

Evidência para o efeito de um “gene principal” do hospedeiro na suscetibilidade à tuberculose multirresistente em Portugal

Evidence for a “major gene” effect in the susceptibility to multidrug resistant tuberculosis in Portugal

Susana David¹, Ana R A Mateus^{2,3}, Elsa L Duarte⁴, José Albuquerque¹, Clara Portugal⁵, Luísa Sancho⁵, João Lavinha¹, Guilherme Gonçalves⁶

suzana.david@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(2) Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal.

(3) Institute of Biology, Leiden University, Leiden, The Netherlands.

(4) Escola de Ciências e Tecnologia/Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Évora, Portugal.

(5) Serviço de Patologia Clínica, Hospital Fernando Fonseca, Amadora, Portugal.

(6) Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto, Portugal.

_Resumo

A análise do genoma do patógeno e da genética do hospedeiro tem possibilitado o entendimento da coevolução do *Mycobacterium tuberculosis* com o seu hospedeiro humano, conduzindo a relações simpátricas mais estáveis entre o hospedeiro e o patógeno. A influência de fatores clínicos (coinfecção pelo VIH e tuberculose multirresistente (MDRTB)) e demográficos (sexo e idade) na relação hospedeiro-patógeno simpátrica foi investigada utilizando o *spacer oligonucleotide typing* (spoligotyping) enquanto método de genotipagem de isolados do *M. tuberculosis* pertencendo à linhagem Euro-Americana. Foram analisados 547 casos de tuberculose (TB) e os isolados correspondentes, de uma amostragem consecutiva de seis anos num contexto de elevada prevalência para a coinfecção TB-VIH (32,0%). Entre estes, 62,0% resultaram de infeção causada pelos principais genótipos de *M. tuberculosis* em circulação. A relação simpátrica foi definida de acordo com o spoligotype em comparação com a base de dados internacional de spoligotype SpolDB4. Foi evidenciada uma associação estatisticamente significativa da MDRTB com os isolados simpátricos, independente da coinfecção pelo VIH. Para além disso, o resultado do estudo da prevalência da distribuição da infeção com a idade foi sugestivo de que os determinantes da predisposição genética do hospedeiro à TB simpátrica eram impulsionados por variantes comuns sob efeito de um “gene principal” (“major gene effect”). Em termos de saúde pública, estes resultados poderão dar um importante contributo para a elaboração de modelos que preveem a duração dos ciclos de transmissão ativa, nomeadamente associada a casos graves de MDRTB.

_Abstract

Major contributions from pathogen genome analysis and host genetics have equated the possibility of *Mycobacterium tuberculosis* co-evolution with its human host leading to more stable sympatric host-pathogen relationships. We explored the influence on the sympatric host-pathogen relationship of clinical (HIV infection and multidrug-resistant tuberculosis (MDRTB)) and demographic (gender and age) factors using spacer oligonucleotide typing (spoligotyping) for the classification of *M. tuberculosis* strains within the Euro-American lineage. We analyzed a total of 547 tuberculosis (TB) cases, from six year consecutive sampling in a setting with high TB-HIV coinfection (32.0%). Of these, 62.0% were caused by major circulating *M. tuberculosis* genotypes. The sympatric relationship was defined according to spoligotype in comparison to the international spoligotype database SpolDB4. A significant association of MDRTB with sympatric strains, regardless of the HIV status, was evidenced. Furthermore, distribution curves of the prevalence of sympatric TB in relation to patients' age suggested that the host genetic determinants in the host-pathogen relationship were driven by more common variants under a “major gene” effect.

_Introdução

Durante os séculos XVIII e XIX, a tuberculose (TB) causou 20% de todas as mortes na Europa numa epidemia sem paralelo. Em 1958, a partir da análise de dados de morbilidade e mortalidade, E. R. N. Grigg concluiu que uma epidemia de TB dura aproximadamente 300 anos (1-2). A baixa incidência da TB atualmente observada na Europa seria sugestiva de seu declínio final. As elevadas taxas de mortalidade observadas em populações virgens evidenciam grandes diferenças na resposta imunitária à doença (3-5). No entanto, a influência da estirpe infecciosa no fenótipo da doença também tem vindo a ser valorizada (6-10). As relações hospedeiro-patógeno têm sido classificadas como simpátricas quando o hospedeiro e o patógeno compartilham uma origem geográfica ancestral comum, ou alopátrica, quando se originam de áreas geográficas não sobrepostas (11). Consequentemente, a relação patógeno-hospedeiro simpátrica seria caracterizada por associações mais estáveis entre as linhagens do *M. tuberculosis* e suas populações humanas (12-14).

Em Portugal, estudos anteriores delinearam a especificidade geográfica dos genótipos de *M. tuberculosis* (15-18). Mais especificamente, por meio do *spoligotyping*, foram identificados os *spoligotypes* característicos do contexto português (16).

_Objetivos

Reanalisar a nossa compreensão atual da estrutura populacional do *M. tuberculosis* em Portugal e, numa abordagem epidemiológica molecular retrospectiva, investigar a influência da infeção pelo VIH e da MDRTB na relação simpátrica patógeno-hospedeiro.

_Materiais e métodos

Características da população

Este estudo retrospectivo de epidemiologia molecular incluiu 859 doentes de TB com cultura positiva para o *M. tuberculosis*, que foram diagnosticados e tratados de acordo com os procedimentos recomendados em Portugal entre 1999 e 2006. Os isolados correspondentes de *M. tuberculosis* incluíam 665 isolados da área metropolitana de Lisboa (16) e 194 de várias localizações em Portugal. Dados sociodemográficos (idade, sexo) e parâmetros laboratoriais (dados da resistência do *M. tuberculosis* a antibióticos de primeira linha, estado de infeção pelo VIH) foram obtidos do hospital totalmente anonimizados e associados apenas ao número do isolado de *M. tuberculosis*.

Um total de 547 doentes da área metropolitana de Lisboa com diagnóstico confirmado para a TB e conhecido para o VIH, 82,3% (547/665), foram incluídos no estudo. Destes 32,0% (175/547) estavam infetados pelo VIH e 68,0% (372/547) eram VIH-negativos. Os dados de resistência da TB aos antibióticos estavam disponíveis para 86,7% (474/547) dos casos. As amostras independentes provenientes de várias localizações em Portugal foram utilizadas apenas como elemento comparativo.

Analisámos a distribuição da TB causada *M. tuberculosis* de genótipos específicos, observando a frequência dos casos em função da idade. Para não distorcer as observações quanto às tendências evolutivas da relação simpátrica entre o *M. tuberculosis* e o seu hospedeiro humano, os indivíduos VIH-negativos foram considerados como o grupo de referência.

Análise molecular

O *Spacer oligonucleotide typing*, *spoligotyping*, e a classificação em tipos internacionais partilhados (SIT), com a ajuda da base de dados internacional de *spoligotyping* (SpolDB4) (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/>) (19,20) e do programa Spotclust (<http://homepages.rpi.edu/~bennek/EpiResearch/>) (21), foram realizados como anteriormente descrito (16,18). Os padrões SIT foram submetidos a análise filogenética utilizando o MIRU-VNTR-plus (<http://www.MIRU-VNTRplus.org>) (22,23). Os complexos clonais (CC) e *Singletons* (não agrupados) foram obtidos através da análise de variação de locus único (SLV). Os SITs foram considerados característicos da população portuguesa, conforme os critérios anteriormente descritos (16). A distribuição dos SITs entre os grupos de estirpes simpátricas e alopátricas foi também analisada no “subgrupo principal” de 339 casos. O “subgrupo principal” de 339 casos foi definido como aquele em que as assinaturas de *spoligotype* classificadas em SIT agruparam 15 ou mais isolados, representando 62,0% (339/547) dos pacientes incluídos no estudo. Dados sobre a resistência aos antibióticos estavam disponíveis para 86,7% (294/339) desses casos.

Análise estatística

Toda a análise de dados foi realizada com R (R Development Core Team 2005).

A associação dos CCs derivados dos *spoligotypes* com o MIRU-VNTR-plus foi avaliada utilizando o modelo linear generalizado $CCs \sim \text{infeção por VIH} + MDRTB + \text{sexo} + \text{grupo etário}$, assumindo uma distribuição binomial do erro. De igual modo foi estudada a associação dos SITs simpátricos utilizando o modelo $SIT \text{ simpátrico} \sim \text{infeção por VIH} + MDRTB + \text{sexo} + \text{grupo etário}$, para o conjunto de doentes infetados pelo VIH e VIH negativos, e para os doentes VIH negativos separadamente. A fim de evitar artefactos resultantes de genótipos raros, o modelo foi testado para o “subgrupo principal” (n=339). A razão das probabilidades complementares (Odd Ratios, ORs) foi derivada para os modelos finais. As interações entre fatores foram testadas, mas, por não serem estatisticamente significativas, não foram incluídas nos modelos finais. Também testamos o efeito da idade na prevalência da TB utilizando o modelo linear generalizado *Prevalência de tuberculose* ~

tuberculose simpática + grupo etário, sendo os pacientes VIH negativos considerados o grupo de referência, assumindo uma distribuição Poisson do erro. Quando foram encontradas diferenças significativas para os diferentes fatores nos modelos (Anova, $P \leq 0,05$), realizamos comparações *post-hoc pairwise* entre os níveis de fatores com o teste de *Tukey's honest significant differences* (HSD) ($\alpha=0,01$).

Resultados

A linhagem predominante de *M. tuberculosis* observada, a linhagem *Euro-Americana*, 92,1% (504/547), foi adicionalmente subdividida em CCs derivados de *spoligotypes* utilizando MIRU-VNTRplus (22,23). A análise descritiva dos fatores demográficos e clínicos entre as estirpes alopátricas e simpátricas para o "subgrupo maior" ($n=339$) figura no quadro 1. Desta população 33,3% (113/339) estava infetada pelo VIH e 66,7% (226/339) era VIH-negativa. A distribuição da idade é mostrada em relação a estes dois grupos. Entre os doentes, 56,3% (191/339) estavam infetados por estirpes alopátricas e 43,7% (148/339) por estirpes simpátricas. Neste "subgrupo principal", todas, exceto as estirpes com *spoligotype* Beijing, pertenciam à linhagem *Euro-Americana*, 95,6% (324/339). Uma árvore filogenética (figura 1) mostra a família *spoligotype* predominante *Latino-Americana Mediterrânica* (LAM), pertencendo à linhagem *Euro-Americana*, principalmente agrupada dentro do CC1. As estirpes simpátricas estão representadas pelos SITs 20, 64, 389, 244 e 1106, enquanto as estirpes alopátricas pelos SITs 42, 150, 17, 53, 50, 1, 34, 47. As estirpes simpátricas, exceto SIT244, foram todas identificadas em amostras de conveniência independentes de várias regiões em Portugal.

Na análise estatística da associação dos CCs à infeção pelo VIH, MDRTB, sexo e idade, foi evidenciada a associação da coinfeção pelo VIH com os *Singletons* ($p=0,03$) ($n=339$) e o CC contendo o SIT244 ($p<0,001$) ($n=547$). Embora, na nossa classificação original, o SIT244 tenha sido incluído no grupo de estirpes característico da população portuguesa (16), na presente análise, o SIT244 foi associado à infeção pelo VIH. Como os genótipos relacionados com o VIH foram previamente associados a estirpes alopátricas (24), duas aná-

lises subsequentes foram consideradas no nosso modelo final, uma na qual o SIT244 foi incluído no grupo simpátrico de estirpes e a outra onde foi agrupada com o alopátrico. No primeiro caso, foi observada uma associação positiva entre a infeção pelo VIH e as estirpes simpátricas. No entanto, quando o SIT244 foi excluído deste grupo e incluído no grupo alopátrico nenhuma relação, nem positiva nem negativa, foi observada com a infeção pelo VIH. No entanto, uma associação estatisticamente significativa foi observada entre a MDRTB e as estirpes simpátricas, na análise restrita ao subgrupo principal ($n=339$) (tabela 1), bem como relativa à base de dados completa ($n=547$) (dados não apresentados). A associação foi significativa, quer o SIT244 fosse incluído no grupo simpátrico ($p<0,001$) quer no alopátrico ($p<0,001$) e não foi afetada quando os casos infetados pelo VIH foram excluídos ($p<0,001$). Assim, a associação das estirpes simpátricas com a MDRTB não se mostrou dependente do estado de infeção pelo VIH.

Para a TB alopátrica, a distribuição da prevalência de acordo com o grupo etário mostrou três picos, correspondendo às crianças muito jovens, adultos jovens e idosos, tipicamente referida como uma curva trimodal (gráfico 1). As diferenças de prevalência entre grupos etários não foram tão pronunciadas para a TB causada por estirpes simpátricas devido à queda da prevalência nos muito jovens e idosos e às alterações do pico central. Isso foi traduzido numa tendência para uma curva de distribuição típica (padrão). Essa tendência foi ainda mais acentuada quando o SIT244 foi incluído no grupo alopátrico.

Quadro 1: Características dos doentes com tuberculose segundo o genótipo da linhagem *M. tuberculosis* para os genótipos mais frequentemente observados.

Genótipo das estirpes ¹							Características dos doentes					
Spoligotype árvore geradora mínima ²							Sexo masculino (%)	MDRTB ⁴ (%)	Infeção VIH ⁵ (%)	Idade ⁶ (média ± dp)		
	CC	Node	SLV (1)	SLV (2)	Linhagem (Spoligotype) ³	Frequência (%)				Todos	VIH+	VIH-
Todos (n=339)	-	-	-	-	-	100,0% (339/339)	72,0% (244/339)	9,9% (29/294)	33,3% (113/339)	40,42 ± 16,84	37,03 ± 10,21	42,12 ± 19,11
Alopátrico (n=191)	-	-	-	-	-	56,3% (191/339)	72,3% (138/191)	2,4% (4/164)	27,2% (52/191)	40,68 ± 17,05	37,96 ± 10,23	41,70 ± 18,92
Simpátrico (n=148)	-	-	-	-	-	43,7% (148/339)	71,6% (106/148)	19,2% (25/130)	41,2% (61/148)	40,09 ± 16,60	36,23 ± 10,21	42,79 ± 19,51
	CC1					59,0% (200/339)	75,0% (150/200)	11,5% (20/174)	33,0% (66/200)	42,00 ± 17,43	37,83 ± 10,62	44,04 ± 19,66
		SIT42			Euro-Americana (LAM9)	18,0% (61/339)	72,1% (44/61)	3,8% (2/52)	32,8% (20/61)	43,21 ± 16,90	38,70 ± 8,34	45,41 ± 19,50
			SIT150		Euro-Americana (LAM9)	6,0% (20/339)	85,0% (17/20)	0,0% (0/18)	30,0% (6/20)	40,50 ± 17,22	39,83 ± 16,61	40,79 ± 18,08
			SIT20	SIT17	Euro-Americana (LAM1 66% LAM9 34%)	24,2% (82/339)	79,3% (65/82)	20,8% (15/72)	36,6% (30/82)	41,85 ± 18,45	38,07 ± 12,03	44,04 ± 21,09
				SIT389	Euro-Americana (LAM2 82% LAM1 11%)	2,9% (10/339)	50,0% (5/10)	0,0% (0/8)	30,0% (3/10)	38,80 ± 16,43	32,00 ± 3,46	41,71 ± 19,18
				SIT64	Euro-Americana (LAM1 66% LAM9 34%)	3,8% (13/339)	69,2% (9/13)	23,1% (3/13)	30,8% (4/13)	39,46 ± 9,20	38,50 ± 5,20	39,89 ± 10,78
					Euro-Americana (LAM9)	4,1% (14/339)	71,4% (10/14)	0,0% (0/11)	21,4% (3/14)	44,29 ± 21,99	30,67 ± 4,04	48,00 ± 23,55
	CC2					15,3% (52/339)	71,2% (37/52)	4,7% (2/43)	26,9% (14/52)	39,48 ± 16,86	39,64 ± 11,58	39,42 ± 18,57
		SIT53			Euro-Americana (T1)	11,5% (39/339)	71,8% (28/39)	3,2% (1/31)	23,1% (9/39)	39,77 ± 16,80	38,22 ± 7,21	40,23 ± 18,82
			SIT50		Euro-Americana (H3 77% T1 23%)	3,8% (13/339)	69,2% (9/13)	8,3% (1/12)	38,5% (5/13)	38,62 ± 17,72	42,20 ± 17,87	36,38 ± 18,47
	Singletons					25,7% (87/339)	65,5% (57/87)	9,1% (7/77)	37,9% (33/87)	37,37 ± 15,06	34,30 ± 8,32	39,24 ± 17,80
		SIT244			Euro-Americana (T2 82% T1 18%)	8,8% (30/339)	56,7% (17/30)	7,1% (2/28)	63,33% (19/30)	34,63 ± 9,60	33,63 ± 7,95	36,36 ± 12,18
		SIT1			Leste-Asiática (Beijing)	4,4% (15/339)	53,3% (8/15)	0,0% (0/12)	20,0% (3/15)	35,27 ± 18,51	31,33 ± 6,66	36,25 ± 20,56
		SIT34			Euro-Americana (S 78% T1 22%)	3,5% (12/339)	75,0% (9/12)	0,0% (0/11)	25,0% (3/12)	44,33 ± 25,45	33,00 ± 8,72	48,11 ± 28,41
		SIT1106			Euro-Americana (LAM9 60% T2 40%)	2,7% (9/339)	55,6% (5/9)	83,3% (5/6)	55,6% (5/9)	36,56 ± 13,63	36,60 ± 10,74	36,50 ± 18,48
		SIT47			Euro-Americana (Haarlem1)	6,2% (21/339)	85,7% (18/21)	0,0% (0/20)	14,3% (3/21)	39,14 ± 11,13	39,00 ± 11,00	39,17 ± 11,47

¹ A classificação alopátrica e simpatria das estirpes de *M. tuberculosis* foi obtida a partir da comparação dos spoligotypes portugueses com a base de dados de spoligotyping internacional SpoIDB4⁽²¹⁾. Esta base de dados classifica as estirpes de acordo com o tipo "Shared international type" (SIT). As estirpes alopátricas incluem estirpes com SITs 42, 150, 17, 53, 50, 1, 34, 47 (n=191) e as estirpes simpátricas incluem aquelas com SITs 20, 64, 389, 244, 1106 (n=148) (n=148).


² O MIRU-VNTR plus (<http://www.miru-vntrplus.org>) foi utilizado para analisar dados de spoligotyping dos isolados de *M. tuberculosis* (22,23). O algoritmo de Kruskal foi utilizado para agrupar em complexos clonais (CC) dados de SITs, utilizando uma única variação de locus, SLV (1), e para gerar uma árvore filogenética.

³ As linhagens de *M. tuberculosis* foram classificadas segundo o spoligotype. A designação do spoligotype foi obtida com a ajuda da base de dados SpoIDB4 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITdemo>) (19,20) e o programa Spotclust ([http://www.rpi.edu/\\$bennek/EpiResearch](http://www.rpi.edu/$bennek/EpiResearch)) (21). A designação das linhagens, Leste-Asiática e Euro-Americana resulta da análise de Long Sequence Polymorphism (LSP) (14).

⁴ Os dados de resistência aos antibióticos estavam disponíveis para 86,7% (294/339) dos casos e foram usados para determinar a percentagem de casos de tuberculose multirresistente (MDRTB) segundo o genótipo de estirpe.

⁵ VIH = infeção pelo vírus da imunodeficiência humana.

⁶ A idade em anos expressa como média ± dp, dp = desvio padrão.

Figura 1:  Análise filogenética pelo *software* MIRU-VNTR-plus (<http://www.MIRU-VNTRplus.org>) (22,23) dos padrões *spoligo*type do “subgrupo principal” de 339 casos, 62,0% (339/547), atribuído aos genótipos predominantes de *M. tuberculosis* (SITs).

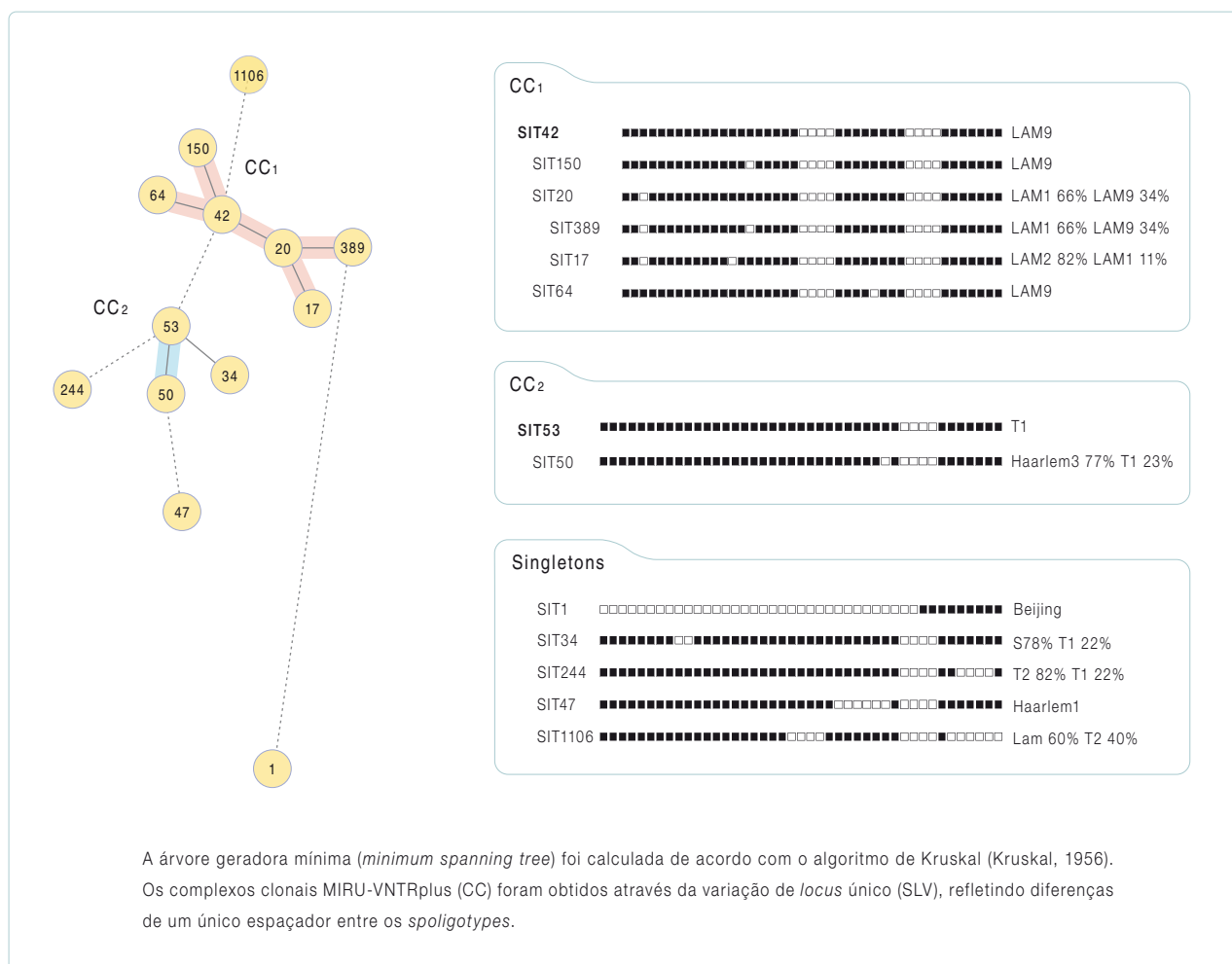


Tabela 1: 📄 Análise de regressão logística¹ para o “subgrupo principal” de pacientes (n=339) em relação à tuberculose causada por estirpes simpátricas de *M. tuberculosis*.

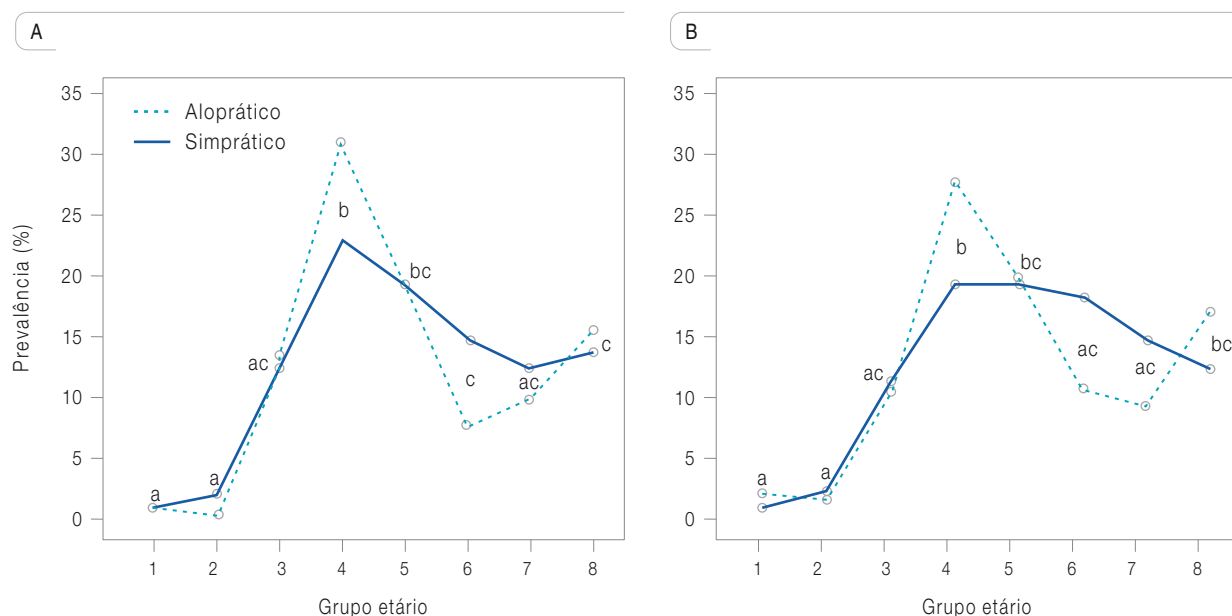
Estirpe simpátrica SITs 20, 64, 389, 244, 1106 (n=148)							
	Estimativa	Erro padrão	Z	P	Odds Ratio	IC Limite inferior	IC Limite superior
Constante	-14,566	882,743	-0,017	0,987			
MDRTB	2,155	0,558	3,857	<0,001 ***	8,629	3,191	30,183
VIH	0,659	0,278	2,365	0,018 *	1,933	1,121	3,355
Estirpe simpátricas SITs 20, 64, 389, 1106 (n=118)							
	Estimativa	Erro Padrão	Z	P	Odds Ratio	IC Limite inferior	IC Limite superior
Constante	-14,566	882,743	-0,017	0,987			
MDRTB	2,250	0,488	4,607	<0,001 ***	9,487	3,859	26,991

¹ Modelo estatístico: modelo linear generalizado, *Tuberculose simpátrica* ~ *Infeção VIH* + *MDRTB* + *sexo* + *faixa etária*.

Códigos de significância: 0 ‘***’ 0,001 ‘**’ 0,01 ‘*’ 0,05 ‘.’ 0,1 ‘ ’ 1; MDRTB - tuberculose multirresistente.

As interações entre os fatores foram testadas, mas, por não serem significativas, não foram incluídas no modelo final. Idade e sexo não foram significativos.

Gráfico 1: ▾ Distribuição da frequência de TB causada por estirpes simpátricas e alopátricas de *M. tuberculosis*, em função da faixa etária em indivíduos VIH-negativos, 68,0% (372/547).



Os grupos 1 a 8 representam as categorias de idade em anos de 0 a 4, 5 a 14, 15 a 24, 25 a 34, 35 a 44, 45 a 54, 55 a 64, acima de 65, respetivamente. Diferenças significativas entre os grupos etários (HSD de Tukey, $p < 0,01$) são indicadas por letras minúsculas, idênticas quando a mesma relação é obtida; (A) TB causada por estirpes simpátricas, 26,3% (98/372), versus alopátricas, 73,7% (274/372), marcando o desvio em relação às curvas de distribuição trimodal usuais; (B) TB causada por estirpes simpátricas, 23,4% (87/372), versus alopátricas, 76,6% (285/372), excluindo as estirpes SIT244 do grupo simpátrico. Diferenças significativas entre fatores do grupo etário (HSD de Tukey, $p < 0,01$) são indicadas por letras diferentes sendo as mesmas para cada PTSIT (alopátrico e simpátrico).

_Discussão

A TB permanece endêmica na população portuguesa, com maior incidência nas grandes áreas urbanas. Corroborando um declínio lento da TB, a média da idade de incidência tem vindo a aumentar (25). De acordo com os nossos estudos anteriores, Portugal aparece como podendo ter uma das maiores proporções globais de estirpes endêmicas da família *spoligotype* LAM (16,18). Dados restritos à área metropolitana de Lisboa revelaram uma prevalência de 51% da família LAM e uma elevada proporção das subfamílias SIT20 (LAM1) e SIT42 (LAM9) (16).

Investigamos a significância estatística da associação entre estirpes simpátricas e a infeção pelo VIH, idade, género e MDRTB utilizando um nível de análise genotípica mais estridente em comparação com estudos anteriores (24), através da

definição de CC a partir dos *spoligotypes* utilizando o programa MIRU-VNTRplus. Foi evidenciada uma associação estatisticamente significativa do VIH com o CC contendo o SIT244. Esta família de *spoligotype* não foi detetada em amostras independentes provenientes de várias localizações em Portugal. Além disso, na base de dados internacional SpolDB4 o SIT244 estava representado em números elevados em apenas dois lugares, Portugal e Bangladesh (20,26). A natureza dos laços históricos entre estas duas populações provavelmente não iria resultar numa partilha duradora de características genéticas. Estes factos contribuíram para refutar a classificação do SIT244 nas estirpes simpátricas. O SIT244 pode ter resultado de uma estirpe alopátrica importada que se tornou prevalente entre pacientes infetados pelo VIH na área metropolitana de Lisboa. Consequentemente, eliminando o SIT244 do grupo simpátrico, os nossos resultados corroboraram investigações

anteriores em que a TB simpátrica não estava associada à infeção pelo VIH (24). No entanto, foi observada uma associação estatisticamente significativa da MDRTB com estirpes simpátricas, independente de haver infeção pelo VIH. As estirpes simpátricas são mais propensas a superar as alopátricas na transmissão ativa da TB (14,24). A principal assinatura LAM no nosso estudo, o SIT20, pertence à subfamília LAM1 caracterizada pela deleção RDRio. Nos nossos estudos anteriores, a deleção RDRio foi detetada em cerca de 60% dos isolados de LAM em Portugal e foi associada à transmissão de MDRTB (18,27). As estirpes RDRio têm sido associadas à transmissão contínua e a uma maior carga bacilar (30,31). Embora a transmissão ativa de isolados deste estudo não tenha sido avaliada, dados sobre a transmissão ativa de *spoligotypes* relevantes para este estudo encontram-se disponíveis noutros relatos (15,18,27,30). As curvas da prevalência da TB em relação ao grupo etário geralmente mostram uma distribuição trimodal e são úteis como marcador da evolução epidémica da doença (25,31). A distribuição trimodal observada foi acentuada no caso dos genótipos alopátricos (gráfico 1A) e mantida mesmo quando o SIT244 foi incluído nesse grupo (gráfico 1B). No entanto, para a TB causada por estirpes simpátricas, foi observada a tendência para uma distribuição normal. Ao que parece a idade é menos relevante na suscetibilidade às estirpes de TB simpátricas altamente transmissíveis.

A TB em idade precoce tem sido atribuída a mutações raras no genoma do hospedeiro responsáveis por características Mendelianas monogénicas (altamente penetrantes) enquanto em idade avançada atribuída a polimorfismos comuns, tendo um efeito mais moderado (menor penetrância) sobre o risco de doença clínica. Estas situações, no entanto, foram consideradas como as duas extremidades de um espectro contínuo de suscetibilidade genética do hospedeiro. Garantindo este *continuum*, encontraríamos um efeito devido a um "gene principal" ("*major gene effect*") (32,33). De facto, para as estirpes simpátricas, a maior estabilidade da relação hospedeiro-patógeno, característica de populações que sobreviveram à exposição histórica, a atenuação do pico central e a perda dos picos nos extremos da distribuição etária trimodal poderiam ser sugestivas de determinantes genéticos polimórficos

mais comuns. Além disso, o efeito de um "gene principal" que regeria a relação simpátrica hospedeiro-patógeno, sugerido pelos resultados do nosso estudo, seria concordante com os aspetos que regem a especificidade geográfica da variação genética humana na Europa (34) e parece particularmente relevante para o desenho de estudos futuros.

_Conclusão

A epidemiologia molecular trouxe evidência sugestiva da coevolução hospedeiro-patógeno na TB permitindo a introdução da ideia de que a resposta imunitária do hospedeiro pode variar de acordo com a estirpe de *M. tuberculosis* que o infeta. Essa premissa tem importantes implicações em termos de saúde pública. A escolha dos determinantes genéticos para definição das relações hospedeiro-patógeno simpátricas ou alopátricas pode afetar os modelos de infeção e doença na TB. A questão da predisposição genética do hospedeiro e sua possível influência na duração dos ciclos de transmissão ativa de TB simpátrica que, como vimos, podem estar associados a casos graves de MDRTB, permanece de grande interesse.

Agradecimento:

Este trabalho foi financiado pela Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento (LACR Award program - 2007) e pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Portugal, (POCTI/ESP/44826/2002), com a participação dos fundos da Comunidade Europeia (FEDER).

Este artigo constitui uma tradução abreviada da publicação: David S, Mateus AR, Duarte EL, Albuquerque J, Portugal C, Sancho L, Lavinha J, Gonçalves G. *Determinants of the Sympatric Host-Pathogen Relationship in Tuberculosis*. PLoS One. 2015;10(11):e0140625. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140625>

Referências bibliográficas:

- (1) Grigg ERN. The arcana of tuberculosis with a brief epidemiologic history of the disease in the U.S.A. Parts I and II. *Am Rev Tuberc.* 1958;78(2):151-72.
- (2) Grigg ERN. The arcana of tuberculosis; with a brief epidemiologic history of the disease in the U.S.A. Part III. *Am Rev Tuberc.* 1958;78(3):426-53.
- (3) Stead WW. Genetics and resistance to tuberculosis. Could resistance be enhanced by genetic engineering? *Ann Intern Med.* 1992;116(11):937-41.
- (4) Stead WW. The origin and erratic global spread of tuberculosis. How the past explains the present and is the key to the future. *Clin Chest Med.* 1997;18(1):65-77.
- (5) Sousa AO, Salem JI, Lee FK, et al. An epidemic of tuberculosis with a high rate of tuberculin anergy among a population previously unexposed to tuberculosis, the Yanomami Indians of the Brazilian Amazon. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(24):13227-32. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC24291/>
- (6) Caws M, Thwaites G, Dunstan S, et al. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 2008;4(3):e1000034. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2268004/>
- (7) Herb F, Thye T, Niemann S, et al. ALOX5 variants associated with susceptibility to human pulmonary tuberculosis. *Hum Mol Genet.* 2008;17(7):1052-60.
- (8) Intemann CD, Thye T, Niemann S, et al. Autophagy gene variant IRGM -261T contributes to protection from tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* but not by *M. africanum* strains. *PLoS Pathog.* 2009;5(9):e1000577. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/19750224/>
- (9) van Crevel R, Parwati I, Sahiratmadja E, et al. Infection with *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains is associated with polymorphisms in SLC11A1/NRAMP1 in Indonesian patients with tuberculosis. *J Infect Dis.* 2009;200(11):1671-4.
- (10) Thye T, Niemann S, Walter K, et al. Variant G57E of mannose binding lectin associated with protection against tuberculosis caused by *Mycobacterium africanum* but not by *M. tuberculosis*. *PLoS One.* 2011;6(6):e20908. doi: 10.1371/journal.pone.0020908. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/21695215/>
- (11) Pasipanodya JG, Moonan PK, Vecino E, et al. Allopatric tuberculosis host-pathogen relationships are associated with greater pulmonary impairment. *Infect Genet Evol.* 2013;16:433-40. doi: 10.1016/j.meegid.2013.02.015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/23501297/>
- (12) Gagneux S. Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012;367(1590):850-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3267123/>
- (13) Hirsh AE, Tsolaki AG, DeRiemer K, et al. Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(14):4871-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC387341/>
- (14) Gagneux S, DeRiemer K, Van T, et al. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(8):2869-73. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1413851/>
- (15) Portugal I, Covas MJ, Brum L, et al. Outbreak of multiple drug-resistant tuberculosis in Lisbon: detection by restriction fragment length polymorphism analysis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1999;3(3):207-13.
- (16) David S, Ribeiro DR, Antunes A, et al. Contribution of spoligotyping to the characterization of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. *Infect Genet Evol.* 2007;7(5):609-17.
- (17) Perdigão J, Macedo R, Joao I, Fernandes E, Brum L, Portugal I. Multidrug-resistant tuberculosis in Lisbon, Portugal: a molecular epidemiological perspective. *Microb Drug Resist.* 2008;14(2):133-43.
- (18) David S, Duarte EL, Leite CQF, et al. Implication of the RDRio *Mycobacterium tuberculosis* sublineage in multidrug resistant tuberculosis in Portugal. *Infect Genet Evol.* 2012;12(7):1362-7.
- (19) Filliol I, Driscoll JR, van Soolingen D, et al. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. *J Clin Microbiol.* 2003;41(5):1963-70. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC154710/>
- (20) Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol.* 2006;6:23. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1468417/>
- (21) Vitoll I, Driscoll J, Kreiswirth B, et al. Identifying *Mycobacterium tuberculosis* complex strain families using spoligotypes. *Infect Genet Evol.* 2006;6(6):491-504.
- (22) Allix-Beguec C, Harmsen D, Weniger T, et al. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol.* 2008;46(8):2692-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2519508/>
- (23) Weniger T, Krawczyk J, Supply P, et al. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(Web Server issue):W326-31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2896200/>
- (24) Fenner L, Egger M, Bodmer T, et al.; Gagneux S; Swiss HIV Cohort and Molecular Epidemiology of Tuberculosis Study Groups. HIV infection disrupts the sympatric host-pathogen relationship in human tuberculosis. *PLoS Genet.* 2013;9(3):e1003318. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3591267/>
- (25) Briz T, Nunes C, Alves J, et al. O controlo da tuberculose em Portugal: uma apreciação crítica epidemiológica global. *Rev Port Saude Publica.* 2009;27:19-54. <https://run.unl.pt/handle/10362/4334>
- (26) Rahim Z, Zaman K, van der Zanden AGM, et al. First assessment of major circulating phylogeographical clades of tubercle bacilli found in Bangladesh. In: Abstract Proceeding of the 27th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, London, July 2006.
- (27) Perdigão J, Macedo R, Silva C, et al. Tuberculosis drug-resistance in Lisbon, Portugal: a 6-year overview. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011;17(9):1397-402. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03351.x>
- (28) Lazzarini LC, Spindola SM, Bang H, et al. RDRio *Mycobacterium tuberculosis* infection is associated with a higher frequency of cavitory pulmonary disease. *J Clin Microbiol.* 2008;46(7):2175-83. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2446940/>
- (29) Weisenberg SA, Gibson AL, Huard RC, et al. Distinct clinical and epidemiological features of tuberculosis in New York City caused by the RDRio *Mycobacterium tuberculosis* sublineage. *Infect Genet Evol.* 2012;12(4):664-70. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3290718/>
- (30) Gibson AL, Huard RC, Gey van Pittius NC, et al. Application of sensitive and specific molecular methods to uncover global dissemination of the major RDRio Sublineage of the Latin American-Mediterranean *Mycobacterium tuberculosis* spoligotype family. *J Clin Microbiol.* 2008;46(4):1259-67. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2292928/>
- (31) Stead WW, Bates JH. Geographic and evolutionary epidemiology of tuberculosis. In: Rom WN, Garay SM (eds). *Tuberculosis*. New York: Little, Brown and Company, 1996. pp. 77-83.
- (32) Abel L, Casanova JL. Genetic predisposition to clinical tuberculosis: bridging the gap between simple and complex inheritance. *Am J Hum Genet.* 2000;67(2):274-7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1287174/>
- (33) Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:581-620.
- (34) Novembre J, Johnson T, Bryc K, et al. Genes mirror geography within Europe. *Nature.* 2008;456(7218):98-101. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2735096/>