzaren esforços per trobar alternatives que permetessin obviar alguns d'aquests inconvenients. Fins als anys vuitanta, la majoria de les alternatives van ser optimitzacions del mètode sòlid, com l'ús directe de mostres amb baciloscòpia positiva, sense cultiu previ, l'ús de capes fines d'agar i observació microscòpica del creixement de microcolònies. Més recentment l'ús de tires Etest impregnades d'antibiòtic s'ha promogut com un mètode senzill, amb l'avantatge que determina directament la concentració mínima

inhibitòria (CMI) de l'antibiòtic. També, per fer òptim el cost i fer-ne possible l'ús en països pobres, s'han proposat opcions en medis d'agar que preveuen només usar els antibiòtics més importants (isoniazida i rifampicina) a concentracions concretes, de manera que el cost estaria al voltant d'un o dos dòlars (Heifets i Cangelosi, 1999).

Probablement, on s'ha fet més èmfasi ha estat a escurçar el temps necessari per tenir un resultat. Així, els antibiogrames amb medi sòlid d'agar o Lowenstein-Jensen s'han intentat a partir de la mostra directa sense fer el cultiu. Els dos aspectes a controlar són les contaminacions i l'inòcul. Tot i que la reproductibilitat respecte al mètode indirecte és superior al 95 % quan la baciloscòpia és intensament positiva, la necessitat d'estandardització en cada centre n'ha impedit la difusió (Heifets i Cangelosi, 1999).

La utilització de medis de cultiu líquids amb lectura semiautomatitzada és l'alternativa més estesa actualment per tenir resultats ràpids. El mètode radiomètric BACTEC 460 és actualment en països desenvolupats el mètode més utilitzat, i s'ha convertit en referència conjuntament amb els basats en medi sòlid com Lowenstein-Jensen i Middlebrook 7H10 i 7H11. Es basa en la detecció radiomètrica de creixement, ja que el bacteri consumeix una font de carboni marcada amb  $C_{14}$  que és eliminada en forma de  $CO_2$ . Està estandarditzat per a fàrmacs de primera línia i té un ús potencial per a fàrmacs de segona línia. Els avantatges més importants respecte als mètodes amb agar són un càlcul de l'inòcul més senzill, una lectura més estandarditzada i l'obtenció d'un resultat en menys temps, entre set i dotze dies en lloc de quatre setmanes. Els inconvenients més importants són un cost cinc o deu vegades superior i l'ús de substàncies radioactives.

En els darrers anys s'han desenvolupat mètodes semiautomatitzats no radiomètrics per al cultiu que tenen aplicació per a l'antibiograma. Els més coneguts són el *mycobacteria*



*grow indicator tube* (MGIT), el *MB/BacT system* i l'*ESP myco system*. Tots utilitzen medi líquid Middlebrook 7H9, igual que el BACTEC 460, i el creixement és detectat d'acord amb el CO<sub>2</sub> produït o el consum d'oxigen. L'MGIT detecta consum d'oxigen mitjançant fluorescència que detecta canvis en un indicador d'oxigen immobilitzat amb silicona al fons del tub. L'ESP detecta la pressió negativa del consum d'oxigen, mentre que l'MB/BacT té un sensor de color capaç de detectar canvis de pH causats pel CO<sub>2</sub>. Tots tenen alguns avantatges i desavantatges. Han estat primerament avaluats per cultiu. Actualment el més usat és l'MGIT. MB/BacT té alguns problemes administratius que n'han frenat l'expansió. El test per a la pirazinamida no està adequadament resolt en cap d'aquests.

La situació actual és que coexisteixen diferents mètodes, elegits d'acord amb els paràmetres interns en cada laboratori, entre els quals es consideren complexitat, reproducció del resultat i cost. Probablement el mètode més estès sigui el radiomètric, tot i que les seves alternatives basades en medis líquids guanyen difusió. En països on el cost és el factor més important s'usen els medis sòlids.

## MÈTODES FENOTÍPICS NO CONVENCIONALS

En la bibliografia existeixen nombrosos exemples de mètodes, molts fruit de considerable enginy. En general, no han aconseguit una acceptació important. Hi contribueixen diferents raons. Alguns han estat descrits recentment, d'altres tenen major complexitat que els mètodes estàndard, d'altres són difícils d'estandarditzar. Probablement també hi ha una certa resistència entre la comunitat professional a utilitzar mètodes indirectes per detectar la resistència als fàrmacs.

Alguns necessiten un precreixement del bacteri, com ara alguns mètodes líquids d'incubació curta, com el descrit per Dickinson *et*

*al.* (1989) basat en la incubació en medi sanguini d'un portaobjectes on s'ha fixat la mostra; després d'una incubació d'una setmana s'observa tenyit per comptar els bacteris presents. Dins d'aquest grup hi hauria mètodes que detecten activitats metabòliques presents en soques resistents, com són la detecció per bioluminescència de l'activitat ATP del bacteri, mètodes colorimètrics o citometria de flux, per detectar bacteris capaços d'hidrolitzar diacetat de fluoresceïna.

D'altres no fan necessari el creixement previ, com són els que utilitzen fags (Alcaide *et al.*, 2003). En síntesi, poden usar-se dues variants: amb fags que han estat manipulats i contenen el gen de la luciferasa i amb fags «salvatges». Els fags només infecten cèl·lules viables, per la qual cosa els bacteris sensibles a l'antibiòtic no s'infectaran. Si contenen luciferasa podran detectar-se amb un luminòmetre. Si no porten aquest gen es detecten indirectament, infectant en segona fase un cultiu de *M. smegmatis*, que creix ràpidament i es prova amb la formació de clapes quan el fag és present, és a dir, si prèviament ha infectat *M. tuberculosis* resistent.

## MÈTODES GENÈTICS PER A LA DETECCIÓ DE LES RESISTÈNCIES

### Mecanismes moleculars de les resistències

En els darrers anys s'han identificat els gens o les zones genètiques, i les mutacions puntuals, delecions o insercions responsables de les resistències als principals fàrmacs utilitzats en la teràpia antituberculosa: isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol i estreptomina. Del coneixement dels mecanismes moleculars, que determinen la resistència de les soques de *M. tuberculosis* i de les bases d'actuació dels diferents antibiòtics, s'esdevé una eina important per al desenvolupament de noves estratègies en la detecció de la resistència com a alternativa a l'antibiograma

convencional i per al disseny de nous fàrmacs.

Les alteracions genètiques que actualment s'associen a la resistència als principals fàrmacs són:

*Isoniazida.* S'han descrit diferents gens implicats (Ramaswamy i Musser, 1998). L'activació de la isoniazida implica la seva transformació en el compost actiu, l'àcid nicotínic, mitjançant l'enzim catalasa-peroxidasa, una proteïna codificada pel gen *katG* (Zhang *et al.*, 1992). Alteracions en aquest gen provoquen resistència i impedeixen que l'antibiòtic sigui activat. En general, entre el 50 % i el 60 % de les soques resistents estudiades presenten alguna mutació puntual, petites delecions o insercions en aquest gen (Ramaswamy i Musser, 1998). La mutació més freqüent en soques d'origen geogràfic diferent, de 32 % a 92 % (Haas *et al.*, 1997; Marttila *et al.*, 1998; Verdú *et al.*, 2002), afecta el c315 i provoca un canvi d'aminoàcid de Ser a Thr. Altres mutacions puntuals observades són c463Leu (s'ha suggerit que pot ser una mutació silenciosa), c104, c108, c138, c148, c270, c275, c321 i c381, de moltes de les quals es desconeix el significat (Ramaswamy i Musser, 1998). Una altra zona genètica associada a la resistència a la isoniazida és el locus *inhA*, constituït, al cromosoma micobacterià, pel gen *mabA*, que codifica l'enzim 3-cetoacil-ACP-reductasa, i l'*inhA*, que codifica l'enoil-ACP-reductasa. Ambdós participen en la síntesi de la paret bacteriana. A l'extrem 5' d'aquest locus es troba la zona reguladora RBS (*ribosome binding site*) (Banerjee *et al.*, 1994; Rozwarski *et al.*, 1998). S'han descrit mutacions tant a la zona reguladora com a la zona estructural (Ramaswamy i Musser, 1998). Les alteracions que afecten la primera provoquen un augment en la producció de l'enzim que compensa l'acció inhibidora de l'antibiòtic sobre la síntesi de la paret. Les mutacions a la zona estructural produeixen modificacions en l'enzim, i impedeix el reconeixement de la isoniazida, i eviten que s'activi. Les mutacions associades a aquest lo-

cus expliquen el 25-30 % de les resistències a isoniazida (Banerjee *et al.*, 1994). També s'ha relacionat amb resistència a la isoniazida la zona intergènica *oxyR-ahpC*. En aquest cas, el gen *ahpC* és regulat pel gen *oxyR* que codifica l'enzim *ahpC*, que destrueix els radicals peròxid (Telenti *et al.*, 1997). El gen *ahpC* es manté inactiu quan el gen *katG* funciona correctament i les mutacions en aquesta zona apareixen quan el gen *katG* està mutat, per compensar la seva acció de destoxicació (Ramaswamy i Musser, 1998). Altres gens com són *kasA*, *furA*, *ndh*, també han estat relacionats amb la resistència, però el seu paper és incert (Ramaswamy i Musser, 1998; Lee *et al.*, 2001).

Es pot trobar una correlació entre el tipus de mutació i la CMI. Així, mutacions al gen *katG* es relacionen amb resistència a concentracions elevades (superiors a 1 µg/ml). Alteracions al gen *inhA* s'associen a CMI baixa (Banerjee *et al.*, 1994; Lonca *et al.*, 2002). També s'ha observat una estreta relació entre resistència associada al gen *inhA* i resistència a l'etionamida, un dels fàrmacs de segona línia, emparentat amb la isoniazida (Banerjee *et al.*, 1994).

*Rifampicina.* La rifampicina actua interferint el procés de síntesi de l'mRNA, unint-se a la subunitat β de l'RNA-polimerasa i provocant la inhibició de l'inici del procés de transcripció (McClure i Cech, 1978). La resistència a la rifampicina està determinada per mutacions puntuals i petites delecions o insercions en el gen *rpoB* que codifica la subunitat abans esmentada (Ramaswamy i Musser, 1998). Aquest fet provoca un canvi d'aminoàcids i, conseqüentment, de conformació del lloc d'unió de l'antibiòtic a l'RNA-polimerasa. Més del 95 % de les soques resistents estudiades tenen alguna alteració localitzada en una regió de 81 pb, que codifica vint-i-set aminoàcids (codons 432 a 458) del gen *rpoB*, anomenada *regió determinant de la resistència a la rifampicina* (RDRR) (Telenti *et al.*, 1993; Verdú *et al.*, 2002). Les mutacions més freqüents són les que afecten els codons, 456Ser i 451Histidina. Les substitucions

d'aminoàcids més comunes són Ser456Leu i His451Tirosina (Ramaswamy i Musser, 1998).

Diferents treballs han observat una forta correlació entre determinades mutacions i el nivell de la CMI de la rifampicina. Així, s'han associat les mutacions als codons 451 i 456 amb un alt nivell de resistència, > 32 µg/ml, i les mutacions als c436, 441, 443 i 447 amb CMI baixes, alhora que les mutacions al codó 441 romanen susceptibles a la rifabutina (Ramaswamy i Musser, 1998; Espasa *et al.*, 2002).

*Etambutol*. La seva acció és inhibir la biosíntesi de la paret celular, i actua sobre l'enzim arabinosiltransferasa. La resistència a l'etambutol està associada amb canvis en l'operó *emb*, constituït per tres gens *embC*, *A*, *B* (Telenti *et al.*, 1997). La resistència es produeix per una sobreexpressió de proteïnes *emb*, associada freqüentment amb CMI baixes i per mutacions de caràcter estructural al gen *embB* (Telenti *et al.*, 1997), relacionades, en més del 65 % de les soques, amb nivells elevats de resistència. La majoria d'aquestes mutacions afecten els codons c306Metionina (89 %), c406Glicina, c328Asparagina i c497Glutamina (Ramaswamy i Musser, 1998).

*Estreptomicina*. Les alteracions responsables de la seva resistència s'han identificat als gens *rrs* i *rpsL*, que codifiquen l'RNA 16S i la proteïna ribosòmica S12, respectivament, ambdós relacionats amb la subunitat ribosòmica 30S. Aquestes alteracions provoquen la inhibició del procés de síntesi proteica (Sreevatsan *et al.*, 1996). Entre el 65-75 % de les soques resistents tenen alguna mutació associada als dos gens esmentats. En la resta, se'n desconeix el mecanisme. La mutació més comuna es produeix al codó 43 del gen *rpsL*, on la lisina és substituïda per una arginina. Al gen *rrs* les alteracions apareixen al *loop* 530 o a la regió 915 (Sreevatsan *et al.*, 1996). Existeixen de 25 % a 35 % de soques resistents amb els dos gens intactes, cosa que suggereix que hi pot haver altres mecanismes responsables de la resistència. S'ha trobat una correlació

entre les alteracions genètiques i el nivell de resistència *in vitro* (Meier *et al.*, 1996). Canvis al gen *rpsL* es correlacionen amb nivells elevats de resistència (> 500 µg/ml), i mutacions al gen *rrs* ho fan amb nivells menys alts (< 250 µg/ml). Generalment, les soques sense cap alteració als dos gens presenten resistència més baixa (< 50 µg/ml).

*Pirazinamida*. La resistència s'associa majoritàriament (70 %) a mutacions en el gen *pncA*, que codifica una proteïna de només cent vuitanta-sis aminoàcids, la pirazinamidasa, encarregada de transformar el fàrmac en àcid pirazinoic, que és el compost actiu. Es desconeix el mecanisme en el percentatge restant. Qualsevol tipus d'alteració, en aquest gen, s'ha correlacionat amb nivells elevats de resistència (Ramaswamy i Muser, 1998).

## MÈTODES DE DETECCIÓ DE LES ALTERACIONS GENÈTIQUES

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

### Tècniques fonamentades en l'electroforesi

PCR-SSCP (*single-strand conformation polymorphism*) (Telenti *et al.*, 1993). La tècnica té com a fonament l'estudi de la mobilitat d'una de les dues cadenes de DNA en un gel de poliacrilamida d'alta resolució. Una mutació en un gen provoca un canvi conformacional de la cadena i n'altera també la mobilitat. És un mètode estandarditzat, ràpid i fàcil.

*Heterodúplex* (Williams *et al.*, 1998). Aquesta tècnica inclou una PCR de la regió que interessa; es desnaturalitza i es barreja amb un altre

amplificó també desnaturalitzat d'una soca de referència. Es deixa reconstituir la cadena de DNA. Si no hi ha cap mutació la homologia entre els amplicons de les dues cadenes, la soca problema i la de referència serà total. En cas contrari, es formaran heterodúplex, que presentaran mobilitat electroforètica distinta dels amplicons originals.

### Tècniques fonamentades en la hibridació

La més coneguda és la LiPA, (Rossau *et al.*, 1997), desenvolupada comercialment per a la detecció de les principals mutacions a la rifampicina. Té utilitat com a marcador ràpid de multiresistència. Altres tècniques són les basades en PCR-ELISA (García *et al.*, 2001) i, darrerament, les basades en microxips (Trosch *et al.*, 1999) que encara han de desplegar el seu potencial. En aquest grup cal destacar les tècniques basades en PCR a temps real. Permeten l'amplificació i la detecció del producte simultàniament mitjançant sondes fluorescentes. Existeixen diferents tipus de sondes marcades, les d'ús més freqüent són les sondes Taqman i les sondes FRET (*fluorescence-resonance-energy-transfer*). S'han aplicat a l'estudi i detecció de les mutacions implicades amb la resistència als principals fàrmacs, en soques aïllades de cultius (Torres *et al.*, 2000; García de Viedma *et al.*, 2002) i també directament en mostra clínica (Espasa *et al.*, 2002). Aquesta darrera possibilitat presenta avantatges importants, com és la rapidesa en la detecció, de vint-i-quatre a quaranta-vuit hores, amb una elevada especificitat i una sensibilitat significativa, d'un 97 % en mostres amb bacil·loscòpies positives i d'un 47-65 % en mostres negatives.

### Tècniques fonamentades en la seqüenciació

Es considera el mètode de referència (Al-

caide *et al.*, 1997; Marttila *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2001). Detecta exactament el lloc de la mutació, però cal disposar de la soca. Malgrat que tècnicament aquest mètode és complex, es planteja com una bona alternativa, sobretot en l'estudi epidemiològic de soques.

### TRANSMISSIBILITAT DE LES SOQUES RESISTENTS

El potencial de transmissió de les soques resistents respecte de les sensibles sempre ha estat una font de controvèrsia. Durant anys s'ha pensat que les soques resistents eren menys transmissibles, atès que en l'entorn de malalts resistents crònics no es generaven nous casos resistents i en els treballs portats a terme en conills d'Índies per Cohn i Middlebrook en els anys cinquanta es demostrava que les soques resistents eren menys virulentes. Es va relacionar la pèrdua de la capacitat catalasa-peroxidasa amb la resistència a la isoniazida i amb la disminució de la capacitat de virulència. Uns anys més tard, es descobrí que l'enzim catalasa-peroxidasa estava sintetitzat pel gen *katG*, i que les mutacions en aquest gen provocaven la pèrdua de l'activitat enzimàtica i de la transformació de la isoniazida a la forma activa (Zhang *et al.*, 1992). En un treball ja clàssic, Snider *et al.* (1985) compararen les freqüències d'infecció de persones contactes de casos resistents i sensibles, i van observar que les proporcions d'infecció (mitjançant tuberculina) eren similars en ambdós tipus de contactes. Les dades de Snider no contradiuen les hipòtesis anteriors, i més aviat indiquen que la transmissió és un fenomen complex, que teòricament pot dividir-se en fases. Una primera fase és de transmissió física del bacteri del malalt a la persona exposada i desenvolupament de la resposta immunitària, una segona fase de latència del bacteri o de contenció per la immunitat local i els mediadors químics i cel·lulars i, finalment, la fase en què es manifesta la malaltia. Aquesta darrera únicament

passaria en el 10 % de les infeccions. L'estudi de Snider demostra que la capacitat de transmissió dels micobacteris resistents durant la primera fase no ha de ser diferent del sensibles, ja que és un fet físic lligat a la gènesi de partícules contagioses on el patró de susceptibilitat no té cap paper actiu. Amb la idea d'avaluar la importància i l'efecte en l'agressivitat de les soques amb alteracions al gen *katG*, Li *et al.* (1998) van comparar la capacitat de creixement de bacteris amb el gen delecionat i, posteriorment, restaurat. Com s'esperava, les soques sense gen perdien la capacitat de créixer però aquesta es recuperava en reintroduir el gen. Aquest fenomen provava que el gen *katG* és un factor de virulència per a *M. tuberculosis*. A més, quan els bacils van ser transformats en gens *katG* que presentaven mutacions puntuals, el nivell original de creixement detectat variava depenent del lloc de la mutació. S'ha calculat que entre el 50 % i el 60 % de les soques resistents a isoniazida estudiades presenten alguna alteració en aquest gen (Ramaswamy i Musser, 1998). La mutació més freqüent afecta el codó 315 i comporta un canvi d'aminoàcid (Haas *et al.*, 1997; Marttila *et al.*, 1998; Verdú *et al.*, 2002).

En els darrers anys s'han publicat diversos treballs que aporten més informació al fenomen de la transmissió. Soolingen *et al.* (2000) estudien soques resistents a isoniazida amb mutació al codó 315 del gen *katG* i proven que la mutació determina diferències en la transmissió. Altres estudis basats en epidemiologia molecular indiquen que la transmissió i producció de malaltia de les soques resistents i sensibles és similar (Alland *et al.*, 1994; Marttila *et al.*, 1998; Soolingen *et al.*, 1999; Godfrey-Faussett *et al.*, 2000; Rie *et al.*, 2000; Kruuner *et al.*, 2001; Toungousova *et al.*, 2002; Vukovic *et al.*, 2003). D'altres treballs han analitzat el nombre de soques agrupades segons el tipus d'antibiòtic per al qual són resistents, i distingeixen les monoresistències i les multi-resistències (Teixeira *et al.*, 2001). És remarcable l'estudi de Burgos *et al.*, en què s'estudia

un volum important de casos i s'analitzen els casos secundaris apareguts durant un període de nou anys. Els autors estableixen un índex de transmissió de les soques resistents, i observen que les soques resistents a la isoniazida i les resistents a més d'un fàrmac es transmeten tres o quatre vegades menys que les sensibles, mentre que les resistents a estreptomycinina o rifampicina no es veuen afectades. A més, altres treballs demostren amb epidemiologia molecular que soques resistents a la isoniazida amb mutacions al gen *inhA* es transmeten de manera similar a les soques sensibles (Tudó *et al.*, 2004).

Un altre aspecte a destacar és que les observacions experimentals mostren una correlació entre el tipus de mutació i la CMI de l'antibiòtic, i s'associen alteracions al gen *katG* amb resistència a concentracions elevades de la isoniazida (superiors a 1 µg/ml) i mutacions al gen *inhA* amb CMI baixes (Banerjee *et al.*, 1994; Lonca *et al.*, 2002). Així, les soques resistents a isoniazida amb el gen *katG* mutat, sense activitat enzimàtica detectable o molt disminuïda i amb CMI elevades, presentarien virulència atenuada, atès que les alteracions afecten dos enzims fonamentals per a la vida i el manteniment intracel·lular del bacil. En contraposició, les soques amb alteracions al gen *inhA* tindrien activitat catalasa-peroxidasa conservada i CMI baixa, i mantindria intacta la capacitat de transmissió.

La influència dels altres fàrmacs sobre la capacitat de transmissió de les soques resistents és poc important, ja que no tenen un efecte directe sobre la viabilitat metabòlica del bacil i són ràpidament compensades per altres mutacions. També, la resistència simultània a més d'un fàrmac, la multi-resistència, no és més que l'acumulació de les resistències individuals dels antibiòtics generades pel mateix tipus de mutacions. Sembla ser que en aquest tipus de soques la suma de totes les mutacions parcials podria disminuir considerablement la viabilitat metabòlica de la soca. Malgrat això, s'han descrit soques, com la Bei-

jing, molt prevalent a la Xina i la resta d'Àsia que, tot i ser multiresistents, es transmetrien com les sensibles (Espinal, 2003). Així, es pot assumir que els malalts amb tuberculosi multiresistent sense afectació del gen *katG* mantindrien la capacitat de transmissió com si es tractés d'una soca sensible, però disminuirien la possibilitat de desenvolupar una tuberculosi activa, atès que l'elevat nombre de mutacions tindria un cost important en la viabilitat metabòlica del bacil, tot i les mutacions compensatòries produïdes.

Atesa la informació disponible, serien raonables les següents conclusions: a) les pèrdues en la capacitat de transmissió es relacionarien amb dificultats per passar de l'estat latent a malaltia i no amb la capacitat d'infectar; b) la majoria de les soques resistents a fàrmacs diferents de la isoniazida conservarien la capacitat de transmissió; c) la resistència a la isoniazida per alteracions al gen *katG*, almenys les que afecten el codó 315 i les delecions, comportarien una disminució en el *fitness* del bacteri, i en disminuirien la capacitat de transmissió; d) existeix una clara relació, encara que no sempre es compleixi, entre la CMI i el gen afectat; e) quan més alta és la CMI més difícil és la transmissió, tot i que pot tractar-se de soques on no s'han trobat alteracions al gen *katG* i f) hi ha soques multiresistents, com la soca Beijing, que semblen conservar la seva transmissibilitat, tot i acumular resistències elevades a la isoniazida i a altres fàrmacs.

## RELACIÓ ENTRE LA CMI A LA ISONIAZIDA I LA RESISTÈNCIA CLÍNICA

Quan es van establir les condicions de realització dels antibiograms (Canetti i Grosset, 1961) es van definir una o dues concentracions per a cada fàrmac, utilitzades per decidir si una soca era o no resistent. Durant anys, la indicació d'antibiograma ha estat condicionada per la presència de símptomes

clínic que ho indiquessin. Darrerament, des de l'emergència de la tuberculosi amb la sida i l'aparició de brots multiresistents als EUA, s'ha difós la conducta de realitzar l'antibiograma sistemàticament. Aquest fet ha permès trobar soques amb resistència de baix nivell, properes al punt de tall. Això s'ha traduït en la troballa de soques resistents, sobretot a la isoniazida, amb mutació comprovable i que no es provaven clínicament (Tudó *et al.*, 2004). S'explicaria per la persistència d'un efecte parcial del fàrmac i per l'acció compensatòria dels altres fàrmacs que es donen conjuntament. Aquest seria més evident amb l'ús de les teràpies combinades actuals que inclouen tres o quatre fàrmacs potents capaços de superar aquesta pèrdua d'activitat (Heifets i Cangelosi, 1999). Això planteja una qüestió pràctica en el maneig dels malalts: és necessari modificar el tractament d'acord amb l'antibiograma? No es pot respondre amb precisió, ja que intervenen altres factors que poden influir, com són l'estat immunitari del malalt (per exemple, si és VIH-positiu), l'extensió de la malaltia i, per tant, la càrrega bacteriana i la gravetat de cada cas. Aquest és un repte al qual caldrà respondre amb futurs estudis.

## BIBLIOGRAFIA

- ALCAIDE, F.; GALI, N.; DOMINGUEZ, J.; BERLANGA, P.; BLANCO, S.; ORUS, P.; MARTÍN, R. (2003). «Usefulness of a new mycobacteriophage-based technique for rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis». *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, pàg. 2867-2871.
- ALCAIDE, F.; PFYFFER, G. E.; TELENTI, A. (1997). «Role of *embB* in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria». *Antimicrob. Agents. Chemther.*, vol. 41, pàg. 2270-2273.
- ALLAND, D.; KALKUT, G.; MOSS, A. [et al.] (1994). «Transmission of tuberculosis in New York City». *N. Engl. J. Med.*, vol. 330, pàg. 1710-1716.
- BALAGUÉ, M.; ORCAU, A.; SÁNCHEZ, P.; TORTAJADA, C.; CAYLÀ, J. A. (2003). «Epidemiología actual de la tuberculosis en España: hacia una mejor vigilancia y control». *Control de Calidad SEIMC*.
- BANERJEE, A.; DUBNAU, E.; QUEMARD, A. [et al.] (1994). «*InhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethion-

- amide in *Mycobacterium tuberculosis*». *Science*, vol. 263, pàg. 227-230.
- CANETTI, G.; FROMAN, S.; GROSSET, J. [et al.] (1963). «Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance». *Bull WHO*, vol. 29, pàg. 565-578.
- CANETTI, G.; GROSSET, J. (1961) «Teneur des souches sauvages de *Mycobacterium tuberculosis* en variants résistants a la isoniazide et a variants résistants a la streptomycine sur milieu de Löwenstein-Jensen». *An. Inst. Pasteur*, vol. 101, pàg. 28-46.
- DICKINSON, J. M.; ALLEN, B. W.; MITCHISON, D. A. (1989). «Slide culture sensitivity tests». *Tubercle.*, vol. 70, pàg. 115-121.
- ESPASA, M.; GONZÁLEZ, J.; ALCAIDE, F. [et al.] (2002). «Use of real time PCR for direct detection in clinical samples of genetic polymorphism causing resistance to isoniazid and rifampicin in *Mycobacterium tuberculosis*. XII European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease». *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 8 (supl. 1), pàg. 15.
- ESPINAL, M. A. (2003). «The global situation of MDR-TB». *Tuberculosis*, vol. 83, pàg. 4-51.
- FRIEDEN, T. R.; STERLING, T.; PABLOS-MÉNDEZ, A. [et al.] (1993). «The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York City». *N. Engl. J. Med.*, vol. 328, pàg. 521-526.
- GARCÍA, L.; ALONSO-SANZ, M.; REBOLLO, M. J.; TERCERO, J. C.; CHAVES, F. (2001). «Mutations in the rpoB gene of rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Spain and their rapid detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay». *J. Clin. Microbiol.*, vol. 39, pàg. 1813-1818.
- GARCÍA DE VIEDMA, D.; DÍAZ INFANTES, M. S.; LASALA, F.; CHAVES, F.; ALCALÁ, L.; BOUZA, E. (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.*, vol. 40, pàg. 988-995.
- GLOBAL AIDS SURVEILLANCE (2000) «Part I. Global situation of the HIV/AIDS pandemic, end 2000». *Weekly Epidemiol. Rec.*, vol. 75, pàg. 379-383.
- GODFREY-FAUSSETT, P.; SONNENBERG, P.; SHEARER, S. C.; BRUCE, M. C.; MEE, C.; MORRIS, L.; MURRAY, J. (2000). «Tuberculosis control and molecular epidemiology in a South Africa gold-mining community». *Lancet*, vol. 356, pàg. 1066-1071.
- HAAS, W. H.; SCHILKE, K.; BRAND, J. [et al.] (1997). «Molecular analysis of katG gene mutations in strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 41, pàg. 1601-1603.
- HEIFETS, L. B.; CANGELOSI, G. A. (1999). «Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*: a neglected problem at the turn of the century». *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, vol. 3, pàg. 564-581.
- KRUUNER, A.; HOFFNER, S. E.; SILLASTUS, H. [et al.] (2001). «Spread of drug resistant pulmonary tuberculosis in Estonia». *J. Clin. Microbiol.*, vol. 39, pàg. 3339-3345.
- LEE, A. S.; TEO, A. S.; WONG, S. Y. (2001). «Novel mutations in ndh in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 45, pàg. 2157-2159.
- LONCA, J.; MANTEROLA, J. M.; ALCAIDE, F. [et al.] (2002). «The relationship between the isoniazid resistant molecular mechanisms with the minimum inhibitory concentration and the catalase activity in *Mycobacterium tuberculosis*. XII European Congress of Clinical Microbiology and infectious Diseases». *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 8 (supl. 1), pàg. 95.
- MARCH, P. DE (2001). «Resistencia a los fármacos antituberculosos en España. Evolución e influencia del virus de la inmunodeficiencia humana». *Med. Clin. (Barc.)*, vol. 117, pàg. 59-63.
- MARTTILA, H. J.; SOINI, H.; EEROLA, E. [et al.] (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.*, vol. 42, pàg. 2443-2445.
- MCCCLURE, W. R.; CECHE, C. L. (1978). «On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis». *J. Biol. Chem.*, vol. 253, pàg. 8949-8956.
- MEIER, A.; SANDER, P.; SCHAPER, K. J.; SCHOLZ, M.; BOTTGER, E. C. (1996). «Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotyping resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 40, pàg. 2452-2454.
- MITCHISON, D. A. (1979). «Basic mechanisms of chemotherapy». *Chest.*, vol. 76 (supl.), pàg. 771-781.
- OMS (1998). «Tuberculosis surveillance. European region, 1995-1996». *Weekly Epidemiol. Rec.*, vol. 73, pàg. 347-351.
- OMS (2003). *Global Tuberculosis Control. Surveillance, planning, financing: 2003 report*. Gènova, Suïssa. [WHO/CDS/TB. 2003.316]
- OMS/IUATLD (2000). *Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report n. 2. Prevalence and Trends. The WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance*. Gènova: Suïssa. [WHO/CDS/TB/2000.278]
- RAMASWAMY, S.; MUSSER, J. M. (1998). «Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update». *Tubercle. Lung. Dis.*, vol. 79, pàg. 3-29.
- RIE, A. VAN; WARREN, R.; RICHARSON, M. [et al.] (2000). «Classification of drug-resistant tuberculosis in an epidemic area». *Lancet*, vol. 356, pàg. 22-25.
- ROSSAU, R.; TRAORE, H.; BEENHOWER, H. DE [et al.] (1997). «Evaluation of the INNO-LIPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin». *Antimicrob. Agents Chemoter.*, vol. 41, pàg. 2093-2098.
- ROZWARSKI, D. A.; GRANT, G. A.; BARTON, D. H. R. [et al.] (1998). «Modification of the NADH of isoniazid target (inhA) from *Mycobacterium tuberculosis*». *Science*, vol. 279, pàg. 98-102.
- SCHWOEBEL, V.; LAMBREGTS-VAN WEEZENBEEK, C. S. B.; MORO, M. L.; DROBNIOWSKI, F.; HOFFNER, S. E.; RA-

- VIGLIONE, M. C.; RIEDER, H. L. (2000). «Standardization of antituberculosis drug resistance surveillance in Europe». *Eur. Respir. J.*, vol. 15, pàg. 364-371.
- SNIDER JR., D. E.; KELLY, G. D.; CAUTHEN, G. M.; THOMPSON, N. J.; KILBURN, J. O. (1985). «Infection and disease among contacts of tuberculosis cases with drug-resistant and drug-susceptible bacilli». *Am. Rev. Respir. Dis.*, vol. 13, pàg. 125-132.
- SOOLINGEN, D. VAN; BORGDORFF, M. W.; HAAS, P. E. DE [et al.] (1999). «Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nation-wide study from 1993 through 1997». *J. Infect. Dis.*, vol. 180, pàg. 726-736.
- SOOLINGEN, D. VAN; HAAS, P. E. DE; DOORN, H. R. VAN; KUIJPER, E.; RINDER, H.; BORGDORFF, M. W. (2000). «Mutations at amino acid position 315 of the *katG* gene associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in The Netherlands». *J. Infect. Dis.*, vol. 182, pàg. 1788-1790.
- SREEVATSAN, S.; PAN, X.; STOCKBAUER, K. E. [et al.] (1996). «Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities». *Antimicrob. Agents. Chemother.*, vol. 40, pàg. 1024-1026.
- TEIXEIRA, L.; PERKINS, M. D.; JOHNSON, J. L. [et al.] (2001). «Infection and disease among household contacts of patients with multidrug-resistant tuberculosis». *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.*, vol. 5, pàg. 321-328.
- TELENTI, A.; HONORÉ, N.; BERNASCONI, C. [et al.] (1997). «Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a blind study at reference laboratory level». *J. Clin. Microbiol.*, vol. 35, pàg. 719-723.
- TELENTI, A.; IMBODEN, P.; MARCHESI, F.; SCHMIDHEINI, T.; BODMER, T. (1993). «Direct, automated detection of rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism». *Antimicrob. Agents. Chemother.*, vol. 37, pàg. 2054-2058.
- TORRES, M. J.; CRIADO, A.; PALOMARES, J. C.; AZNAR, J. (2000). «Use of real time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis*». *J. Clin. Microbiol.*, vol. 38, pàg. 3194-3199.
- TOUNGOUSSOVA, O. S.; SANDVEN, P.; MARIANDYSHEV, A. O.; NIZOVITSEVA, N. I.; BJUNE, G.; CAUGANT, D. A. (2002). «Spread of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype in the Archangel Oblast, Russia». *J. Clin. Microbiol.*, vol. 40, pàg. 1930-1937.
- TROESCH, A.; NGUYEN, H.; MIYADA, C. G.; DESVARENNE, S.; GINGERAS, T. R.; KAPLAN, P. M. [et al.] (1999). «*Mycobacterium* species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays». *J. Clin. Microbiol.*, vol. 37, pàg. 49-55.
- TUDÓ, G.; GONZÁLEZ, J.; OBAMA, R.; RODRÍGUEZ, J. M.; FRANCO, J. R.; ESPASA, M.; SIMARRO, P.; ESCARAMÍS, G.; ASCASO, C.; GARCÍA, A.; JIMÉNEZ DE ANTA, M. T. (2004). «Study of resistance to anti-tuberculosis drug in five district of Equatorial Guinea: rates, risk factors, genotyping of gene mutations and molecular epidemiology». *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.*, vol. 8, pàg. 15-22.
- VERDÚ, E.; MARCH, F.; CORTÉS, P. [et al.] (2002). «Molecular mechanism of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* from Barcelona. XII European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease». *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 8 (supl. 1), pàg. 94-95.
- VUKOVIC, D.; RÜSCH-GERDES, S.; SAVIC, B.; NIEMANN, S. (2003). «Molecular epidemiology of pulmonary tuberculosis in Belgrade, Central Serbia». *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, pàg. 4372-4377.
- WILLIAMS, D. L.; SPRING, L.; GILLIS, T. P.; SALFINGER, M.; PERSING, D. H. (1998). «Evaluation of a polymerase chain reaction-based universal heteroduplex generator assay for direct detection of rifampin susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens». *Clin. Infect. Dis.*, vol. 26, pàg. 446-450.
- ZHANG, Y.; HEYM, B.; ALLEN, B.; YOUNG, D.; COLE, S. T. (1992). «The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*». *Nature.*, vol. 358, pàg. 591-593.