

# AVANCES EN TUBERCULOSIS

DR. JUAN CARLOS RODRÍGUEZ D.  
INSTITUTO NACIONAL DEL TÓRAX.

## RESUMEN

*La tuberculosis sigue siendo una enfermedad que causa millones de muertes al año. En Chile, aunque ha disminuido considerablemente, hay todavía áreas donde la prevalencia es alta. En los últimos años, gracias a la biología molecular, se han producido importantes avances en el conocimiento de esta enfermedad. Esto ha permitido desarrollar nuevos métodos para el diagnóstico de infección y enfermedad tuberculosa, para detectar en forma rápida la resistencia a drogas y también se ha logrado precisar mejor la forma de transmisión de la enfermedad.*

*Actualmente se están desarrollando nuevas vacunas y nuevas drogas, que esperamos nos permitan pronto un mejor control de la tuberculosis.*

*Aquí hemos revisado en forma somera algunos de los avances, que tienen mayor relevancia clínica*

## SUMMARY

*Tuberculosis is still an infectious disease, which produces millions of dead a year. In Chile although it has diminished considerable, there are still areas with a high prevalence of the disease. Recently, especially due to the molecular biology, there are important advances in the knowledge of the disease*

*There are new methods to diagnostic infection and disease, to detect drug resistance in a few hours*

*We have now a better knowledge about the transmission of the Koch bacilli.*

*New vaccines are under way, as new drugs, with which we expect a better control of the tuberculosis.*

*We have review, some of the advances, especially those with more clinical relevance*

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis ha acompañado a la humanidad por miles de años y, a pesar de los conocimientos actuales, continúa siendo una de las enfermedades infecciosas que mayor mortalidad causa en el mundo.

Anualmente, se estima que mueren más de dos millones de personas a causa de la tuberculosis y que aparecen unos ocho millones de casos nuevos cada año.

Obviamente, la situación epidemiológica en el mundo es muy desigual y el mayor problema de salud está hoy localizado en África y en algunos países de oriente (10).

En Chile actualmente, la incidencia promedio es menor a 15 casos nuevos por 100.000 habitantes (14,6), una de las mejores tasas de Sudamérica. Sin embargo, la variación a lo largo del país es muy importante. Si revisamos datos basados en casos notificados hasta septiembre de 2006 y extrapolados a todo el año (cifras no oficiales), encontraremos lugares como Arica con 37,4/100.000 e Iquique con 35,6/100.000 y, en contraste, el área oriente de Santiago, con 6,1/100.000. Por otra parte, casi la mitad de la población de nuestro país tiene una tasa bajo 10/100.000 habitantes.

Todo esto, a pesar de que en los últimos años han existido avances tan importantes en el conocimiento de la enfermedad, como haber logrado la secuenciación completa del genoma del Bacilo de Koch, el año 1998, por Stewart T. Cole y colaboradores.

Por el estudio de la biología molecular del bacilo, se han obtenido la mayoría de los avances en tuberculosis de los últimos años. Las técnicas moleculares nos han permitido revisar conceptos antiguos y desarrollar algunos nuevos. Haremos una breve reseña de los avances más importantes, separándolos por áreas.

## EPIDEMIOLOGÍA

En el DNA del Bacilo de Koch, existen secuencias de pares de bases que se repiten, que son muy bien conservadas y que no se modifican cuando se multiplica la micobacteria. Estas secuencias de inserción (IS) nos permiten comparar los genotipos de distintas cepas. La más utilizada de estas secuencias para determinar lo que se ha llamado las huellas digitales o "fingerprinting" del *Mycobacterium tuberculosis*, es la IS6110 (9) (10).

Determinando el genotipo de cepas guardadas, en pacientes que recaen, se puede saber si la recaída es una reactivación (las cepas son

genéticamente idénticas) o una reinfección (las cepas son genéticamente diferentes) (4).

En lugares donde las tasas de tuberculosis son altas (como África), se ha visto que la reinfección es frecuente: en cambio, es rara en países de baja prevalencia. Saber de donde provienen la mayoría de los casos nuevos, es de vital importancia para implementar las medidas epidemiológicas adecuadas, y así lograr controlar la enfermedad.

En este sentido, es interesante que en algunas regiones de África, de alta prevalencia, se ha demostrado que pacientes con tuberculosis, tienen hasta cuatro veces más posibilidades de adquirir una reinfección, cuando se los compara con aquellas personas que no han enfermado antes. En otras palabras, la tuberculosis parece no conferir una inmunidad completa. Es posible que los pacientes que enferman, tengan algún defecto genético que los haga más predispuestos a volver a enfermarse.

Con la técnica del "fingerprinting", que determina número y posición de las IS 6110 en cada cepa, se ha confirmado que hasta 1/6 de los casos nuevos de tuberculosis, son contactos de pacientes con bacilos copias negativas y sólo con cultivos positivos, que antes, creíamos eran pacientes poco contagiosos.

También el estudio de las huellas digitales, nos han permitido saber que hay pacientes que tienen más de una cepa micobacteriana y que la contagiosidad de las distintas cepas es diferente; así, por ejemplo, la cepa conocida como Beijing, es más contagiosa y agresiva (9) (10). Estudiando los contactos, con esta técnica, se ha descubierto que en ocasiones los contactos de casos nuevos pueden haber sido tan casuales, como compartir algunas horas en un bar.

El estudio de contactos de casos índices de tuberculosis bacilífera, en nuestro país tiene un alto rendimiento. Así, mientras entre los sintomáticos respiratorios (tos y expectoración por más de dos semanas) necesitamos hacer alrededor de 200 baciloscopías para encontrar un caso, entre los contactos sólo necesitamos practicar 78. Si alguno de los llamados contactos íntimos, (que viven bajo un mismo techo) resulta enfermo, entonces se debe extender el círculo de estudio según la OMS, a contactos menos íntimos y si en este círculo se encuentra otro caso, habría que llegar hasta los contactos casuales.

### CUADRO CLÍNICO

Clásicamente, se aceptaba que en los pacientes que tenían una primoinfección, el compromiso pulmonar era de predominio en lóbulos inferiores y con adenopatías asociadas, lo que denominábamos habitualmente Complejo Primario.

La tuberculosis de reinfección en cambio, afectaba de preferencia los vértices, solía cavitarse y tenía poco o ningún compromiso ganglionar. Estudiando las huellas digitales de los bacilos, en brotes de tuberculosis, se asume que si los bacilos son genéticamente iguales, constituyen un "cluster", es decir provienen de un caso índice. Si son diferentes,

no constituyen un "cluster" y muy probablemente se trata de casos de reactivación endógena. Si asumimos este postulado, y comparamos los cuadros clínicos en ambas situaciones, se ha demostrado que nuestra clasificación anterior era una simplificación y que los casos de infección reciente pueden afectar tanto los lóbulos superiores como los inferiores, y pueden o no cavitarse (5).

La presencia de ganglios se asocia más que a infección reciente, a deficiencias inmunitarias, como ocurre en los pacientes VIH. En los niños se cree que el mayor compromiso ganglionar es debido a un sistema inmune no completamente desarrollado.

Otro hallazgo interesante de los últimos años, ha sido la confirmación, por esputo inducido, que al menos la mitad de las pleuresías tuberculosas, tienen cultivo de la expectoración positivo. Así que la seguridad que antes teníamos, que la pleuresía no contagiaba, es hoy muy discutible.

### DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN

Se considera infectado al paciente que, sin estar enfermo ni vacunado, tiene PPD (+). Se estima que actualmente, un tercio de la humanidad está infectada por el Bacilo de Koch, de los cuales un 10% enfermará (2) (10).

En los países con bajas tasas de tuberculosis, se supone que los nuevos casos vienen de individuos infectados, que no han desarrollado enfermedad. Esta situación también podría aplicarse, por supuesto, a aquellas áreas de entre nosotros que tengan tasas similares a las del área oriente de Santiago.

No existe una forma cierta de diagnosticar infección. Hasta hoy se ha utilizado el PPD, que es una mezcla antigénica, a la que reaccionan, infectados, enfermos y vacunados.

Obviamente, no es específica para infección. Tiene además el inconveniente de requerir dos visitas y la técnica de medición es compleja (10). No se conoce por tanto la especificidad ni la sensibilidad de la reacción del PPD. En nuestro país, donde se aplica la vacuna BCG más de una vez, es aún más difícil su interpretación.

En la actualidad, se han desarrollado dos técnicas para detectar la infección tuberculosa (5, 2). Ellas miden el interferón gama, liberado por linfocitos sensibilizados al Bacilo de Koch. Se utilizan para ello antígenos, casi exclusivos del *Mycobacterium tuberculosis*, que no están presentes en el *M. bovis*, especie con la que se vacuna. Los antígenos más específicos son CFP 10 (Culture Filtrate Protein-10) y ESAT 6. (Early Secretory Antigen Target-6).

Hay ya dos reactivos (kits) comerciales aprobados por la FDA, que son el ELISPOT y el QUANTIFERON, los que miden ya sea el interferón liberado por los linfocitos o el que está en la pared de ellos.

Para el examen se requiere una sola muestra de sangre, la que se incubaba 24 horas con los antígenos respectivos.

Existen ya numerosos trabajos, en los que se han estudiado los contac-

tos de casos índices, comparándolos al PPD, y se ha encontrado que la sensibilidad de estos métodos, es al menos igual que el PPD, pero su especificidad es mayor, ya que no son influidas por la vacuna.

Estas técnicas, no tienen tampoco, el efecto "Booster" que tiene el PPD, y que son las variaciones por efecto de estimulación inmunitaria que se producen al repetir el PPD pero, no han sido suficientemente evaluadas en inmunodeprimidos (8).

Obviamente técnicas como éstas, en nuestro país, donde la vacunación BCG se aplica desde hace muchos años, serían de gran utilidad, especialmente en aquellas áreas, con tasas de tuberculosis que se aproximan a las de países desarrollados. En esas áreas es donde el diagnóstico de infección adquiere mayor relevancia, ya que es de donde se supone vendrá la mayoría de los nuevos casos.

### DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD

Para el diagnóstico de enfermedad contamos hoy día, con las baciloscopías, los cultivos y las técnicas de biología molecular de amplificación de fragmentos del DNA o RNA micobacteriano.

La muestra a procesar es muy importante, y en aquellos pacientes que no producen expectoración o en los cuales las baciloscopías resultan negativas, el esputo inducido ha resultado de mucha utilidad. Esta técnica, que se usó inicialmente en el estudio de pacientes sospechosos de tener una neoplasia, hoy está ampliamente difundida, para obtener muestras para la identificación de *Pneumocystis jiroveci* y Bacilos de Koch (2).

Hay trabajos que confirman que dos muestras de esputo inducido, son superiores a una muestra de lavado broncoalveolar, para el diagnóstico de tuberculosis.

La **fibrobroncoscopia** sigue, sin embargo, teniendo un rol en el diagnóstico de tuberculosis, ya que además permite tomar biopsias bronquiales o transbronquiales, para diagnóstico histológico, cuando la bacteriología es negativa. También es conveniente recordar, que el esputo post broncoscopia tiene buen rendimiento y que el cepillado bronquial, es probablemente la técnica de mayor utilidad para confirmar la presencia del bacilo tuberculoso.

**Cultivo:** Disponemos hoy de medios sólidos y líquidos para el cultivo del Bacilo de Koch. Los líquidos permiten el crecimiento más rápido. También permiten el uso de métodos colorimétricos o radiométricos, los que aceleran la detección del crecimiento microbiano. Otra ventaja de los medios líquidos es que permiten el estudio de sensibilidad (2). Entre los métodos radiométricos el de uso más difundido es el BACTEC, (detecta la producción de CO<sub>2</sub>) y es por supuesto automatizado. El Mycobacterial Growth Indication Tube (MGIT), disponible en el Instituto Nacional del Tórax, es colorimétrico y no automatizado. El BACTEC es mejor, pero significativamente más caro. Existen en el país métodos como éste, sólo para hemocultivos de micobacterias. Con el uso de esta tecnología, los cultivos pueden hacerse positivos antes de las dos semanas.

### TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Las técnicas de biología molecular (BM) que amplifican fragmentos de ácidos nucleicos del bacilo, son sensibles, específicas y rápidas, pero el problema es su costo. La amplificación de los fragmentos de DNA, habitualmente, pero no exclusivamente, se hace por la reacción en cadena de la polimerasa, (PCR).

De las técnicas aprobadas por la FDA (COBAS Amplicor MTB, de Roche, que usa PCR y Bectons Dickinson que usa strand displacement amplification), ambas alcanzan sensibilidades superiores al 90% en pacientes con baciloscopías negativas (directo negativo) y su especificidad es prácticamente 100% (6).

Su utilidad está fundamentalmente en aquellos casos sospechosos de tuberculosis con bacteriología negativa. También en aquellos lugares donde las micobacterias atípicas son frecuentes, porque una baciloscopia (BK) positiva con PCR negativa repetida, es diagnóstica de micobacteriosis. Esto es útil también en los pacientes con SIDA.

Con la utilización de PCR "caseras", en las cuales los fragmentos son diferentes, las sensibilidades bajan considerablemente al igual que la especificidad, por lo que su interpretación resulta extremadamente difícil y deben ser comparadas con las técnicas aprobadas para considerar válidos sus resultados.

### RECOMENDACIONES DE LA FDA

En caso de BK (+) y PCR (-): repetir PCR. Si vuelve a ser (-) considere Micobacteria no Tuberculosa.

En caso de BK (-) y PCR (+): repetir PCR. Si vuelve a ser (+) se presume tuberculosis.

En caso de BK (-) y PCR (-): repetir PCR. Si vuelve a ser (-) se presume no TBC (6).

### TRATAMIENTO

En el programa nacional de tratamiento de la tuberculosis se utilizan esquemas diferenciados, dependiendo de la situación clínica del enfermo.

Siempre hay una fase diaria, seguido de una etapa bisemanal.

#### ESQUEMAS DE TERAPIA SEGÚN EL PROGRAMA NACIONAL

	Fase diaria	Fase bisemanal
Esquema primario	2 meses HRZE	4 meses HR
Esquema primario simplificado	2 meses HRZ	4 meses HR

(H: isoniácida, R: rifampicina, Z: pirazinamida, E: etambutol, )

Las cuatro drogas de la fase diaria se utilizan siempre que exista una alta población bacilar, como ocurre en casos de tuberculosis bacilíferas o en aquellas diseminadas, aún cuando la bacteriología haya resultado negativa.

Cuando la población bacilar es baja, como ocurre en las tuberculosis no bacilíferas, se pueden utilizar tres drogas en la fase diaria.

En los pacientes cavitarios, que tengan cultivos o baciloscopías positivas al segundo mes de tratamiento, se recomienda prolongar el esquema a siete meses. Esto porque el porcentaje de recaídas, si se mantiene el mismo tiempo, es muy alto (22%).

	Fase diaria	Fase bisemanal
<b>Esquema secundario</b>	1 mes HRZES 1 mes HRZE	7 meses HRE

(H: isoniácida, R: rifampicina, Z: pirazinamida, E: etambutol, S: estreptomicina)

Los pacientes antes tratados, que están constituidos por las recaídas y los abandonos, recibirán el esquema secundario, con refuerzo de la fase diaria. Es perentorio el estudio de sensibilidad en estos enfermos y de resultar sensibles a Isoniácida y Rifampicina, se puede suspender el Etambutol de la fase bisemanal.

	Fase diaria	Fase bisemanal
<b>Retratamiento</b>	3 meses KmEtCpZE	15 meses EtCpZ

Cp: ciprofloxacino, E: etambutol, Et: etionamida, Km: kanamicina, Z: pirazinamida,

Los pacientes multiresistentes o con fracasos confirmados a esquemas primarios o secundarios, recibirán este esquema de retratamiento estándar con drogas de excepción, pero son casos que requieren manejo especializado y deberían ser derivados a Centros de Referencia.

### DOSIS DE DROGAS ANTITUBERCULOSAS

<b>Isoniácida</b>	Comprimidos de 100 mg	5 mg/kg/día o 15mg/kg/ bisemanal
<b>Rifampicina</b>	Cápsulas de 150 mg	10 mg/kg/día ó 2/sem.
<b>Pirazinamida</b>	Comprimidos de 500 mg	25 mg/kg/día
<b>Estreptomicina</b>	Frascos de 1 gr	15 mg/kg/día
<b>Etambutol</b>	Comprimidos de 200 mg	20 mg/kg/día

Dosis máximas diarias: H 300mg, R 600 mg, Z 1500, S 750 mgrs.

Dosis máximas Intermitentes : H 900 mg, S 750 mg, E 3.500 mg.

### NUEVAS DROGAS

Los esquemas de tratamiento actuales son eficaces; sin embargo, la aparición de multiresistencia, (Rifampicina e Isoniácida), que en algunas regiones del mundo alcanza cifras alarmantes (hasta 10 % en países Bálticos, Rusia y China) y la aspiración de acortar la duración de éstos, han estimulado la búsqueda de nuevas drogas.

Las drogas pueden ser bactericidas si atacan a los bacilos en activa multiplicación, que son los más numerosos y los que explican los fracasos y la aparición de resistencia. La isoniácida es la mejor droga en este sentido. La capacidad esterilizante se refiere a la propiedad de eliminar los bacilos en multiplicación esporádica, y la Rifampicina es sin duda la mejor, ya que actúa sobre esta población en minutos, en tanto que la isoniácida puede requerir hasta 24 horas (4).

En esta búsqueda, el Moxifloxacino, es el medicamento que ha generado más expectativas. Tiene una "actividad bactericida precoz" (EBA) similar a la de la isoniácida y su capacidad esterilizante es también comparable a la rifampicina (4).

Para medir la EBA se cuentan las colonias en el esputo y se administra la droga por tres a cinco días, con recuentos bacterianos diarios, para medir la reducción que produce el medicamento.

La capacidad esterilizante se mide por la negativización de los cultivos al segundo mes.

El Ciprofloxacino es levemente inferior al Moxifloxacino (4).

En relación a las Quinolonas, parece importante señalar que cuando se trata empíricamente un paciente portador de un infiltrado de naturaleza incierta, éstas deberían evitarse, ya que de ser una tuberculosis, se estaría, por una parte haciendo monoterapia y por otra parte, la regresión parcial del infiltrado nos podría llevar a error.

Dos nuevas Rifamicinas útiles han aparecido: Rifabutina, que se usa especialmente en pacientes con terapia antiretroviral, ya que la Rifampicina tiene interacciones inaceptables con ellos. La Rifapentina tiene la enorme ventaja, que puede usarse una vez por semana. Los americanos recomiendan hoy utilizarla sólo cuando los pacientes no son cavitarios o tiene cultivos negativos al finalizar la etapa diaria. Esto porque la diferente duración en la acción, especialmente en los acetiladores rápidos, puede generar resistencia a la Rifapentina. Hay investigaciones en curso usándola con Moxifloxacino.

### ESTUDIOS DE RESISTENCIA

Las tasas de resistencia en nuestro país son muy bajas, (el porcentaje de casos con resistencia primaria a Isoniácida es sólo 0,4%, uno de los más bajos de América Latina), pero el aumento del HIV, aunque discreto en relación a otros países de la región, y la inmigración desde países vecinos con tasas de prevalencia, superiores a las nuestras, podrían aumentarla.

La resistencia a Rifampicina, que se asocia a resistencia a H en más del 90% de los casos, es la que tiene mayor implicancia en el pronóstico. Por ello es clave determinarla.

El gen rpoB, determina más del 95% de las resistencias a la R(4). Existen "kits" comerciales, que permiten detectar las mutaciones de este gen (9).

La H a diferencia de la R, tiene varios genes que codifican para la resistencia, haciendo más compleja su determinación por métodos genéticos. Estas técnicas moleculares, nos permitirían detectar la multiresistencia en algunas horas.

Desgraciadamente, no tenemos en nuestro país experiencia con ellas, pero esperamos que en centros de referencia como en Instituto Nacional del Tórax, podamos pronto contar con ellas.

### TOXICIDAD

Quizá una de las mayores novedades en lo que se refiere a la toxicidad de la terapia, es que la Pirazinamida se ha consolidado como la droga más hepatotóxica; alcanzado cifras de hasta 3-5 % de los casos.

Cuando se intentó usar R-Z por dos meses, como quimiopprofilaxis en infectados VIH (-) la toxicidad resultó inaceptable, incluso con muertes, lo que obligó a suspender el esquema. Sin embargo, por alguna razón esta toxicidad no se manifiesta en los pacientes VIH (+) (4) (10) (9).

### TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS LATENTE (TL)

Existe mucha controversia en relación a la terapia de la tuberculosis latente, que es como se designa hoy a los infectados con el Bacilo de Koch. El impacto, de tratar la tuberculosis latente, sólo es importante cuando la prevalencia de la enfermedad es baja, como ocurre en los países desarrollados (4) (10) (9).

Sólo hay tres situaciones indiscutibles para hacer quimiopprofilaxis:

Los infectados recientes, especialmente si son niños.

Los coinfectados con VIH.

Los pacientes con secuelas tuberculosas no tratados.

Las demás situaciones deben resolverse sobre bases individuales, sopesando los riesgos de toxicidad versus los beneficios.

Los pacientes con algún grado de inmunodepresión, tienen mayor riesgo, pero no hay estudios randomizados que evalúen la quimiopprofilaxis y tanto el PPD como los exámenes que miden interferón gamma, en esta población con respuesta inmune alterada, tienen también rendimiento variable.

El uso de nuevos medicamentos que afectan el factor de necrosis tumoral alfa, favorece el desarrollo de tuberculosis, especialmente las formas extrapulmonares o diseminadas. Por esto, es indispensable antes de iniciar esta terapia evaluar si existe infección o secuelas de tuberculosis, en cuyo caso es perentorio indicar quimiopprofilaxis.

Hasta hoy la droga más utilizada como quimioterapia es la isoniacida por un período de nueve meses. Pero, una buena alternativa es la R durante cuatro meses que tendría mejor adherencia, menor toxicidad y resultados similares.

La profilaxis de contactos con tuberculosis multiresistentes, es un problema aún no resuelto.

### VACUNACIÓN BCG

Siempre que se piensa cómo erradicar una enfermedad infecciosa, aparece la vacuna, como la medida ideal. Sin embargo a pesar de la

aplicación masiva del BCG, su impacto sobre la epidemiología de la tuberculosis ha sido prácticamente nulo, ya que protege a los menores de cinco años y estos no contagian. No logra proteger de la tuberculosis pulmonar, que es la que importa en la cadena de transmisión.

A pesar de ello, hoy, hay miles de investigadores buscando una vacuna mejor que la BCG. Una vacuna con similares niveles de seguridad que el BCG y que proteja a los no infectados, a los infectados e incluso a los enfermos

Se investigan tres tipos de vacunas (3)

**1/** Vacunas con sub unidades del bacilo: se asume que sólo algunos antígenos del bacilo son responsables de la respuesta inmune protectora.

**2/** Vacunas con cepas viables.

**3/** Vacunas Combinadas : La vacuna BCG por la protección de los niños no puede abandonarse y por ello se ha tratado de adicionarle algunas sub unidades del bacilo, para aumentar su efecto protector.

### BIBLIOGRAFÍA

**1/** Programa Nacional de Control de la tuberculosis, Manual de Organización y Normas Técnicas, 2005.

**2/** Brodie D, Schluger NW. MD Diagnosis of Tuberculosis, Clinics in Chest Medicine, 26, 2005;26: 247-271.

**3/** Kaufmann SHE, H.Willi MittruckerHW, Vaccination against Tuberculosis Current Status and Future Promise. Seminars in Respir and Crit Care Med. 2004;25(3):345.

**4/** American Thoracic Society / Centers for Disease Control and Prevention / Infectious Diseases Society of America: Treatment of Tuberculosis Am J Respir Crit Care Med. 2003;167:603-662.

**5/** Geng E, Kreiswirth B, Burzynski J, Schluger N. Clinical and Radiographic Correlates of Primary and Reactivation Tuberculosis JAMA, 2005; 293:2749-2759.

**6/** Rapid Diagnostic Tests for Tuberculosis. What is Appropriate Use? Am J Respir Crit Care Med 1997; 155:1804-1814.

**7/** Wing Wai Yew ,Chi Chiu Leung, Update in Tuberculosis 2005 Am J Respir Crit Care Med, 2006;173:491-498.

**8/** Tobin MJ. Tuberculosis, Lung infections, Interstitial Lung Disease. Social Issues, and Journalology. Am J Respir Crit Care Med 2004;169:288-300.

**9/** Caminero J. Guía de la Tuberculosis para Médicos Especialistas, 2003 UICER.

**10/** Rodríguez JC, Undurraga A, Enfermedades Respiratorias, Mediterráneo, 1004.