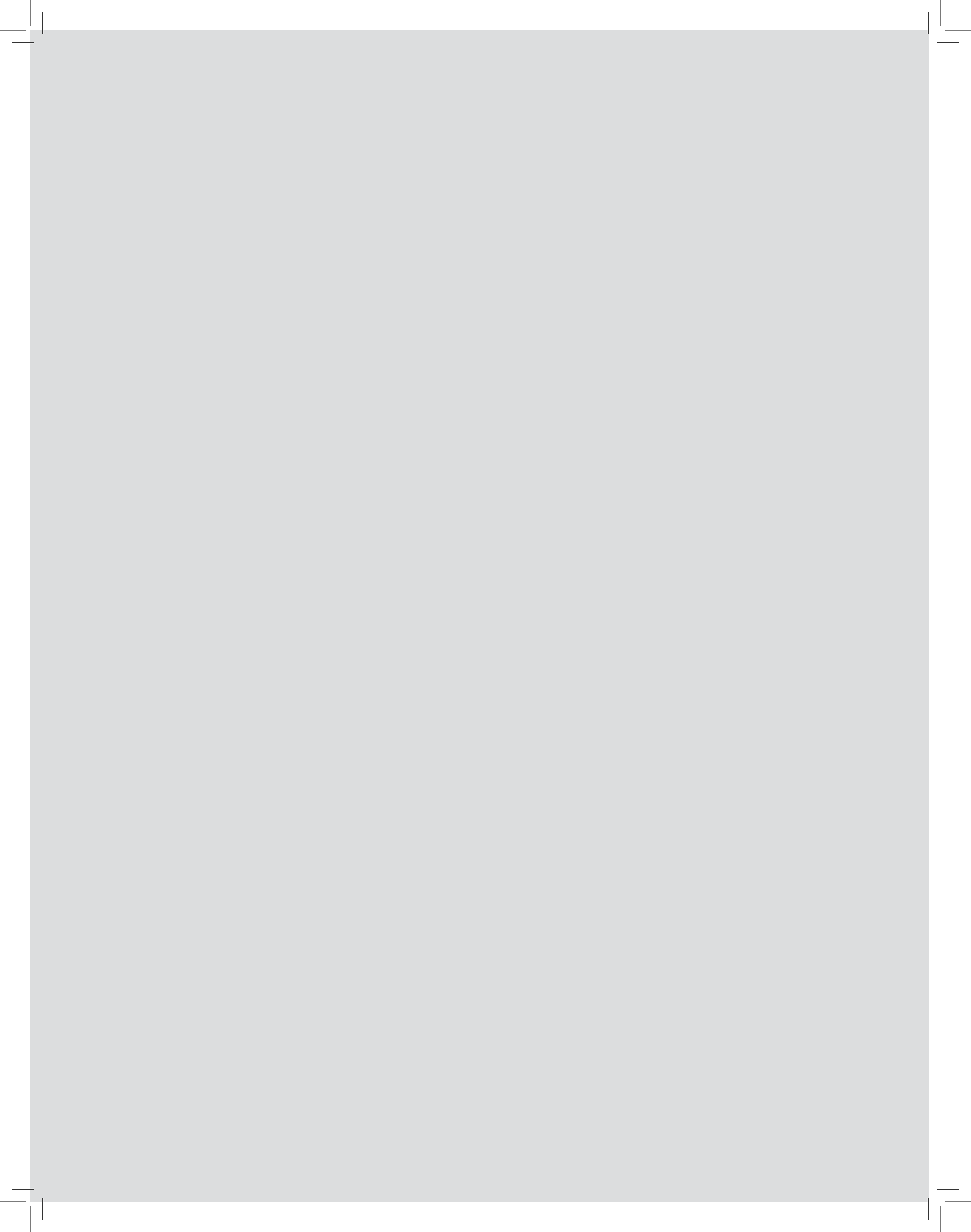




Contribución del análisis RFLP del IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis* al diseño y refinamiento de estrategias para el control de la tuberculosis en Colombia

Contribution of *M. tuberculosis* IS6110 based RFLP assay to the design and refinement of tuberculosis control strategies in Colombia

Doris Amanda Rosero , Helena del Corral¹

Resumen

Una alternativa de mejoramiento de las estrategias para el control de la tuberculosis, la ofrecen los métodos para la diferenciación de cepas de *M. tuberculosis*. La literatura evidencia que la técnica RFLP del segmento de inserción IS6110 está ampliamente estandarizada a nivel internacional y ha demostrado ser un buen instrumento para orientar estrategias locales de control.

Mediante una revisión exhaustiva de la literatura, el presente estudio pretende establecer si esta técnica molecular puede contribuir al diseño y refinamiento de estrategias para el control de la tuberculosis en Colombia.

En esta revisión se analizaron los resultados de los estudios publicados entre 1993 y 2008,

realizados con la técnica en países en desarrollo, incluida Colombia. Los resultados sugieren que en el contexto colombiano esta técnica puede ofrecer información útil para los directores del programa de control de tuberculosis y, por tanto, debe seguir siendo realizada. Para establecer la periodicidad, las poblaciones blanco y otras condiciones óptimas para la realización de la técnica, se necesitan estudios de investigación operativa que incluyan análisis de costo-efectividad y costo-utilidad.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, RFLP- IS6110, control de tuberculosis, Colombia

¹Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
Facultad Nacional de Salud Pública,
Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Correspondencia: Doris Amanda Rosero, Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. roserodoris@hotmail.com

Fecha de recibido: 18/03/2008; **Fecha de aceptación:** 30/05/2008

Abstract

Molecular biology methods offer an alternative for improving tuberculosis control strategies through *M. tuberculosis* strain typing techniques. The international literature shows that RFLP of the insertion element IS6110 is widely standardized internationally and has proved to be a useful tool to guide local tuberculosis control strategies.

By means of a thorough literature review, this study aimed to determine if this molecular based method could be useful for the design and refinement of tuberculosis control strategies in Colombia. Results from epidemiologic studies published between 1995 and 2008 which used this technique in developing countries, including Colombia, were analyzed.

Our results suggest that in the Colombian context this molecular technique can provide useful information for tuberculosis program control directors and therefore it should continue to be performed. However, to establish periodicity, target populations and other aspects related to optimal conditions for accurate RFLP performance, must await further evidence from operational research studies including cost effectiveness and cost utility analyses.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, RFLP- IS6110, tuberculosis control, Colombia

Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que un tercio de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis¹. El mecanismo de transmisión más importante de *M. tuberculosis* es la vía aérea. La transmisión ocurre a través de partículas líquidas de 1 a 5 µm, diseminadas en el aire cuando un

individuo con tuberculosis y baciloscopia positiva tose, habla o estornuda. A pesar de que estas partículas pueden contener uno o varios bacilos, sólo las formadas por condensación de otras de mayor tamaño, son las realmente infecciosas².

Una vez ocurre la infección, sólo 10% de las personas desarrollan la enfermedad en alguna época de su vida¹. Sin embargo, en el 2006 el número de casos nuevos de tuberculosis notificados a la OMS, fue de 9,2 millones (139 por 100.000 habitantes) y, a pesar de que existen medicamentos para tratar efectivamente la enfermedad, la cifra estimada de muertes correspondió a 1,7 millones³.

En Colombia, el perfil epidemiológico de la tuberculosis ubica la enfermedad como un problema prioritario para la salud pública del país: en el 2007, se reportaron 8.186 casos de tuberculosis⁴ y en el 2008, con corte a la semana epidemiológica 20, se han reportado 2.322 casos nuevos de tuberculosis pulmonar⁵. La tasa de incidencia estimada por la OMS es de 45 casos por 100.000 habitantes³, cifra que difiere de las tasas reportadas por las secretarías locales de salud: 75,9 en la Guajira, 56,8 en el Quindío, 50 en el Meta, 42,5 en Risaralda y 40 en El Valle⁶. Por otro lado, otras regiones presentan tasas de incidencia por debajo de la estimada por la OMS: 35 en Tolima, 30,8 en Norte de Santander, 30 en Antioquia, 25,9 en Santander, 19 en Caldas, 9,7 en Bolívar, 32 a 37 en Barranquilla, 25,7 en Santa Marta, 16 a 17 en Cartagena y 14,5 en Bogotá⁶.

Lo anterior indica que, en Colombia, sigue transmitiéndose esta enfermedad y que, en realidad, las tasas reportadas serían mayores, teniendo en cuenta que en el país ha disminuido la búsqueda de los pacientes sintomáticos respiratorios⁷ y existen deficiencias en el

seguimiento de los pacientes para la búsqueda de contactos⁶. Lo anterior agrava más el problema del retraso en el diagnóstico e inicio del tratamiento oportuno⁸, situación que se está presentando debido a la descentralización de los programas de salud pública, que ha dificultado la instauración de los procesos técnicos para el control de la tuberculosis.

Además, la estructura del actual sistema general de seguridad en salud ha conducido a una falta de coordinación entre los diferentes estamentos del sistema de salud que han ido en deterioro del control efectivo de la tuberculosis. En Colombia existen unas guías y un esquema de tratamiento para el control de la tuberculosis, pero su puesta en marcha es compleja y su eficacia real muy limitada para lograr una captación temprana de los casos bacilíferos y, por tanto, transmisores de *M. tuberculosis*⁹⁻¹¹. Un individuo bacilífero infecta entre 10 y 15 personas por año; de ahí la importancia de detectarlos oportunamente para brindarles el tratamiento adecuado, cuyos objetivos son la curación del enfermo de tuberculosis y cortar la cadena de transmisión de *M. tuberculosis*¹².

Para el programa de control de la tuberculosis¹³, sería de utilidad conocer en qué medida se está logrando impactar la transmisión. Esto implicaría conocer la proporción de los casos que se presentan entre los convivientes (contactos) y cuántos de estos casos se deben a la transmisión reciente por el caso índice o son producto de una reactivación endógena. Con la microbiología tradicional de las micobacterias basada en cultivo y microscopía¹⁴, no es posible diferenciar la enfermedad de tuberculosis por transmisión reciente de una patología por reactivación de una infección latente. Esta información es importante para identificar los contextos en que no se está logrando cortar

la cadena de transmisión de *M. tuberculosis* en una determinada población^{15,16}. Una alternativa promisorio para identificar esta circunstancia surge de la biología molecular con el desarrollo de métodos para la diferenciación de cepas de *M. tuberculosis*. Entre estos métodos está el análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (restriction fragment length polymorphism, RFLP) que usa como sitios blanco las secuencias de inserción IS6110¹⁷.

Se han descrito tres áreas principales de investigación aplicando y estandarizando la técnica:

- 1) estudio de la transmisión de *M. tuberculosis* en las comunidades más susceptibles,
- 2) transmisión del bacilo en hospitales y
- 3) tuberculosis asociada a la coinfección con el VIH¹⁸.

Sin embargo, si bien la técnica ha sido internacionalmente validada y estandarizada¹⁷, los países en los que se ha demostrado su utilidad han sido principalmente naciones industrializadas¹⁹⁻²³ con situaciones específicas habitualmente muy diferentes a las colombianas que, además, pueden afectar el grado de aplicabilidad de la técnica en nuestro país. Lo anterior reclama un análisis cuidadoso de la utilidad de este tipo de tecnologías para proponer intervenciones en enfermedades de interés en salud pública. Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue determinar en qué medida puede contribuir el estudio de los RFLP del IS6110 como apoyo a los programas de control de la tuberculosis en Colombia.

Huellas generadas con el RFLP del IS6110

Al comparar las huellas del RFLP con la información epidemiológica, se puede diferenciar la tuberculosis producida por una infección reciente de la debida a una reactivación endógena con base en dos premisas que se ilustran en la tabla 1.

Es así como:

- 1) se espera que los aislamientos de pacientes con tuberculosis sin relación epidemiológica presenten una amplia variabilidad en sus genotipos, porque se estima que provienen de infecciones antiguas adquiridas con cepas diferentes;
- 2) se espera que los genotipos de aislamientos de pacientes con alguna relación epidemiológica sean idénticos o similares (variación en una sola banda) por ser el resultado de una transmisión reciente de *M. tuberculosis* (24,25).

Tabla 1. Premisas fundamentales para diferenciar tuberculosis debida a reactivación endógena de infección antigua Vs. transmisión activa por una fuente común

Genotipo	Únicos y diferentes	Idénticos o similares
Huella RFLP del IS6110		

Nexos epidemiológicos esperados	No	Si
Supuesto	Reactivación de infección antigua	Transmisión activa por una fuente común

Los aislamientos de pacientes (dos o más) que presentan patrones de RFLP idénticos o similares se agrupan en un mismo grupo clonal, conocido en la literatura anglosajona como cluster (conglomerado)²⁶. El porcentaje de agrupamiento es definido por varios autores con base en la proporción de aislamientos que presentan 100% de similitud con otro(s)²⁷. Sin embargo, se han reportado situaciones de pacientes con nexos epidemiológicos comprobados que presentan similitudes de de 70% o mayores²⁸ y de 90% o mayores²⁹, con pequeñas diferencias en sus patrones de RFLP, por ejemplo, la presencia o ausencia de una banda³⁰⁻³⁵. Lo anterior sugiere que el criterio para definir el nivel de similitud aceptado para la conformación de un conglomerado puede variar en la medida que exista mayor conocimiento de las poblaciones bacterianas en los contextos específicos.

Ventajas y limitaciones de la técnica de RFLP del IS6110

La principal ventaja de este método es que cuenta con un protocolo estandarizado internacionalmente¹⁷, lo cual facilita la comparación de los datos producidos en laboratorios a través del mundo.

La técnica implica:

- 1) cultivo abundante de *M. tuberculosis* (aproximadamente, 4 a 8 semanas);

- 2) extracción y purificación del ADN del cultivo positivo;
- 3) digestión con la enzima de restricción *PvuII* la cual ha sido recomendada porque corta la secuencia IS6110 una sola vez;
- 4) electroforesis, incluyendo en cada gel la cepa de referencia de *M. tuberculosis*;
- 5) transferencia del ADN a una membrana de nitrocelulosa (Southern Blot);
- 6) hibridación con sonda (de 246 pares de bases) complementaria al IS6110 y marcada con peroxidasa para detección por quimioluminiscencia, y
- 7) análisis del grado de similitud de los patrones obtenidos¹⁷.

Una de las limitaciones de la técnica está dada por el número de copias del IS6110; una relación clonal entre cepas de *M. tuberculosis* no puede ser inferida cuando las cepas poseen copias únicas o un bajo número (menor de 5) de copias del marcador IS6110.

Frente a esta situación, las cepas presentan un grado limitado de polimorfismo y el método no se considera discriminador³⁶⁻³⁸. Por esta razón, es aconsejable utilizar métodos complementarios con otros marcadores, como el spoligotyping que utiliza el locus DR³⁹, el MIRU o ambos, que permite categorizar el número y el tamaño de las secuencias VNTR⁴⁰. Otra desventaja importante de la técnica es que utiliza ADN genómico, y requiere cultivos abundantes del *M. tuberculosis* y largos períodos de preparación antes de arrojar resultados. Este requisito técnico también limita la aplicabilidad de la técnica pues está restringida a muestras fácilmente cultivables³⁶⁻³⁸.

En cuanto a las ventajas y limitaciones del método ya descritas, existen publicaciones

en las que se describen aspectos prácticos de la aplicación de la técnica de RFLP del IS6110 en países con bajo desarrollo tecnológico, los cuales fueron tenidos en cuenta para el análisis del presente estudio.

Materiales y métodos

Búsqueda bibliográfica. Adoptando algunas recomendaciones de la metodología descrita para la realización de revisiones sistemáticas, se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva de los estudios realizados con el RFLP del IS6110 y que fueron publicados entre 1995 y 2008 inclusive (tabla 2). Se utilizaron diferentes bases de datos electrónicas y se definieron varias palabras clave y combinaciones de ellas. La búsqueda electrónica arrojó un total de 697 estudios y, previa remoción de los artículos duplicados, se incluyeron en el estudio 343.

Tabla 2. Resultados de la búsqueda bibliográfica

Publicaciones con el uso del RFLP del IS6110		
Palabras clave	Medios	Resultados
Molecular epidemiology, <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , RFLP IS6110	Entrez PubMed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi)	225
	Emerging Infectious Diseases Journal http://www.cdc.gov/ncidod/EID/index.htm	276
Molecular epidemiology, tuberculosis	The New England Journal of Medicine (http://content.nejm.org/)	23
	Science@direct (http://www.sciencedirect.com)	81
Molecular epidemiology, tuberculosis, RFLP	The Lancet (http://www.thelancet.com)	10

Epidemiología molecular, RFLP-IS6110, tuberculosis	Instituto Nacional de Salud, Colombia (http://www.ins.gov.co)	5
	Opac, Universidad de Antioquia (http://opac.udea.edu.co)	12
DNA typing, molecular epidemiology, RFLP IS6110, transmission dynamics, tuberculosis.	Buscador Google en internet *	45
Epidemiología molecular, RFLP IS6110, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Buscador Google en internet * http://www.google.com (en español)	20
Total		697
Estadísticas, informes epidemiológicos, guías y recomendaciones		
Palabras clave	Medios	Resultados
Report, tuberculosis	Organización Mundial de la Salud (OMS) http://www.who.int/tb/publications/en/	NA
Tuberculosis	Organización Panamericana de la Salud http://www.paho.org	NA
Tuberculosis	Unión Internacional contra la tuberculosis y enfermedades respiratorias, www.uicter.org	NA
Tuberculosis, Colombia	Buscador Google en Internet* http://www.google.com	NA

*Se realizó una búsqueda avanzada utilizando las palabras clave enunciadas en la tabla y en los idiomas señalados.

NA: para estas publicaciones no se tuvo en cuenta el número encontrado en las búsquedas, debido a que se recopilaban las más recientes.

Además, se realizó una búsqueda de las publicaciones con estadísticas y análisis epidemiológicos de la situación de la tuberculosis

a nivel mundial y nacional, para identificar los niveles de necesidad del diseño de nuevas estrategias de apoyo a los programas de control. De manera similar, se buscaron y recopilaban las guías y recomendaciones para el control de la tuberculosis nacionales e internacionales (tabla 2).

Recopilación del material. Todo el material encontrado en las búsquedas bibliográficas se recopiló en documentos escritos en carpetas, en archivo formato PDF o contenido en Word, versión 2003, como artículos en texto completo y resúmenes. A través del proceso de búsqueda y revisión bibliográfica, se diseñaron y construyeron dos bases de datos en Access, versión 2003. Los datos que se tuvieron en cuenta para la elaboración de las tablas en Access, se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Datos de las bases de datos construidas en Access, versión 2003

Publicaciones con el uso del RFLP del IS6110	
Tabla	Contenido
Autores	Código, autor 1, autor 2, autor 3, y et al., si existían más de tres autores
Títulos	Código, título, fuente de publicación, fecha, volumen y número, páginas, tipo de publicación y disponibilidad
Fuente de publicación	Revistas nacionales e internacionales
Tipo de publicación	Original, revisión, resumen, revisión sistemática y otros: actualizaciones, comunicaciones cortas y perspectivas
Disponibilidad	Documentos en carpetas, artículo en PDF, contenido en Word
PDF	Código, PDF
Contenido en Word	Código, Word
Estadísticas, informes epidemiológicos, guías y recomendaciones	
Tabla	Contenido

Datos generales	Título, autores, fuente de publicación, fecha, volumen y número, páginas, tipo de publicación y disponibilidad
Fuente de publicación	CDC, OMS, OPS, UICTER
Tipo de publicación	Reportes, reportes de la OMS, informes epidemiológicos, guías y recomendaciones
Disponibilidad	Documentos en carpetas, artículo en PDF, contenido en Word

La primera base de datos contiene las publicaciones en las cuales se usaba la técnica de interés, y la segunda, la literatura con estadísticas e indicadores epidemiológicos, además de guías y recomendaciones. Luego de cada búsqueda se revisaron las referencias de interés citadas en las publicaciones recopiladas y se identificó su disponibilidad en las bases de datos para identificar y agregar artículos faltantes.

Se encontraron 343 publicaciones que usaban la técnica y se clasificaron, así: 264 artículos originales, 38 artículos de revisión, una revisión sistemática, 28 resúmenes y 13 publicaciones se encontraron clasificadas como tipo A. En este grupo A se ubicaron: las actualizaciones, las comunicaciones cortas, las discusiones y los artículos de opinión (perspectivas). Toda la literatura recopilada se clasificó, además, según el año de publicación, separándolas por tipo de publicación. Con respecto a las estadísticas, guías y recomendaciones, 38 publicaciones también se clasificaron por año y se separaron por tipo de publicación.

Literatura seleccionada para el análisis.

Para la selección de la literatura se elaboraron unos criterios de inclusión, teniendo en cuenta los parámetros que se muestran en la tabla 4. Cabe aclarar que, con respecto a las tasas de tuberculosis y el tipo de población, para la selec-

ción de la literatura se tuvo en cuenta el cumplimiento de los dos o uno de estos criterios.

Guías y materiales para el análisis crítico.

Para la realización de una lectura y un análisis crítico de la literatura seleccionada, se elaboró una guía (tabla 5) teniendo en cuenta aspectos relevantes que deben ser revisados para determinar la calidad y utilidad de las publicaciones^{41,42}. Los principales hallazgos de los resultados de las investigaciones relacionadas con las dinámicas de transmisión se registraron en la tabla 6, donde aparecen la cantidad de aislamientos utilizados en el estudio, el porcentaje de agrupamiento de los patrones de RFLP y el número de segmentos de inserción.

Tabla 4. Criterios de inclusión para la selección de la literatura

Parámetro	Criterios de inclusión
Tipo de estudio	Artículos originales, resúmenes que suministren datos propios o ambos
Población	Países con ingreso bajo, medio bajo y medio alto (según clasificación del Banco Mundial, www.bancomundial.org)
Uso del análisis RFLP del IS6110	Dinámicas de transmisión de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Investigación de brotes Estudios de contactos Investigaciones de la rápida progresión de casos de tuberculosis con coinfección por VIH, inmunosuprimidos o ambos Detección de contaminación cruzada en los laboratorios
	Evaluación de aislados con diversos patrones de susceptibilidad a medicamentos antituberculosos Identificación de factores de riesgo Evaluación de programas de control de tuberculosis
Idiomas	Inglés, español o portugués

Fecha de publicación	Entre los años 1995 y 2008
Tasas de tuberculosis	Similares a las de Colombia y dentro del mismo rango de riesgo establecido por la OMS: - Incidencia: 25-49 casos (todas las formas) por 100.000 habitantes ³ - Prevalencia: 59 casos (todas las formas) por 100.000 habitantes ³

Resultados y discusión del análisis crítico

De las 343 publicaciones con el uso de la técnica, sólo 14,3% (49 artículos) cumplieron con los criterios de inclusión descritos en la tabla 4. La gran mayoría de las investigaciones que referían el uso de RFLP del IS6110 se realizaron en poblaciones de países desarrollados. Se encontró que todas las investigaciones seleccionadas cumplieron los ítems 1 y 2 (tabla 3) en cuanto a claridad de la pregunta de investigación, objetivos e hipótesis de trabajo. Además, los estudios analizados aplicaron la técnica siguiendo las recomendaciones descritas en el protocolo estandarizado internacionalmente¹⁷, lo cual facilitó el análisis del tercer punto. Así mismo, el personal que desarrolló los estudios cuenta con trayectoria de trabajo en el tema; esto se deduce por las publicaciones realizadas por estos investigadores y sus colaboradores. Por otro lado, las credenciales que aparecen en las publicaciones indican que el personal involucrado en el desarrollo de los estudios tenía conocimientos básicos sobre biología molecular y epidemiología, importantes para un buen análisis de los resultados.

Tabla 5. Guía para la lectura crítica de la literatura seleccionada

A. ¿Son válidos los resultados del estudio?
1. ¿Se orienta el artículo a una pregunta claramente definida y relacionada con la epidemiología molecular de la tuberculosis?
2. ¿Están definidos con claridad los objetivos del estudio?, ¿las hipótesis están claramente definidas?
3. ¿Cuál es el protocolo para la aplicación de la técnica?
4. ¿Cuál es el tamaño de la muestra?
5. ¿Cuál fue el número de aislamientos en los que se realizó el análisis RFLP del IS6110 y a qué porcentaje del total de aislamientos corresponde?
6. ¿De donde provienen los recursos económicos para la realización de los estudios?
7. ¿El título expresa lo que el autor pretendía demostrar en su trabajo?
8. ¿Se realizaron pruebas de tipificación complementarias en los aislamientos que presentaron bajo número de copias del marcador IS6110?
B. ¿Cuáles fueron los resultados?
1. ¿El personal que desarrolló el estudio cuenta con trayectoria de trabajo en el tema? Si la respuesta es afirmativa, ¿cuántas publicaciones ha realizado?
2. ¿Cuál es el criterio de similitud aceptado para la formación de un conglomerado?
3. ¿Cuál fue el porcentaje de agrupamiento de los aislamientos estudiados?
4. ¿Cómo se realizó el análisis de los resultados?
5. ¿Los resultados obtenidos son comparables con bases de datos existentes a nivel internacional?
6. ¿Se realizaron pruebas de sensibilidad a medicamentos?
7. ¿Los resultados obtenidos son comparables con otros estudios publicados para la misma población nacional?
C. ¿Los resultados me ayudan a cumplir los objetivos propuestos?
1. ¿Pueden los resultados ser extrapolados a un país como Colombia?
2. ¿Las condiciones de prevalencia de tuberculosis, socioeconómicas o ambas son similares a las de Colombia?
3. ¿Se consideran todos los resultados obtenidos de importancia como apoyo a los programas de control de la tuberculosis?
4. ¿Se estima que los beneficios obtenidos justifican los riesgos y los costos de la realización de la técnica?
5. ¿Se llegó a conclusiones válidas sobre el significado de la investigación dentro del control de la tuberculosis?

6. ¿Tuvieron utilidad epidemiológica para el control de la tuberculosis, los estudios derivados de las huellas moleculares?

De acuerdo con el uso de la técnica, la mayoría de los estudios se realizaron para conocer las dinámicas de transmisión de *M. tuberculosis* en una determinada población (39 de los de los 49 artículos). Los hallazgos recopilados en la tabla 6, además de mostrar los patrones de RFLP, muestran la importancia de aproximarse a establecer el porcentaje de casos que ocurren como consecuencia de transmisión

reciente, esclareciendo así el comportamiento de la epidemiología de la tuberculosis y el contraste con el antiguo supuesto de que la mayor parte de los casos resultan de reactivaciones endógenas^{26,43}. El porcentaje de agrupamiento fue definido por la mayoría de los investigadores como aquellos aislamientos que presentan total similitud^{27,34,44-60}. Sin embargo, en otros estudios, los autores definieron como criterio de agrupamiento los aislamientos que presentan porcentajes diferentes y superiores a 60% (tabla 6)⁶¹⁻⁶⁵.

Tabla 6. Cantidad de aislamientos, patrones RFLP y número de la secuencia IS6110

Lugar de estudio y fecha de publicación ^{ref}	Cantidad de aislamientos	Patrones de RFLP			IS6110		
		Similitud (%)	Agrupamiento (%)	Grupos clonales (n)	Nº de copias	Bajo Nº de copias	Ninguna copia
Bogotá, Colombia, 2008 ⁶¹	129	≥90	26	17	5-25	1	0
Brasil, 2008 ⁶⁶	112	NR	31,3	14	NR	NR	NR
Buenos Aires, Argentina, 2007 ²⁷	208	100	30,2	6	NR	NR	NR
África del sur, 2007 ⁶²	246	≥70	47,2	20	8-17	NR	NR
Paraguay, 2007 ⁶⁷	165	NR	39,4	19	4-19	NR	NR
Río de Janeiro, Brasil, 2007 ⁵⁸	32	100	65,6	3	8-13	NR	NR
Montería, 2006 ⁶³	25	≥70	20	2	3-13	1	10
Rio Grande do Sul, Brasil, 2006 ⁴⁴	262	100	36	20	2-18	7	0
Goiás, Brasil, 2006 ⁶⁸	4	NR	0	0	10-13	NR	NR
Argentina, 2006 ⁴⁵	40	100	72,5	4	NR	NR	NR
Venezuela, 2006 ⁵⁹	14	100	43	3	NR	NR	NR
Lima, 2005 ⁴⁶	118	100	29,7	14	2-15	7	0
Brasil, 2005 ⁶⁹	77	NR	33,8	13	NR	NR	NR
Porto Alegre, Brazil, 2004 ⁴⁷	55	100	29,1	8	2-18	3	0
Monterrey, México, 2004 ⁷⁰	34	NR	58,8	NR	2-14	10	0
Argentina, 2003 ⁷¹	49	NR	73,5	6	6-25	0	0
Campinas, Brasil, 2003 ⁴⁸	76	100	22,4	7	6-21	0	0
Callao, Perú, 2003 ⁷²	70	NR	48,6	14	2-16	4	0
Perú, 2003 ⁷³	27	NR	14,8	2	2-17	3	0
Bauru, São Paulo, Brasil, 2002[49]	57	100	26,3	5	3-17	1	0

14 regiones de Colombia, 2002 ⁶⁴	53	>60	81	7	0-18	6	4
La Habana, Cuba, 2001[60]	51	100	45	7	6-20	0	0
Cuba, 2001 ⁵⁰	15	100	73,3	1	8-10	0	0
Monterrey, 2001 ³⁴	166	100 34	39	22	0-18	47	1
Sudáfrica, 2000 ⁵¹	371	100	67	62	NR	48	0
São Paulo, Brasil, 2000 ⁷⁴	151 VIH+	NR	38	NR	2-20	7	0
	142 VIH-		25	NR			
Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Brasil, 2000 ⁶⁵	219	≥90	32	25	1-18	12	0
La Habana, Cuba, 2000 ⁵²	14	100	78,6	1	9-10	0	0
México, 2000 ⁵³	95	100	40	10	5-11	0	0
Buenaventura, 2000 ⁵⁴	34	100	41	6	NR	NR	NR
	111		40	18	NR	NR	NR
Guaviare, 1999 ⁷⁵	55	NR	60	5	6-17	0	0
Brazil, 1998 ⁵⁵	78	100	12,8	5	1-17	NR	0
Lima y Cuzco, 1998 ⁵⁶	29	100	6,9	1	4-18	2	0
Cuba, 1998 ³⁵	38	NR	44,7	5	2-16	NR	0
Buenos Aires, 1997 ⁷⁶	77	NR	89,6	89,6	89,6	89,6	89,6
Sudáfrica, 1997 ⁵⁷	246	100	45	39	1-25	15	0
Honduras, 1997 ⁷⁷	84	NR	25	10	2-17	4	0
Buenos Aires, 1996 ⁷⁸	28	NR	35,7	1	NR	NR	NR
Quindío, 1995 ⁷⁹	27	SAB>0,25	74	5	6-17	0	0

NR: no reporta

Adaptado de: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Enfermedades Infecciosas, principios y prácticas. 5ª edición, Vol I. Editorial Médica Panamericana; 2000. p. 211.

También se reportaron pacientes con nexos epidemiológicos comprobados con la ausencia o presencia de una banda adicional^{72,74}. Los porcentajes de agrupamiento han sido empleados para estimar el grado de transmisión activa en una población^{45,50-52,58,64,71,75,78,79} y parecen tener más importancia en poblaciones de alto riesgo como la de los hoteles^{80,81} y los hospitales^{31,50,52,76} donde existe mayor probabilidad de que individuos susceptibles se infecten con *M. tuberculosis* y desarrollen la enfermedad rápidamente tras adquirir la infección con el bacilo.

Lo anterior ha sido posible gracias a la descripción y aplicación de técnicas moleculares como RFLP del IS6110, que facilitan la diferen-

ciación entre las reactivaciones endógenas y los casos que resultan de una transmisión activa del bacilo⁸². Estas técnicas cobran mayor utilidad aún en la descripción y el análisis de datos provenientes de focos epidémicos. Por ejemplo, P. Godfrey y colaboradores encontraron que, a pesar de que la terapia antituberculosa curaba el 86% de los casos nuevos de tuberculosis en Sudáfrica, el 67% de 371 aislamientos del bacilo procedentes de una comunidad de mineros estaban agrupados, lo que sugería que esa proporción de los casos adquirió la enfermedad por transmisión reciente, específicamente por reinfección⁵¹.

En Colombia, se han publicado seis estudios con el uso del RFLP del IS6110. Cuatro estudios se realizaron en regiones particulares: Quindío⁷⁹, Guaviare⁷⁵, Buenaventura⁵⁴ y Bogotá⁶¹.

Otro estudio multicéntrico se realizó en 14 regiones de Colombia⁶⁴ y un sexto estudio se hizo en un área del Caribe colombiano⁶³. El hecho de haber encontrado reiteradamente elevado el porcentaje de aislamientos de *M. tuberculosis* en grupos clonales, 74%, 60% y 81% (tabla 6), en los estudios realizados en Quindío⁷⁹, Guaviare⁷⁵ y el multicéntrico⁶⁴, respectivamente, permite afirmar que las herramientas del programa de control no están siendo efectivas, pues se demuestra que existe una diseminación activa del bacilo y, por tanto, no se está logrando cortar la cadena de transmisión.

Por otro lado, en el estudio realizado en Bogotá, el bajo porcentaje de agrupamiento (26%, tabla 6) sugiere que la mayoría de los casos de tuberculosis en la ciudad se están presentando como consecuencia de una reactivación endógena de infecciones adquiridas con cepas distintas y no son atribuibles a una transmisión activa de *M. tuberculosis*⁶¹. Sin embargo, esta situación podría haberse presentando debido a la disminución de la búsqueda de síntomas respiratorios⁷ y las deficiencias en el seguimiento de los pacientes para la búsqueda de contactos⁶. En el caso de Buenaventura, el estudio molecular de un aparente brote permitió identificar la causa del mismo entre las fallas administrativas del programa local de control de tuberculosis⁵⁴. Por esta razón, para medir el progreso de las medidas de control de tuberculosis en Colombia, particularmente respecto al impacto sobre la transmisión, la realización periódica de estudios con técnicas moleculares como el análisis RFLP del IS6110 sería de gran utilidad.

El uso de esta técnica puede servir, no sólo para identificar prioridades para los programas locales de control, sino también, para explicar las dinámicas de transmisión a escala global, como ocurrió en Brasil, donde Suffys y colabo-

radores encontraron que 15% de 219 cepas brasileñas compartían patrones RFLP idénticos con aislamientos de otros países, como Argentina, Zambia, Sudáfrica e India, entre otros⁶⁵. Investigaciones como éstas demuestran la gran utilidad que tiene la epidemiología molecular para la vigilancia epidemiológica de enfermedades transmisibles en un mundo globalizado. Cabe aclarar que Roscani y colaboradores sugieren, para la realización de este tipo de estudios, velar por obtener tamaños de muestra adecuados, porque en el estudio mencionado anteriormente el tamaño de la muestra limitó mucho la extrapolación de los hallazgos, lo cual afecta su validez externa⁴⁸.

Por otro lado, para mejorar el control de la tuberculosis en Colombia, sería útil disponer de esta técnica para emprender investigaciones que, además de identificar la proporción de casos debido a transmisión activa^{35,60}, permitan caracterizar brotes para controlarlos rápida y eficazmente, y evitar dar respuestas inadecuadas que pueden hacer más daño que bien. Esto lo sugieren las experiencias de países como Argentina^{78,80}, Brasil⁸³, Cuba⁵² y México⁵³, donde los hallazgos de genotipificación micobacteriana, relacionados con los datos epidemiológicos, permitieron confirmar la presencia de brotes e identificar casos primarios en instituciones y lugares donde se presentan factores de riesgo para la transmisión de *M. tuberculosis*.

El uso del RFLP del IS6110 también ha permitido identificar situaciones en las cuales la transmisión reciente progresa rápidamente a enfermedad tuberculosa, lo cual afecta a cualquier persona sin importar su edad, sexo o estado de coinfección con el VIH^{47,49}. Estas situaciones requieren cambios inmediatos con reestructuración de las estrategias de control.

En otros casos, también se han encontrado asociaciones de la tuberculosis con factores de riesgo específicos. En Brasil, por ejemplo, Ferrazoli y colaboradores sugirieron que la proporción de casos por transmisión reciente (tabla 6) podía ser mayor en los individuos positivos para VIH (38%)⁷⁴. Además, en Argentina, Alito y colaboradores encontraron que 11 aislamientos que compartieron patrones de RFLP idénticos, fueron positivos por VIH y compartieron el mismo perfil de resistencia a medicamentos antituberculosos³¹. Estas investigaciones demuestran la utilidad que tiene la técnica de RFLP para dilucidar los problemas que puede traer consigo la coinfección VIH/*M. tuberculosis*, como es la transmisión de cepas multirresistentes. En Colombia, Castiblanco y Ribón, mediante métodos microbiológicos y epidemiológicos convencionales, hallaron que en 65 de 149 casos de coinfección VIH/*M. tuberculosis* no se identificó la posible fuente de infección y que en cuatro casos el posible foco de transmisión fue hospitalario⁸⁴. En estos casos, en los cuales no es posible identificar las fuentes de infección con métodos convencionales, los estudios que utilizan métodos moleculares, tienen un gran valor epidemiológico pues la identificación de las fuentes de infección permite enfocar las estrategias de control en puntos clave. Lo anterior es posible porque se espera que los aislamientos de pacientes infectados por una fuente común tengan huellas idénticas, mientras que los aislamientos que provienen de fuentes diferentes exhiben patrones distintos²⁶. Además, con la identificación de estas fuentes de infección se podrían mejorar los puntos de partida para las investigaciones de contactos, uno de los cuatro pilares fundamentales para el control de la tuberculosis.

Otro factor que cada vez amenaza más el control de la tuberculosis es el fenómeno de

multirresistencia a los medicamentos antituberculosos, habitualmente consecuencia de tratamientos interrumpidos. Entre otras causas de este fenómeno están el deterioro de los programas de control de la tuberculosis y la transmisión inicial de cepas resistentes⁸⁵. Se ha encontrado diseminación de patrones de multirresistencia en Argentina⁷¹, Brasil^{44,74}, Honduras⁷⁷, México³⁴, Perú⁷² y Venezuela⁵⁹.

En Colombia, Miranda y colaboradores, encontraron cepas multirresistentes (6,7%) aisladas de pacientes con tratamiento previo⁶³. Por otra parte, Laserson y colaboradores, con el uso del RFLP del IS6110, evidenciaron que en Buenaventura se están transmitiendo cepas multirresistentes, particularmente cepas pertenecientes al genotipo Beijing, que está relacionado con la cepa resistente W⁵⁴ y se reconoce como uno de los genotipos más virulentos descritos⁸⁶.

En conjunto, estos estudios demuestran la gran utilidad que puede tener la información generada con las huellas RFLP para establecer si se están transmitiendo cepas multirresistentes, o por el contrario, si la presencia de este fenómeno puede atribuirse a fallas en el tratamiento⁷³ o a coinfecciones con VIH, como ocurrió en el estudio realizado por de Moura y colaboradores⁴⁴.

En países en desarrollo se ha sugerido la realización de estudios para caracterizar cepas multirresistentes⁸⁷, lo cual es de gran importancia para el control de la tuberculosis, debido a que los casos con tuberculosis multirresistente no responden a los esquemas de medicamentos convencionales y la transmisión de una cepa de este tipo comúnmente lleva a aumentar, no sólo las cifras de morbilidad sino también de mortalidad por tuberculosis. En Colombia, sería de mucha utilidad evaluar aislamientos con diversos patrones de susceptibilidad a medicamentos antitubercu-

losos para determinar el problema de tuberculosis multirresistente mediante una estrategia de vigilancia detallada que permita conocer si existe diseminación de cepas resistentes a uno o varios medicamentos.

Otra área en la que se realizaron investigaciones con el uso del RFLP del IS6110 fue la de detección de contaminación cruzada en los laboratorios^{76,88,89}. Situación que, como en Cuba⁸⁸ y Uruguay⁸⁹, puede conllevar a la presencia de falsos positivos por la contaminación cruzada de las muestras durante los procedimientos microbiológicos. Varela y colaboradores⁸⁹ encontraron que tres cepas aisladas de pacientes diferentes sin ninguna relación epidemiológica, tuvieron el mismo patrón RFLP y, debido a que fueron procesadas el mismo día, por el mismo profesional y en la misma cabina de bioseguridad, se confirmó la sospecha de contaminación.

Esta situación podría presentarse en Colombia, por lo que sería de gran utilidad realizar este tipo de estudios con el fin de evaluar la calidad de los procedimientos técnicos descritos en el programa de control de la tuberculosis. Sin embargo, en países en desarrollo como Colombia, donde la tuberculosis es una enfermedad de interés en salud pública y los recursos son escasos, la aplicación de esta técnica requiere mayor eficiencia en el estudio requerido para su estandarización.

Este estudio concluye que sí es conveniente seguir utilizando la técnica de RFLP del IS6110 para mejorar y evaluar el control de la tuberculosis en Colombia. No obstante, no se anticipa que el uso de esta técnica produzca avances significativos en el control de la tuberculosis, si antes no se obtiene un buen nivel de interacción entre los investigadores que están en capacidad de realizar la técnica y los funcionarios encargados de los programas de control.

Finalmente, se ha descrito que el costo aproximado de la técnica es de US\$ 1,5⁷⁹ a US\$ 5,0⁹⁰ por muestra y, si se consideran las utilidades de su aplicación, valdría la pena la inversión. Sin embargo, existe la necesidad de realizar estudios de costo-efectividad que permitan determinar si los beneficios potenciales justifican los costos de la realización de investigaciones en las que se aplica esta técnica.

En un ámbito de recursos limitados, este tipo de estudios ofrecen criterios económicos que facilitan la toma de decisiones para la distribución de recursos destinados a las actividades de control de esta patología, entre otras. Además, sería importante realizar estudios de comparación de técnicas moleculares, teniendo en cuenta que, en los países en vías de desarrollo como Colombia, se ha hecho uso de técnicas como spoligotyping^{27,31,51,58,59,62,66,67,69,87}, MIRU-VNTR⁵⁸ y DRE-PCR^{35,49,65,89}, para tipificar los aislamientos que presentan un bajo número de copias del marcador IS6110.

Referencias

1. World Health Organization. Nota descriptiva OMS N°104. Revisada en marzo de 2007. [Internet]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/es/print.html>. Fecha de consulta: [3 de junio de 2008].
2. Bermejo MC, Clavera I, Michel FJ, Marín B. Epidemiología de la tuberculosis. *An Sist Sanit Navar*. 2007;30(Supl.2):7-19.
3. World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2008. WHO/HTM/TB/2008.393.
4. Instituto Nacional de Salud, Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública, Sistema de Vigilancia en Salud Pública - SIVIGILA. Casos totales en la semana epidemiológica 52 y acumulados del año. [Internet]. Disponible en: www.ins.gov.co. Fecha de consulta: [3 de junio de 2008].
5. Instituto Nacional de Salud, Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública, Sistema de Vigilancia en Salud Pública - SIVIGILA. Casos totales en la semana epidemiológica 20 y acumulados del año 2008. [Internet]. Disponible en: www.ins.gov.co. Fecha de consulta: [3 de junio de 2008].
6. Hernández C, Perilla S. Es preocupante y alto el nivel de tuberculosis que se padece en Colombia. Publicado: 4 de mayo de 2008. [Internet]. Disponible en: http://www.eltiempo.com/salud/noticias/ARTICULO-PRINTER_FRIENDLY-PRINTER_FRIENDLY-4139776.html. Fecha de consulta: [3 de junio de 2008].
7. Henao S, Sierra C, Sánchez E, Rodríguez A. Búsqueda de tuberculosis en pacientes sintomáticos respiratorios en cuatro hospitales de Bogotá D.C. *Rev Salud Pública*. 2007;9:408-19.
8. Cáceres F, Orozco L. Demora en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar en una región de Colombia. *Rev Salud Pública*. 2008;10:94-104.
9. Arbeláez M, Beatriz M, Franco A, Restrepo R, Hincapié D, Blas E. Tuberculosis control and manager competition in Colombia. *Int J Health Plann Mgmt*. 2004;19:S25-43.
10. Carvajal R, Cabrera G, Mateus J. Efectos de la reforma en salud en las acciones de control de tuberculosis en el Valle del Cauca, Colombia. *Biomédica*. 2004;24(Supl.):138-48.
11. Carvajal R, Cabrera G, Mosquera J. Percepciones de los efectos de la implementación del Sistema General de Seguridad Social en Salud sobre las acciones de control de tuberculosis en el Valle del Cauca, Colombia. *Colomb Med*. 2004;35:179-84.
12. Robledo J, Tabón A. Fundamentos básicos de medicina. Microbiología de las infecciones humanas. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2007. p. 179-188.
13. Galvis V, Bustamante M, Sarmiento C. Guía de atención de la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. Ministerio de Salud. Dirección General de Promoción y Prevención, 2000.
14. Garzón M, Naranjo N, Sierra C, Llerena C, Orjuela D. Bacteriología del *Mycobacterium tuberculosis* y de micobacterias no tuberculosas. Manual de Procedimientos. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2001.
15. Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero I, et al. Exogenous reinfection with tuberculosis on a european island with a moderate incidence of disease. *Am J Resp Crit Care Med*. 2001;163:717-20.
16. Nguyen LN, Gilbert GL, Marks GB. Molecular epidemiology of tuberculosis and recent developments in understanding the epidemiology of tuberculosis. *Respirology*. 2004;9:313-9.
17. Van Embden J, Cave M, Crawford J, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*. 1993;31:406-9.
18. Cohn L. The use of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis for epidemiological studies of tuberculosis in developing countries. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1998;2:16-26.
19. López A, Lezcano M, Vitoria M, et al. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* over two periods: a changing scenario for tuberculosis transmission. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007;11:1080-6.
20. Small PM, Hopewell PC, Singh SP, et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco a population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med*. 1994;330:1703-9.
21. Drobniewski F, Gibson A, Ruddy M. Evaluation and utilization as a public health tool of a national molecular epidemiological tuberculosis outbreak Database within the United Kingdom from 1997 to 2001. *J Clin Microbiol*. 2003;41:1861-8.
22. Glynn JR, Yates MD, Crampin AC, et al. DNA fingerprint changes in tuberculosis: reinfection, evolution, or laboratory error? *J Infect Dis*. 2004;190:1158-66.
23. Alland D, Kalkut GE, Moss AR, et al. Transmission of tuberculosis in New York City. An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N Engl J Med*. 1994;330:1710-16.
24. Van Soolingen D, Hermans P. Epidemiology of tuberculosis by DNA fingerprinting. *Eur Respir J*. 1995;8(Suppl.20):649s-56s.
25. Van Soolingen D, Hermans P, de Hass P, Soll D, van Embden J. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 1991;29:2578-86.
26. Glynn J, Bauer J, de Boer A, et al. Interpreting DNA fingerprint clusters of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1999;3:1055-60.

27. Morcillo N, Zumarraga M, Imperiale B, et al. Tuberculosis transmission of predominant genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* in Northern suburbs of Buenos Aires city region. *Rev Argent Microbiol*. 2007;39:145-50.
28. Richardson M, van Lill S W, van der Spuy GD, et al. Historic and recent events contribute to the disease dynamics of Beijinglike *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a high incidence region. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2002;6:1001-11.
29. Niemann S, Gerdes S, Ritcher E, Thielen H, Uden H, Diel R. Stability of IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns of *Mycobacterium tuberculosis* strains in actual chains of transmission. *J Clin Microbiol*. 2000;38:2563-7.
30. Yeh R, Ponce A, Agasino C, et al. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA genotypes. *J Infect Dis*. 1998;177:1107-11.
31. Alito A, Morcillo N, Scipioni S, et al. The IS6110 restriction fragment length polymorphism in particular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains may evolve too fast for reliable use in outbreak investigation. *J Clin Microbiol*. 1999;37:788-91.
32. Cave M, Eisenach K, Templeton G, Salfinger M, Mazurek G, Bates J. Stability of DNA fingerprint pattern produced with IS6110 in strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 1994;32:262-6.
33. Soini H, Pan X, Teeter L, Musser JM, Graviss EA. Transmission dynamics and molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110. *J Clin Microbiol*. 2001;39:217-21.
34. Yang Z, Rendon A, Flores A, et al. A clinic-based molecular epidemiologic study of tuberculosis in Monterrey, Mexico. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2001;5:313-20.
35. Montoro E, Valdivia J, Cardoso S. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Havana, Cuba, by IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and by the double-repetitive-element PCR method. *J Clin Microbiol*. 1998;36:3099-102.
36. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol*. 1999;37:2607-18.
37. Burgos M, Méndez J, Ribon W. Molecular epidemiology of tuberculosis: methodology and applications. *Biomédica*. 2004;24:188-201.
38. Barnes P, Cave M. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med*. 2003;349:1149-56.
39. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*. 1997;35:907-14.
40. Frothingham R, Meeker W. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable number tandem repeats. *Microbiol*. 1998;144:1189-96.
41. Manterola C, Pineda V, Vial M, Losada H. Revisión crítica de la literatura para artículos de terapia. *Rev Chilena de Cirugía*. 2004;56:604-9.
42. Gómez M, Danglot C, Velásquez L. Bases para la revisión crítica de artículos médicos. *Rev Mexicana de Padiatría*. 2001;68:152-9.
43. Iñigo J, Arce A, Chávez F, Palenque E, Burgoa M. Patrones de transmisión de la tuberculosis en un área sanitaria de Madrid. *Rev Esp Salud Pública*. 2003;77:541-51.
44. de Moura A, Gonçalves L, Izquierdo P, et al. Evaluation and genotyping of multidrug-resistant cases of tuberculosis in southern Brazil. *Microbial Drug Resistance*. 2006;12:186-91.
45. Palmero D, Ritacco V, Ambroggi M, et al. Tuberculosis multirresistente en pacientes con SIDA a comienzos del milenio. *Med (Buenos Aires)*. 2006;66:399-404.
46. Capcha L, Urbina M, Vásquez L, et al. Perfiles genéticos (IS6110) y patrones de resistencia en aislamientos de *M. tuberculosis* de pacientes con tuberculosis pulmonar. Lima Sur, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2005;22:4-11.
47. Borges M, Izquierdo P, Gonçalves L, et al. Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from an outpatient clinic in Porto Alegre, (RS). *J Bras Pneumol*. 2004;30:448-54.
48. Roscani A, Nogueira G, Barrison M, et al. IS6110 restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients with pulmonary tuberculosis in Campinas, Brazil. Evidence of intercontinental distribution of strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98:655-8.
49. Dias I, Cardoso M, Araújo D, Suffys PN. Drug Resistance and genotypes of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from human immunodeficiency virusinfected and non-infected tuberculosis patients in Bauru, São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97:1147-52.
50. Díaz R, Gómez RI, García N, Valdivia JA and van Soolingen D. Molecular epidemiological study on transmission of tuberculosis in a hospital for mentally handicapped patients in Havana, Cuba. *J Hosp Infect*. 2001;49:30-6.
51. Godfrey P, Sonnenberg P, Shearer S, et al. Tuberculosis control and molecular epidemiology in a South African gold-mining community. *Lancet*. 2000;356:1066-71.
52. Gómez R, Díaz R, García N y Valdivia J. Estudio epidemiológico-molecular de un brote de tuberculosis en el hospital psiquiátrico de la Habana. *Rev Cubana Hig Epidemiol*. 2000;38:201-9.
53. García M, Palacios M, Ponce A, et al. The role of core groups in transmitting *Mycobacterium tuberculosis* in a high

prevalence community in Southern Mexico. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000;4:12-17.

54. Laserson K, Osorio L, Sheppard J, et al. Clinical and programmatic mismanagement rather than community outbreak as the cause of chronic, drug-resistant tuberculosis in Buenaventura, Colombia, 1998. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000;4:673-83.

55. Burger M, Raskin S, Brockelt S, Amthor B, Geiss H, Haas W. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* complex culture isolates collected in Brazil and spotted onto filter paper. *J Clin Microbiol.* 1998;36:573-76.

56. Escalante P, Ramaswamy S, Sanabria H, et al. Genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Peru. *Tuberc Lung Dis.* 1998;79:111-18.

57. Wilkinson D, Pillay M, Lumbard C, et al. Molecular epidemiology and transmission dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in rural Africa. *Trop Med Int Health.* 1997;2:747-53.

58. Oliveira L, Huard R, Boechat N, et al. Discovery of a novel *Mycobacterium tuberculosis* lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol.* 2007;45:3891-902.

59. Aristimuño L, Armengol R, Cebollada A, et al. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the First National Survey of Anti-tuberculosis Drug Resistance from Venezuela. *BMC Microbiology.* 2006;6:90-102.

60. Díaz R, Gómez R, Restrepo E, et al. Transmission of tuberculosis in Havana, Cuba: a molecular epidemiological study by IS6110 restriction fragment length polymorphism typing. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96:437-43.

61. Hernández J, Murcia M, de la Hoz F. Epidemiología molecular de la tuberculosis en Bogotá en aislados clínicos obtenidos durante 11 Años. *Rev Salud Pública.* 2008;10:126-36.

62. Chihota V, Apers L, Mungofa S, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in regions of Southern Africa. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007;11:311-8.

63. Miranda J, Ríos R, Clavijo A, Cachón C, Mattar S. Estudio preliminar de la susceptibilidad antimicrobiana y variabilidad genética de *Mycobacterium tuberculosis* en un área del Caribe colombiano. *Colomb Med.* 2006;37:275-86.

64. Gomez J, Leon C, Guerrero M, Rigouts L, Portaels F. IS6110 fingerprinting of sensitive and resistant strains (1991-1992) of *Mycobacterium Tuberculosis* in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97:1005-8.

65. Suffys PN, Ivens ME, Rossetti ML. Usefulness of IS6110-restriction fragment length polymorphism typing of Brazilian strains of *Mycobacterium tuberculosis* and comparison with an international fingerprint database. *Res Microbiol.* 2000;151:343-51.

66. Malaspina A, Cavalcanti H, Clarice L, et al. Usefulness of

Mycobacterium tuberculosis molecular typing in a tuberculosis low-endemic agro-industrial setting of Brazil. *Jpn J Infect Dis.* 2008;61:231-3.

67. Candia N, Lopez B, Zozio T, et al. First insight into *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity in Paraguay. *BMC Microbiology.* 2007;7:75-85.

68. Guimarães H, Malaspina A, Fiúza F, Fujimura C. Tuberculosis in a Psychiatric Hospital in the state of Goiás, Brazil. *J Bras Pneumol.* 2006;32:566-72.

69. Borsuk S, Dellagostin M, de Góes S, et al. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a region of Brazil with a high incidence of tuberculosis. *Microbes and Infection.* 2005;7:1338-44.

70. Ramaswamy S, Dou S, Rendon A, Yang Z, Cave MD, Graviss E. Genotypic analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey, Mexico. *J Med Microbiol.* 2004;53:107-13.

71. Palmero D, Ritacco V, Ambroggi M, et al. Multidrug-resistant tuberculosis in HIV-negative patients, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:965-9.

72. Baldeviano C, Quispe N, Bonilla C, et al. Perfiles genéticos (RFLP-IS6110) y resistencia a drogas en aislamientos de *M. tuberculosis* de pacientes internados en un hospital referencial del Callao, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública,* 2003;20:72-7.

73. Agapito J, Baldeviano C, Espinoza J, Accinelli R. Caracterización de las mutaciones en el Gen *rpoB* asociadas a la resistencia a rifampicina y tipificación molecular mediante RFLP (IS6110) en cepas de *M. tuberculosis* de pacientes con tuberculosis pulmonar. *Enferm Tórax.* 2003;46:9-24.

74. Ferrazoli L, Palaci M, Marques L, et al. Transmission of tuberculosis in an endemic urban setting in Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000;4:18-25.

75. Henao G, de la Hoz F, León CI, Ribón W, Guerrero MI. Epidemiología clásica y molecular de la tuberculosis en Guaviare 1997-1998. *Inf Quinc Epidem Nac.* 1999;4:85-91

76. Ritacco V, Di Lonardo M, Reniero A, et al. Nosocomial spread of human immunodeficiency virus-related multidrug-resistant tuberculosis in Buenos Aires. *J Infect Dis.* 1997;176:637-42.

77. Pineda L, Ferrera A, Alvarado C, Hoffner S. Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and atypical mycobacteria isolated from patients with suspected pulmonary tuberculosis in Honduras. *Chest.* 1997;111:148-53.

78. Morcillo N, Alito A, Romano M, et al. Multidrug resistant tuberculosis outbreak in Buenos Aires. DNA fingerprinting analysis of isolates. *Med (B Aires).* 1996;56:45-7.

79. Gómez J, Rigouts L, Villegas L, Portaels F. Análisis de polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP) y epidemiología de la tuberculosis. *Bol Ofic San Panam.* 1995;119:1-10.

- 80.** Ruano S, Palmero D, Ritacco V, Ambroggi M, Cusmano L. Brote de tuberculosis multirresistente en trabajadores sexuales travestis. *Rev Arg Med Res.* 2005;1:27-33.
- 81.** Palmero D, Ritacco V, Ruano S, et al. Multidrug-resistant tuberculosis outbreak among transvestite sex workers, Buenos Aires, Argentina. *Int J Tuber Lung Dis.* 2005;9:1168-70.
- 82.** Van Rie A, Warren R, Richardson M, et al. Exogenous re-infection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Med.* 1999;341:1174-9.
- 83.** Ivens M, Fandinho F, Werneck A, et al. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with and without AIDS in Rio de Janeiro. *Braz J Med Biol Res.* 1998;31:369-72.
- 84.** Castiblanco C, Ribón W. Coinfección de tuberculosis en pacientes con VIH/SIDA: un análisis según las fuentes de información en Colombia. *Infectio.* 2006;10:232-42.
- 85.** Martín F. El problema actual de la tuberculosis. *Gac Méd Caracas.* 2005;113:316-22.
- 86.** European concerted action on new generation genetic markers and techniques for the epidemiology and control of tuberculosis. Beijing/W genotype *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance. *Emerg Infect Dis.* 2006;2:736-43
- 87.** Escalante P, Ramaswamy S, Sanabria H, et al. Genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Peru. *Tuberc Lung Dis.* 1998;79:111-8.
- 88.** Díaz R, Crespo F, Herrera S, Sevy-Court J, Marrero A, van Soolingen D. Laboratory cross-contamination of *Mycobacterium Tuberculosis* during preparation of smears. *The Internet Journal of Third World Medicine.* 2005;2(2).
- 89.** Varela G, Carvajales S, Gadea P, et al. Comparative molecular study of *Mycobacterium tuberculosis* strains, in times of antimicrobial drug resistance. *Rev Argent Microbiol.* 2005;37:11-5.
- 90.** Martín T, Azócar L. Genotipificación de *Mycobacterium tuberculosis* y susceptibilidad a drogas. *Gac Méd Caracas.* 1998;106:515-22.