

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"
SUBDIRECCIÓN DE MICROBIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA-MICOLOGÍA**

**Caracterización molecular de cepas de
Mycobacterium tuberculosis y su implicación en el
control de la tuberculosis en Cuba.**

**Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias de la Salud**

Autor: Lic. Raúl Díaz Rodríguez.

Asesores: Dr. José A. Valdivia Alvarez, Dr Cs

Dr. Edilberto González Ochoa, Dr C Médicas.

Dr. Anselmo Otero, Dr C Biológicas.

La Habana

2003

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar, a mis asesores José A. Valdivia, Edilberto González Ochoa y Anselmo Otero. El Profesor Valdivia me adentró en el campo de las micobacterias e incidió favorablemente en mi carrera de investigador, desde las etapas más tempranas de recién graduado universitario. El Profesor Edilberto ha influido mucho en mi formación como un investigador más maduro y por supuesto, en la culminación exitosa de este documento que hoy puedo mostrar. Para el Profesor Anselmo van mis más profundos y sinceros agradecimientos por ser la persona que más tiempo ha dedicado a esta tesis desde su conformación del esqueleto inicial hasta su concepción final, todo esto a pesar de estar bastante alejado del tema específico.

No puedo dejar de mencionar a mi guía científico, profesor y amigo, Dick van Soolingen -y a todo su equipo de trabajo- del Instituto Nacional de Salud Pública de Holanda. El se encargó de introducirme en el tema de la epidemiología molecular de la tuberculosis en el año 1996 y ha tenido una gran repercusión en mi trabajo investigativo desde entonces. Gracias a él y sus cualidades como excelente científico he podido organizar mejor mi trabajo y culminar este con la publicación de varios estudios en revistas de amplia difusión, y que son el núcleo central de mi tesis.

Me siento en deuda con varios colegas que han revisado este material, por una causa o por otra, y me han hecho oportunas sugerencias para mejorar el documento anterior. Son estos los casos de: Antonio Pérez, Marta Dueñas, Carlos Fernández, Alina Llop, Jorge Sarracent, Clara Savón, Nereida Cantelar, Pedro Más Lago, Angel Goyenechea, Gerardo Martínez, Roberto Fernández, Delfina Rosario, Gustavo Kourí, Virginia Capó, y quizás algunos más que no mencioné por un error involuntario.

Debo demostrar mi gratitud hacia los colegas cubanos y extranjeros que se leyeron el documento final y me dieron su valiosa opinión en cartas de aval que sirvieron para apoyar mi trabajo en la defensa de la tesis. Entre estos podemos mencionar a: Clara Savón, Antonio Pérez, Gustavo Sierra, Herio Toledo, Juan Morales Grillo y María E. Sarmiento. Entre los

colegas foráneos están: Viviana Ritacco (Argentina), Sofia Samper (España), María Cristina Gutiérrez (Francia), Marcos Burgos (EE.UU.) y José Caminero (IUCTER-América Latina).

También quisiera agradecer a los compañeros del Laboratorio de Tuberculosis, del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK), incluido a algunos que ya no están con nosotros; pero que cada cual puso un granito de arena (o una tonelada) en la construcción de los cimientos de este edificio que demoró un poco en inaugurarse.

Además debo mencionar a los colegas del Departamento de Bacteriología-Micología, con los cuales he podido contar en cada momento para la terminación victoriosa de este trabajo.

No se me puede olvidar la ayuda recibida por otros compañeros de otras áreas del IPK que, aunque no mencione nombres, ellos saben muy bien quienes son.

Por último pero no menos importante, quisiera destacar el apoyo incondicional que he recibido de mi familia, que sacrificó muchas horas necesarias en el hogar, para que se pudiera cumplir este objetivo.

En fin, para todos los que de una forma u otra han aportado algo en este trabajo, mi más sincero agradecimiento.

Muchas gracias.

DEDICATORIA

A MI FAMILIA Y EN ESPECIAL **A MI PADRE**

SINTESIS

En este trabajo nos propusimos caracterizar molecularmente cepas de *Mycobacterium tuberculosis* y determinar los agrupamientos basándonos en sus patrones genéticos, en relación con las características epidemiológicas de los pacientes y evaluar una nueva técnica de caracterización (Spoligotyping). Se estudiaron 251 cepas de *M. tuberculosis* aisladas en Cuba entre 1993-1998 por análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP, siglas en inglés) con el elemento de inserción IS6110 y se analizaron los datos clínico-epidemiológicos de los pacientes. Adicionalmente se ensayaron por RFLP-IS6110 y Spoligotyping 157 de las 251 cepas de *M. tuberculosis*. Se encontró que las cepas aisladas en Cuba tenían un elevado número de copias de IS6110 indicando que el RFLP-IS6110 es altamente discriminatorio y aplicable en estudios filogenéticos y epidemiológico-moleculares de tuberculosis en Cuba. El elevado porcentaje de agrupamiento encontrado sugirió que la transmisión reciente pudo haber influido en la reemergencia de la tuberculosis en Cuba en el período 1992-1994. El empleo del RFLP-IS6110 en el estudio de brotes en instituciones cerradas auxilió a las técnicas convencionales de epidemiología en la propuesta de una cadena de transmisión. La técnica de Spoligotyping posee un menor poder de discriminación que el RFLP-IS6110.

CONTROL SEMANTICO

Cluster (agrupamiento o conglomerado): dos o más cepas con idéntico patrón genético-molecular (Burgos y Pym, 2002; Small y van Embden, 1994).

Infección reciente: infección con una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* ocurrida en un periodo de 0-5 años (Rieder, 1999).

Infección remota: infección con una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* ocurrida hace más de 5 años (Rieder, 1999).

Reactivación endógena: tuberculosis que ocurre como resultado de la primera infección en un periodo mayor (generalmente) de 5 años (Rieder, 1999).

Reinfección exógena: tuberculosis que ocurre como resultado de una segunda infección superpuesta a la primera (Rieder, 1999).

Transmisión reciente: transmisión de una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* entre caso-contacto y ocurrida en un tiempo menor de 5 años (Burgos y Pym, 2002; Small y van Embden, 1994).

Transmisión remota: transmisión de una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* entre caso-contacto y ocurrida en un tiempo mayor de 5 años (Burgos y Pym, 2002; Small y van Embden, 1994).

Resistencia primaria: cepas resistentes a drogas antibacilares aisladas de casos de tuberculosis no tratados anteriormente o tratados por menos de un mes (Pablos-Méndez et al., 1998).

Resistencia adquirida: cepas resistentes aisladas de casos de tuberculosis tratados anteriormente con drogas antibacilares (más de un mes) (Pablos-Méndez et al., 1998).

TABLA DE CONTENIDO	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. Hipótesis.	5
1.2. Objetivos.	5
1.3. Novedad Científica.	6
1.4. Valor Práctico.	7
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
2.1. Situación mundial de la tuberculosis.	9
2.2. Historia de la tuberculosis.	14
2.3. Historia de la tuberculosis en Cuba.	15
2.4. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Ubicación taxonómica y características generales.	18
2.5. Diagnóstico de la tuberculosis.	20
2.5.1. Métodos alternativos.	21
2.6. Caracterización de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	24
2.7. Análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	25
2.7.1. Elemento repetitivo IS6110 y su aplicación.	26
2.7.2. Otros marcadores genéticos utilizados	27
2.7.3. Aplicaciones de la técnica de RFLP-IS6110.	28
2.7.4. Empleo de la técnica de RFLP-IS6110 al estudio de la tuberculosis en poblaciones.	31
2.7.5. Empleo del RFLP-IS6110 en el estudio de la transmisión de la tuberculosis en brotes institucionales.	33
2.7.6. Limitaciones del RFLP-IS6110.	37
2.8. Técnicas moleculares alternativas al RFLP-IS6110.	38

TABLA DE CONTENIDO	Pág.
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	42
3.1. Cepas estudiadas.	43
3.1.1. Cepas de referencia.	43
3.1.2. Cepas estudiadas.	43
3.1.2.1. Estudio molecular de transmisión de la tuberculosis en Cuba.	44
3.1.2.2. Estudio molecular de transmisión de la tuberculosis en Ciudad de La Habana.	44
3.1.2.3. Estudio molecular de transmisión de tuberculosis entre personas seronegativas y seropositivas al VIH.	44
3.1.2.4. Estudio molecular de transmisión de tuberculosis en el Hospital Psiquiátrico de La Habana (HPH).	44
3.1.2.5. Caracterización molecular de cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> por RFLP-IS6110 y <u>Spoligotyping</u>.	45
3.2. Datos clínico-epidemiológicos.	45
3.3. Análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción -IS6110.	45
3.4. <u>Spoligotyping</u>.	46
3.5. Visualización y análisis de los patrones genéticos.	47
3.5.1. Análisis visual.	47
3.5.2. Análisis computarizado.	47
3.5.3. Comparación con base de datos de patrones de RFLP-IS6110.	48
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	49
4.1. Estudio molecular de transmisión de la tuberculosis en Cuba.	50
4.1.1. Número de copias del elemento de inserción IS6110.	50
4.1.2. Agrupamientos sobre la base los patrones de RFLP-IS6110.	52
4.1.3. Distribución geográfica de las cepas agrupadas.	55
4.1.4. Agrupamientos entre las cepas resistentes a drogas.	55
4.1.5. Investigación de los tres agrupamientos más grandes.	56
4.1.6. Ocurrencia de cepas con el “genotipo Beijing” en Cuba.	57
4.2. Estudio molecular de transmisión de la tuberculosis en Ciudad de La Habana.	58

TABLA DE CONTENIDO	Pág.
4.2.1. Número de copias del elemento de inserción <i>IS6110</i> .	58
4.2.2. Agrupamientos sobre la base del RFLP- <i>IS6110</i> .	60
4.2.3. Investigación de los agrupamientos.	63
4.2.4. Comparación de los patrones de las cepas de Ciudad de La Habana con la colección de patrones de restricción de Cuba.	66
4.3. Estudio molecular de transmisión de la tuberculosis entre personas seronegativas y seropositivas al VIH.	67
4.3.1. Procedencia de los casos estudiados y resultados bacteriológicos.	67
4.3.2. Análisis por RFLP- <i>IS6110</i> .	69
4.4. Estudio molecular de transmisión de la tuberculosis en el Hospital Psiquiátrico de La Habana.	71
4.4.1. Datos clínico-epidemiológicos y resultados bacteriológicos.	72
4.4.2. Análisis por RFLP- <i>IS6110</i> .	73
4.5. Caracterización molecular de cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> por RFLP- <i>IS6110</i> y <u>Spoligotyping</u> .	75
4.5.1. Resultados del RFLP- <i>IS6110</i> .	76
4.5.2. Resultados del <u>Spoligotyping</u> .	78
4.5.3. Comparación de los resultados entre el RFLP- <i>IS6110</i> y el <u>Spoligotyping</u> .	78
5. CONCLUSIONES.	80
6. RECOMENDACIONES.	82
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	84
ANEXOS.	112
Anexo 1- Protocolos de trabajo.	
Anexo 2- Datos complementarios.	
Anexo 3- Autobiografía.	
Anexo 4- Otras publicaciones del autor relacionadas con el tema de tesis.	
Anexo 5- Eventos científicos.	
Anexo 6- Trabajos de tesis.	
Anexo 7- Distinciones científico-técnicas.	

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCION

Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) estiman que alrededor de un tercio de la población mundial (1700 millones) está infectada con *Mycobacterium tuberculosis* y que 9 millones desarrollan tuberculosis cada año con una mortalidad de 3 millones (OMS, 1996; Raviglione, 2001).

Mycobacterium tuberculosis causa la muerte de más personas que cualquier otro agente infeccioso. Las defunciones por tuberculosis representan el 25% de toda la mortalidad evitable en los países en vías de desarrollo, donde se registra el 95% de los casos y el 98% de los fallecimientos causados por esta enfermedad; el 75% de estos casos se sitúa en el grupo de edad económicamente productivo (15-50 años) (OMS, 1996).

A partir de la década de los 80 se observó un notable incremento en las tasas de incidencia de tuberculosis; tanto en países en desarrollo como en los países más industrializados. El resurgimiento de la tuberculosis motivó que en marzo de 1993, la OMS declarara por primera vez a una enfermedad como “emergencia global de salud” (Suffys et al., 1997).

En Cuba, luego de la implantación en 1970 de una nueva estrategia en el Programa de Control de la Tuberculosis los valores de incidencia de la enfermedad disminuyeron de 31.2 por 100 000 habitantes en 1970 a 4.8 en 1991. Sin embargo, a partir de 1992 se revertió esta tendencia llegándose a triplicar las cifras en 1994 (14.7/100 000) (Marrero et al., 2000).

Entre los principales factores que parecen haber influido en este incremento en el número de casos en este periodo se deben señalar: la crisis económica ocasionada por la desaparición del campo socialista, la disminución relativa de la prioridad de la tuberculosis en el conjunto de los problemas de salud del país, cambios en la organización de las medidas de control, la

disminución del estado de alerta y de la conciencia sobre el riesgo de infección, y el debilitamiento general de la cantidad y la calidad de las acciones de localización de casos, entre otras causas (González et al., 1995).

La reemergencia de la tuberculosis en Cuba motivó algunos cambios en la estrategia a seguir por parte de las autoridades nacionales de salud como fueron: se amplió la definición de “caso nuevo” incluyéndose aquellos pacientes con evidencias clínico-radiológicas pero sin confirmación bacteriológica, se comenzó la búsqueda activa en grupos de alto riesgo y se eliminó la revacunación con BCG a los niños de 10 años de edad. También provocó que desde 1994 la lucha contra la tuberculosis en nuestro país se considerara de alta prioridad por parte del Ministerio de Salud Pública.

El aumento de la tuberculosis en Cuba en los años 90 fue asociado inicialmente a reactivaciones endógenas motivado porque el 60% de los casos eran adultos mayores de 45 años (Marrero y Carrera, 1996); sin embargo, no se conocía la magnitud de la transmisión reciente (en menos de 5 años) de esta enfermedad.

Por otra parte, el descubrimiento de secuencias de ADN repetitivas en el cromosoma de *M. tuberculosis*, como el IS6110, han permitido desarrollar técnicas moleculares confiables en la diferenciación de cepas de esta especie. Un ejemplo de estas es el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, siglas en inglés) la cual ha sido empleada en numerosos estudios de infecciones nosocomiales (CDC, 1993^a; Dooley et al., 1992; Nivin et al., 1998; Waecker et al., 2000), brotes institucionales (CDC, 1993^b; Curtis et al., 2000; Greifinger et al., 1992; Kearns et al., 2000; Valway et al., 1994^a) y transmisión de tuberculosis multirresistente a drogas (Beck-Sagué et al., 1992; Brian et al., 1992; Coronado et al., 1993; Portugal et al., 1999). También se han realizado varios estudios genético-poblacionales en áreas geográficas con baja y media incidencia de tuberculosis, empleando técnicas convencionales de epidemiología unidas al análisis por RFLP-IS6110, en donde se han encontrado una elevada proporción de tuberculosis transmitida recientemente y no sospechada previamente por los métodos epidemiológicos

convencionales (Alland et al., 1994; Borgdorff et al., 2000; van Deutekom et al., 1997; Gutiérrez et al., 1998; Samper et al., 1998; Small et al., 1994; Yang et al., 1995).

Desde a mediados de la década pasada se han desarrollado más de una docena de otras técnicas moleculares de nueva generación, basadas en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (siglas en inglés), tratando de suplir las dificultades fundamentales del RFLP-IS6110 como son: la demora en dar un resultado y la elevada cantidad de ADN genómico necesaria para realizar la técnica (Suffys et al., 1997; Kamerbeek et al., 1997).

En estudios recientes realizados por Kremer et al. (1999) y Supply et al. (2001), se compararon cinco métodos de RFLP y ocho metodologías basadas en PCR. Se observó que a pesar del potencial de las técnicas rápidas de amplificación para la caracterización de cepas de *M. tuberculosis*, más de la mitad de los métodos utilizados tenían como limitación fundamental su reproducibilidad y/o poder de discriminación. De estos, los mejores fueron: el PCR con Ligador Mezclado (Mixed-Linker PCR, en inglés), la tipificación con unidades repetitivas interespaciadas de micobacterias (MIRU, siglas en inglés) y elementos repetitivos en tandem de número variable (VNTR, siglas en inglés) llamada en inglés MIRU/VNTR typing y la tipificación con oligonucleótidos espaciadores del elemento de inserción DR (Spoligotyping en inglés).

Por tanto, estos tres métodos son los únicos recomendados para lograr una tipificación molecular de *M. tuberculosis* altamente reproducible y con un aceptable poder de discriminación. Adicionalmente, el Spoligotyping y el MIRU/VNTR typing tienen la ventaja de que sus resultados pueden ser completamente expresados en un formato simple, digital (Kremer et al., 1999).

En el presente trabajo se discute la caracterización molecular de cepas de *M. tuberculosis* aisladas en Cuba por las técnicas de RFLP-IS6110 y de Spoligotyping, su ayuda como herramienta auxiliar de la epidemiología y su implicación en el control de la tuberculosis en Cuba. También, se examinan las potencialidades del nuevo método de caracterización molecular, Spoligotyping, en estudios poblacionales.

1.1. Hipótesis

La caracterización de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* procedentes de instituciones cerradas y población en general en Cuba permite identificar la existencia de patrones genéticos endémicos y agrupamientos en forma efectiva, empleando las técnicas del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) con la sonda IS6110 y la tipificación con oligonucleótidos espaciadores (Spoligotyping), lo que hace posible determinar mejor la ocurrencia de la transmisión reciente a partir de otros datos clínico-epidemiológicos.

1.2. Objetivos

General

Caracterizar por técnicas moleculares cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en Cuba.

Específicos

1. Introducir y caracterizar por las técnicas de RFLP- IS6110 y Spoligotyping cepas de *M. tuberculosis* aisladas en Cuba.
2. Determinar los patrones genéticos que circulan en Cuba en contraste con los patrones de otras regiones del mundo.
3. Definir los patrones de RFLP-IS6110 de las cepas de *M. tuberculosis* aisladas en instituciones cerradas y contribuir al estudio de las probables vías de transmisión entre las poblaciones de estas instalaciones.
4. Describir diferencias entre el Spoligotyping y el RFLP-IS6110 en estudios genético-poblacionales de transmisión de la tuberculosis.

1.3. Novedad Científica

Se realizó por primera vez en Cuba la caracterización molecular, basada en RFLP-IS6110 y Spoligotyping, de cepas de *M. tuberculosis* permitiendo conocer los tipos más frecuentes que circulan en nuestro medio y compararlos con los patrones genéticos de las cepas que ocasionan la enfermedad en otras regiones del mundo.

Se reforzó la hipótesis planteada por otros investigadores acerca de la existencia de genotipos específicos de *M. tuberculosis* en determinadas áreas geográficas.

Se encontró evidencia molecular, por primera vez en Cuba, de transmisión de resistencia primaria a drogas antituberculosas.

También se reporta por primera vez en nuestro país la aplicación de técnicas moleculares al estudio de brotes de tuberculosis ocurridos en instituciones cerradas.

Además se evaluó por primera vez el poder de discriminación de la técnica de Spoligotyping, frente al RFLP-IS6110, en estudios poblacionales encontrándose una menor resolución que la técnica de referencia.

1.4. Valor Práctico

Se introdujo y se dispone en Cuba de la técnica de referencia internacional, el RFLP-IS6110, para realizar estudios epidemiológicos y genético-moleculares de tuberculosis.

Este trabajo ha permitido la creación de una base de datos de patrones genéticos, por RFLP-IS6110, de las cepas de *M. tuberculosis* aisladas en Cuba. Esta base de datos facilitará en el futuro detectar rápidamente cepas de *M. tuberculosis* “importadas”, sobre todo cepas multirresistentes o supervirulentas, y ayudar a evitar la diseminación de las mismas.

También ha contribuido al conocimiento de la dinámica de transmisión reciente de la tuberculosis en Cuba; sugiriendo así que este fenómeno debe haber influido en el incremento de la enfermedad en años precedentes.

El empleo del RFLP-IS6110 en el estudio de varias microepidemias ocurridas en instituciones cerradas ha complementado las investigaciones realizadas por métodos convencionales de epidemiología y ha ayudado a conformar las probables cadenas de transmisión.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Situación mundial de la tuberculosis.

Aunque la tuberculosis (TB) es un problema de salud de reciente reaparición en los países desarrollados, nunca ha dejado de serlo en los países subdesarrollados donde ocurren el 95% de los casos y el 98% de las defunciones. Se ha reportado además, que un tercio de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis* y que anualmente se presentan ocho millones de casos nuevos de TB activa a pesar de la aparición de fármacos antituberculosos eficaces (OMS, 1996; Raviglione, 2001; WHO, 1992).

En la octava década del siglo pasado se produjo un incremento marcado en el número y gravedad de los casos de TB en todo el mundo (Bates y Stend, 1993). Esto se debió fundamentalmente a los problemas económicos de muchos países y por tanto al deterioro de los programas de control sanitario, a la pandemia del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), así como a los grandes asentamientos poblacionales (Cole y Telenti, 1995).

Una de las consecuencias más alarmantes del aumento de esta enfermedad ha sido el reciente estallido y la continua diseminación de cepas con resistencia múltiple a drogas o MDR (siglas en inglés) de *M. tuberculosis*, lo que ha obstaculizado el tratamiento de muchos pacientes. Entre los factores que han contribuido a esto se encuentran: incremento del número de pacientes coinfectados con *M. tuberculosis* y con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH); ineficientes procedimientos de control de la infección; pruebas de identificación y susceptibilidad que requieren demasiado tiempo

para obtener los resultados; así como, el mal manejo en la administración del tratamiento de los pacientes (Jacobs, 1994).

El primer estudio global sobre resistencia a antimicrobianos, concluido en 1997 bajo el auspicio de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER), mostró que en un tercio de los 35 países estudiados las cepas MDR constituyeron entre el 2 y el 14% de todos los casos de tuberculosis. En este trabajo se identificaron las llamadas “zonas calientes” donde las cepas fueron resistentes tanto a Isoniacida como a Rifampicina, los antimicrobianos más eficaces en el tratamiento de la enfermedad. Es importante mencionar que en los pacientes infectados con cepas MDR, su cura se dificulta extremadamente y el tratamiento suele ser más tóxico y caro (Pablos-Méndez et al., 1997; 1998; WHO, 1997). Para tener una idea de la magnitud del problema, cabe señalar que en los últimos años se han caracterizado por métodos genéticos brotes de TB en los que se han considerado que los rangos de mortalidad en pacientes infectados con cepas MDR son de 50-80%, con un período de cuatro a seis semanas (solamente) entre el diagnóstico y la muerte (Sheldon et al., 1995).

No solo los pacientes con diagnóstico MDR constituyen un peligro para el control de la enfermedad, sino también aquellas personas transplantadas o seropositivas al VIH que están más inmunocomprometidas. En Marzo de 1998 la Organización de Naciones Unidas para el SIDA (ONUSIDA) declaró que de los 31 millones de personas infectadas con el VIH; aproximadamente 4.8 millones estaban coinfectadas con *M. tuberculosis*, constituyendo la principal causa de muerte entre los seropositivos. Otros datos reportaron que alrededor del 15% de todos los casos de TB estaban relacionados con el VIH (Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas, 1998) y que el rango de mortalidad en pacientes coinfectados con cepas MDR y VIH podría ser de un 80-90% (Drobniewski y Wilson, 1998).

La tendencia social de la TB ha sido usualmente desigual (medidas a través del impacto por edad, sexo y raza); sin embargo, su asociación con las regiones y poblaciones de bajo nivel socioeconómico se ha mantenido sin cambio alguno. Así, aunque la enfermedad no puede

presentarse de modo significativo en la población en general, persiste y está incrementada entre muchos grupos socialmente definidos: ancianos viviendo en asilos, personas desamparadas y sin hogar, personas retenidas en instituciones correccionales y aquellos infectados con el VIH (Jereb et al., 1994; Raviglione et al., 1997; WHO, 1994).

En 1990, 1 700 millones de personas contrajeron infección con *M. tuberculosis*. Un lustro después, ya existía un tercio de la población mundial (1 900 millones) infectada, lo cual representó un incremento de al menos 200 millones (un 10%) de casos infectados (OMS, 1996).

También en 1990, 8.0 millones de personas fueron reportadas como casos nuevos de TB. Pasados 5 años, se reportaban 8.9 millones de personas en la misma calidad, significando un incremento en la tasa de incidencia mundial de casi 900 000 casos de TB (alrededor del 10%) (Anexo 2, Tabla I) (OMS, 1996).

Los valores revisados en 1990 proyectados al 2005, revelaron un incremento esperado en la tasa de incidencia global del 58%, interpretándose en alrededor de 11.9 millones de casos de TB para el primer lustro del siglo XXI (Dolin et al., 1994; WHO, 1994).

Los valores de mortalidad fueron los principales datos recolectados sistemáticamente antes del desarrollo de los programas de control de TB; por ende, la información contada en nuestros días acerca de la TB en el siglo XIX y principios del XX se encuentra en estos datos.

En 1992, Sudre et al. estimaron una tasa de mortalidad global fluctuante entre 49 y 55 por 100 000 habitantes. La OMS, al año siguiente, computó un total de 2.5 millones de personas muertas por TB en 1990 (Dolin et al., 1994). Aunque la mayoría (alrededor del 98%) de las muertes a causa de TB pertenecían a países en desarrollo, aquellas que correspondían a países desarrollados fueron también importantes, particularmente las debidas a una coinfección VIH/ *M. tuberculosis*.

En 1996, la OMS estimó que para la última década del siglo XX la mortalidad global anual relacionada con TB se incrementaría a 39% llegando a alcanzar 3.5 millones de muertos (OMS, 1996).

Para enfrentar esta amenaza creciente y su progresiva extensión regional, la OMS en 1993 decretó el estado de emergencia global, exhortando a cada país al cumplimiento de las metas para el año 2000 (MINSAP, 1999):

1. Detectar el 70% de los casos nuevos de TB.
2. Curar el 85% de estos casos, garantizando el tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES).
3. La voluntad política y el compromiso de los gobiernos para organizar y sostener el programa de control.

La epidemia de la infección con VIH ha cambiado radicalmente la epidemiología de la TB. El solapamiento de la infección VIH y *M. tuberculosis*, en países subdesarrollados fundamentalmente, amenaza con producir una rotunda crisis en la salud pública de magnitud jamás registrada (Smith y Moss, 1994). La infección con VIH es, como ha apuntado Styblo y Enarson, el factor de riesgo de TB más fuerte visto en los últimos 100 años en sujetos infectados con el bacilo tuberculoso (Styblo y Enarson, 1991).

Aunque la coinfección VIH/ *M. tuberculosis* es responsable de un pequeño porcentaje de todos los fallecidos a causa de TB, se espera que el impacto de la infección con VIH en la epidemiología de TB, a largo plazo, sea alta (Leowski y Miller, 1992; Selwyn et al., 1989). Diversos estudios realizados apoyan la teoría de que la infección con VIH facilita la transición de la infección tuberculosa a enfermedad tuberculosa como tal, pero ninguno ha concluido que la infección con VIH incremente la susceptibilidad a la infección con *M. tuberculosis* (Jereb et al., 1994).

Visto así, la infección con VIH puede: 1) acelerar el desarrollo de una TB activa, 2) incrementar el riesgo de reacción de una TB latente, y 3) incrementar el riesgo de una persona a contraer una TB primaria (Selwyn et al., 1989; Smith y Moss, 1994).

El riesgo para casos con TB latente, una vez infectados con el VIH, de desarrollar una TB activa es hasta un 10% por año, en contraste con aquellos individuos con un sistema inmune normal que cuentan con un porcentaje de riesgo en tiempo de vida del 5-15%. Por otra parte, *M. tuberculosis* es quizás el más común de los patógenos oportunistas en pacientes de SIDA. Aunque debe apuntarse que también las micobacterias no tuberculosas (MNT), fundamentalmente aquellas integrantes del complejo *M. avium-intracellulare* (MAI), constituyen patógenos oportunistas de alta frecuencia de aparición en dichos pacientes (principalmente en las últimas etapas de la enfermedad). Es generalmente conocido que las formas extrapulmonares de TB ocurren con más alta frecuencia en pacientes VIH+, y que existe una correlación inversa entre la frecuencia de TB extrapulmonar y la inmunocompetencia (Horsburgh y Pozniak, 1993). El reconocimiento del sinergismo entre la TB y el SIDA ha resultado en la inclusión de la TB extrapulmonar y pulmonar en las definiciones para la vigilancia de los casos de SIDA (American Thoracic Society et al., 1992; Buehler et al., 1993).

Los datos ofrecidos por la OMS en 1996, mostraron el comportamiento global de la coinfección VIH/ *M. tuberculosis* pronosticada para la pasada década:

- De 1990 al 2000 el número de casos de TB ascendería hasta un 14%.
- De 1996 al 2000 existiría un estimado mayor de tres millones de casos nuevos de TB.
- De 1990 a 1999, Asia (1 millón; 33%) y África-subsahariana (1.5 millón; 50%) experimentarían las tasas más altas de mortalidad debido a la coinfección con VIH/ *M. tuberculosis*.
- En 1996 se reportó un estimado de 266 000 individuos VIH+ muertos a causa de TB.

Es especialmente en el grupo de VIH+ donde la resistencia a drogas, una vez establecida, puede expandirse rápidamente. Por ejemplo, en algunas ciudades de Estados Unidos de Norteamérica, como Nueva York, han sido descritos brotes de TB multirresistente a drogas (o TB-MDR) en instituciones cerradas (Beck-Sagué et al., 1992; Coronado et al., 1993; Dooley et al., 1992; Edlin et al., 1992). Una de estas cepas TB-MDR, la cepa "W", fue encontrada en cientos de casos en la ciudad de Nueva York y en algunos casos fue resistente hasta 7 agentes antimicobacterianos (Dooley et al., 1992; Frieden et al., 1996).

La mortalidad entre pacientes con TB-MDR es alta. En algunos brotes de TB-MDR en los Estados Unidos de Norteamérica, una gran proporción de infectados VIH+ ha muerto (Horsburg y Pozniak, 1993). El tratamiento de infectados VIH con TB-MDR ha mostrado respuestas mucho mejores (Telzak et al., 1995).

La magnitud del problema mundial de TB-MDR no está claro en el presente, pero estudios en algunos países muestran un porcentaje considerable de cepas *M. tuberculosis* resistentes a una o más drogas (Espinal et al., 2001; Pablos-Méndez et al., 1998; Schaberg et al., 1995). Datos recientes demuestran la gravedad de este hecho en varias ex-repúblicas soviéticas y algunas partes de China (Raviglione, 2001).

2.2. Historia de la tuberculosis.

El conocimiento de la tuberculosis o "peste blanca", como la denominaron los antiguos, data de la más remota antigüedad; prueba de ello es que se ha podido identificar *Mycobacterium tuberculosis* de lesiones óseas en momias egipcias (Wallace, 1994; Wolenisky, 1992). Sus características clínicas se conocieron desde antes del año 1000 a.n.e., siendo llamada por los médicos de aquel entonces con el término "phtisis" para señalar su carácter consuntivo (Roca, 1985).

Se han hallado evidencias de tuberculosis que se remontan al período neolítico pero quizás en esta época la ocurrencia de formas epidémicas fue esporádica, se vivía como nómadas, no se tenía un asentamiento permanente y no había congregaciones en grandes grupos

(Daniel et al., 1994; de Ruiz Holgado, 1996). Alrededor del año 8000 a.n.e, los humanos desarrollaron técnicas de agricultura primitiva que permitieron un asentamiento permanente y también sobrevino la domesticación de animales lo que hace más probable la ocurrencia de la enfermedad en esta etapa. La tuberculosis probablemente ocurrió en sus inicios como una enfermedad epidémica entre animales, siendo *M. bovis* el microorganismo comúnmente infectante, favoreciendo que la primera infección en el humano pudiera haber sido con esta especie.

En un inicio la enfermedad no constituyó un problema importante de salud, hasta el advenimiento de la revolución industrial, cuando las condiciones de hacinamiento crearon la situación epidemiológica favorable para su diseminación. Durante los siglos XVII y XVIII la tuberculosis fue la cuarta causa de muertes de adultos en Europa y su naturaleza contagiosa fue reconocida en el siglo XIX; sin embargo el acontecimiento más trascendente fue el hallazgo de su agente causal, el bacilo tuberculoso y la demostración de su patogenicidad por Robert Koch en 1882 (Daniel et al., 1994).

2.3. Historia de la tuberculosis en Cuba.

La lucha antituberculosa en Cuba se remonta desde finales del siglo XIX justo instantes después de ser descubierto el agente causal, por el gran sabio alemán Robert Koch. Fue en 1890, viva aún la Cuba colonial, cuando se abre el primer ataque contra la TB como expresión de trabajo conjunto, reconocido y aceptado. Se crea la primera Liga Antituberculosa, con sede en Santiago de Cuba, integrada por varios médicos cubanos. Desdichadamente, la situación económica, social y política existente en Cuba, a finales del siglo XIX y principios del XX no coadyuvaron a la realización del proyecto antituberculoso, y en consecuencia, este proyecto no emergió en este período (Aldereguía, 1972; Beldarrain, 1998). Seguido a este inicio, la actividad antituberculosa en Cuba ha manifestado 3 períodos bien definidos y de características distintivas: pre-revolucionario, revolucionario (1959-1970) y posterior a 1970 (González et al., 1993).

El programa nacional de control de la TB iniciado en 1962 (Aldereguía, 1972), se ha caracterizado por cuatro etapas que transitan desde el tratamiento dispensarial con ingreso sanatorial, la implantación del tratamiento ambulatorio controlado en 1971, la adopción en 1982 del esquema acertado multidroga (siete meses) con el uso de la Rifampicina en ambas fases (MINSAP, 1995) y la introducción en 1997 de acciones específicas para reducir la fuente de infección en los contactos de casos de TB pulmonar con baciloscopía positiva (MINSAP, 1999).

La evolución de la TB de 1971 a 1991 mostró una tendencia descendente como expresión del resultado de la lucha contra la TB, el fortalecimiento del Sistema Nacional de Salud y las transformaciones socioeconómicas operadas en el país (González et al., 1993; 1994; Menéndez et al., 1981). La tendencia de la morbilidad en el período 1982-1991 refleja un descenso del 5%, que situó a Cuba entre los países con más baja incidencia (Anexo 2, Tabla II) (González et al., 1994; 1995; Marrero y Carreras, 1996; MINSAP, 1995).

De 1992 a 1994, la incidencia se incrementó casi tres veces, de una tasa de 5.0 a 14.7 por 100 000 habitantes (Marrero et al., 2000). A finales de 1993, se realizó una revisión del programa y se amplió la definición de caso a aquellos pacientes con evidencia clínico-radiológica pero sin confirmación bacteriológica. Entonces a partir de 1994 se incorporaron como caso de TB a aquellos que hasta ese año eran clasificados como “fuera de programa” (MINSAP, 1995).

Este incremento nacional ocurrió como un fenómeno multicausal debido quizás a: la crisis económica ocasionada por la desaparición del campo socialista, la disminución relativa de la prioridad de la tuberculosis en el conjunto de los problemas de salud del país, cambios en la organización de las medidas de control, la disminución del estado de alerta y de la conciencia sobre el riesgo de infección, y el debilitamiento general de la cantidad y la calidad de las acciones de localización de casos, entre otras causas (González et al., 1995).

Por edades, los cambios de la morbilidad se produjeron en la población adulta, fundamentalmente en el anciano masculino. Por forma clínica el aumento ha sido a

expensas de la TB pulmonar, la extrapulmonar presenta un comportamiento estable y aporta entre el 10 y 12% del total de casos (MINSAP, 1999).

En 1995 este incremento se detuvo y comenzó nuevamente la disminución de la detección de casos. En los años 1997, 1998 y 1999 se registraron tasas de 12.3, 11.1 y 10.0 por 100 000 habitantes, respectivamente (Marrero et al., 2000).

La mortalidad, en contraste, no ha tenido variaciones significativas, manteniéndose en tasas de 1 por 100 000 habitantes (MINSAP, 1999). Por su parte, la búsqueda de casos que evidenció un notable descenso en la identificación y estadio de los sintomáticos respiratorios, cual llegó a 0.27 % en 1992, se ha ido recuperando igualmente encontrándose en la actualidad en un 0.8% (Marrero et al., 2000). Los valores de estos indicadores demuestran la dirección correcta en que marcha el Programa de Control de la Tuberculosis en Cuba en este sentido.

El fenómeno de coinfección VIH/ *M. tuberculosis* no ha constituido un factor significativo en el incremento de la TB en el país. Desde que se reportó el primer caso de TB en pacientes de SIDA en 1992 hasta mediados de 1999 se habían detectado 137 casos de coinfección de 1899 seropositivos conocidos (MINSAP, 1999).

Con relación a la resistencia a las drogas, en el Laboratorio Nacional de Referencia de Tuberculosis y Mycobacteria (LNRTBM) del Instituto “Pedro Kourí” (IPK) se viene realizando un estudio longitudinal por más de veinte años. Debido a los bajos valores de resistencia encontrados recientemente (Espinal et al., 2001; Pablo-Mendez et al., 1998) se puede concluir que la multirresistencia no debe haber constituido un factor importante a considerar en el incremento de la morbilidad en los años precedentes.

El país desde 1995 ha logrado enfrentar y controlar con éxito esta nueva situación epidemiológica de la TB a nivel nacional. Esto pone de manifiesto la capacidad de respuesta del sistema nacional de salud, al detenerse el crecimiento de la enfermedad e iniciarse la recuperación gradual de los indicadores operacionales del programa (MINSAP, 1999).

2.4. *Mycobacterium tuberculosis*. Ubicación taxonómica y características generales.

Mycobacterium tuberculosis es una especie del género *Mycobacterium*, único de la familia *Mycobacteriaceae*, la cual pertenece al orden *Actinomycetales*. El bacilo tuberculoso forma parte del complejo tuberculosis, donde se ubican además *M. bovis* (incluida las cepas BCG), *M. africanum* y *M. microti* (Grange, 1996).

Los bacilos de la tuberculosis son bastoncillos rectos o ligeramente curvos con extremos redondeados, aunque en medios artificiales se ven formas cocoides y filamentosas con morfología variable. Estos microorganismos varían en ancho de 0.2 a 0.5 μm y en longitud de 1 a 4 μm . Son aerobios estrictos, lo cual explica su predilección de causar enfermedad en tejidos muy oxigenados como el lóbulo superior del pulmón y el riñón; inmóviles, que no esporulan ni forman cápsulas y son resistentes a la decoloración alcohol-ácida cuando son teñidos con fucsina básica fenicada (tinción de Ziehl-Neelsen). Con este método los bacilos se ven de color rojo sobre un fondo azul (Britton, et al., 1994; Fauci y Lane, 1995; de Ruiz Holgado, 1996).

La energía la obtienen de la oxidación de muchos compuestos sencillos de carbono y sus actividades bioquímicas no son características. *M. tuberculosis* prolifera con lentitud (tiene un tiempo de duplicación de 18 horas), contrastando con la mayoría de las bacterias, que pueden duplicar su número en una o menos. Debido a que su multiplicación es lenta, los cultivos de muestras biológicas deben conservarse durante períodos de 6 a 8 semanas de incubación antes de registrarlos como negativos (Brooks et al., 1996).

Un componente que reviste gran importancia en la célula de *M. tuberculosis* y las micobacterias en general es la pared celular, la cual es una gran macromolécula rica en complejos lipídicos. Los más importantes son ácidos micólicos (ácidos grasos de cadena larga), ceras y fosfátidos; que están en su mayoría unidos a proteínas y polisacáridos (García-Rodríguez, 1987).

El alto porcentaje de lípidos presente en la pared celular, que alcanza el 60% de su peso seco, es una propiedad distintiva de estos organismos que condiciona la casi totalidad de los hechos que ocurren frente a una infección por este agente. Dicha cubierta, de característica impermeable, determina su gran resistencia: a la coloración (frente a colorantes básicos), a la actividad bactericida del complemento y a la digestión intracelular por macrófagos. Esta riqueza de lípidos puede explicar también algunas otras características propias de las micobacterias como: el carácter hidrófobo de los bacilos con tendencia a adherirse durante el crecimiento y la resistencia a la desecación, propiedad ésta muy importante para la transmisión, ya que permite la sobrevivencia del bacilo en esputo expectorado seco. También contribuye al lento crecimiento del microorganismo, dificultando el paso de sustancias nutritivas al interior de las células. Por todo esto se puede plantear, que los lípidos le sirven a las micobacterias patógenas como una armazón protectora (de Ruiz Holgado, 1996).

Formando parte de la envoltura se encuentra también la membrana plasmática, que en el caso de las micobacterias está compuesta por algunos elementos distintivos como el lipopolisacárido lipoarabinomano-lipomano y el fosfatidilinositol manosa (García-Rodríguez, 1987).

Si bien los bacilos tuberculosos pueden crecer en un medio sintético simple, con glicerol u otros componentes como única fuente de carbono y sales amoníacas como fuente de nitrógeno, requieren de asparagina o mezclas de aminoácidos para estimular el inicio del crecimiento e incrementar su velocidad. Son muy sensibles a la inhibición por ácidos grasos de cadenas largas, aunque pueden ser estimulados por éstos cuando se incorporan al medio en concentraciones muy bajas. Puede obtenerse una concentración satisfactoria añadiendo al medio albúmina de suero, que liga los ácidos grasos con una afinidad suficiente para mantener su concentración libre a niveles óptimos para el crecimiento (de Ruiz Holgado, 1996).

2.5. Diagnóstico de la tuberculosis.

El diagnóstico de la tuberculosis consta básicamente de dos pasos fundamentales: la identificación de los sospechosos y la realización del estudio diagnóstico.

Pueden catalogarse como sospechosos los contactos de enfermos tuberculosos, sintomáticos respiratorios, individuos inmunodeficientes y personas dentro de comunidades cerradas. Un sintomático respiratorio es toda persona que presente tos y expectoración por más de dos semanas (Crofton et al., 1992; Heifets y Good, 1994).

El diagnóstico microbiológico de la tuberculosis se basa en la detección del microorganismo por microscopía y cultivo de muestras clínicas.

Para realizar el análisis microscópico de las muestras clínicas se realizan uno de los dos métodos de tinción diferentes, que demuestran la resistencia de las micobacterias al tratamiento con ácidos y alcoholes. y son:

- a) Tinción con Fuschina caliente (método de Ziehl-Neelsen) o fría (variante de Kinyoun).
- b) Tinción fluorescente con Auramina O.

La detección de micobacterias en muestras patológicas puede ser difícil, entre otras causas, al extremadamente lento tiempo de duplicación del bacilo *M. tuberculosis*. Por esta razón, se hace necesario descontaminar las muestras de la flora bacteriana normal antes de cultivarlas.

Dentro de los métodos de descontaminación de muestras clínicas más utilizados se encuentra el método de Petroff que emplea el Hidróxido de Sodio como agente descontaminante y homogeneizante (Casal, 1990).

Para realizar el aislamiento de las micobacterias se han propuesto diferentes formulaciones de medios de cultivo existiendo tres grupos fundamentales: los medios sólidos (de base de huevo o agar) y los medios líquidos, siendo los sólidos los más recomendados para el

aislamiento primario. Dentro de los medios sólidos los más utilizados son el Lowestein-Jensen (base huevo) y los Middlebrook 7H10 y 7H11 (con agar como soporte). En estos medios convencionales se necesita de una larga incubación (20-40 días como promedio) para demostrar la presencia de colonias macroscópicas (Heifets, 1997; Fadda y Sanguinetti, 1998).

La identificación de *M. tuberculosis* es fácil pero requiere de reactivos específicos, por lo que sólo debe hacerse en centros especializados donde el número de muestras ensayadas justifique el costo de los reactivos. Este microorganismo puede ser identificado por una combinación de: la observación macroscópica de sus colonias, por la velocidad de crecimiento, el tipo de fotoreactividad y por el análisis de pruebas bioquímicas (acumulación de niacina, reducción de nitratos y presencia de catalasa termorresistente).

Debido al incremento global de la tuberculosis resistente a drogas antibacilares se hace cada vez más necesario realizar pruebas de susceptibilidad “in vitro” a estas drogas. El método más comúnmente usado es el de las proporciones (o método de Canetti), que es uno de los considerados como de referencia por la OMS y la UICTER para evaluar la resistencia a las drogas antibacilares. Con este método se define la proporción de bacilos resistentes que hay en una cepa frente a una droga determinada, la cual es capaz de inhibir el crecimiento de los bacilos sensibles pero no de los resistentes. Sin embargo, este método tiene la desventaja de que el tiempo para obtener un resultado puede demorar varias semanas (4-6 semanas).

2.5.1. Métodos alternativos.

El uso de los métodos convencionales en el aislamiento e identificación de micobacterias está limitado a laboratorios especializados debido a su complejidad y larga duración (45-60 días). Por esta razón se han propuestos diferentes métodos alternativos para detectar *M. tuberculosis* en muestras clínicas, siendo el más importante el sistema radiométrico (Fadda y Sanguinetti, 1998; Heifets, 1997).

El método radiométrico consiste en la inoculación de muestras clínicas en un medio líquido (Middlebrook 7H12) que contiene un sustrato marcado con carbono radiactivo (ácido palmítico¹⁴C). Cuando la micobacteria crece y metaboliza esta sustancia produce dióxido de carbono radiactivo (¹⁴C₂O₂) que es medido por un contador automático de radiaciones beta (BACTEC 460 TB) (Heifets y Good, 1994; Roberts et al., 1993; Shinnick y Good, 1994; Siddiqui et al., 1981). Este sistema permite detectar el crecimiento bacteriano en etapas tempranas (7-14 días). También permite identificar rápidamente el “bacilo de Koch” si se transfiere el cultivo obtenido a un nuevo frasco con medio 7H12 más el compuesto p-nitro- α -acetilamino- β -hidroxipropiofeno (NAP). En este caso, *M. tuberculosis* y *M. bovis* son las únicas especies del género que no crecen en presencia de este producto.

La identificación rápida de *M. tuberculosis* puede también ser realizada combinando este sistema radiométrico con la hibridación de ácidos nucleicos empleando el sistema comercial AccuProbe (GenProbe, EE.UU.) El ensayo con sondas de ADN se basa en la habilidad de las cadenas de ácidos nucleicos complementarias de alinearse y asociarse con el ARN bacteriano de forma estable, específica y formando un complejo de doble cadena. Como la sonda de ADN (de simple cadena) está unida a un éster de acridina quimioluminescente al añadirse peróxido de hidrógeno ocurrirá una reacción luminescente en las muestras donde se haya asociado la sonda de ADN de *M. tuberculosis* con su ARN correspondiente. La combinación de estas dos metodologías puede acortar significativamente el tiempo de detección e identificación de *M. tuberculosis* a tan poco como 4-7 días (Shinnick y Good, 1995).

En la última década se reportaron una amplia variedad de metodologías para el diagnóstico de la tuberculosis basadas en la amplificación de una secuencia de ADN determinada como son: la amplificación por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR (siglas en inglés) (Clarridge et al., 1993; Eisenach et al., 1990), la amplificación de ARN (Jonas et al., 1993), la amplificación por desplazamiento de cadena (Walker et al., 1994) y la amplificación por reacción en cadena de la ligasa (Ausina et al., 1997; Iovannisci et al., 1993). En la actualidad existen varios sistemas comerciales basados en las metodologías

mencionadas anteriormente pero sólo dos de ellos han sido validos ampliamente y autorizados para el diagnóstico en Estados Unidos y Europa. Con los sistemas *Amplificor MTB* (Roche Molecular Systems, EE.UU.) y *E-MTD Test* (Gen-Probe, EE.UU.) se puede obtener un resultado, a partir de un esputo, en pocas horas. A pesar de las ventajas de estos sistemas comerciales se han observado algunas dificultades para identificar correctamente muestras de esputo negativas al examen directo (Shinnick y Good, 1995).

Para lograr una más rápida determinación de la susceptibilidad a drogas también se han ensayado numerosos métodos fenotípicos y métodos genotípicos (Palomino, 2000).

Dentro de los métodos fenotípicos tenemos: el mencionado sistema radiométrico BACTEC 460 TB (Fadda y Sanguinetti, 1998), las tiras de antibióticos E-test (Hausdorfer et al., 1998), los métodos que miden el metabolismo a través de sustancias colorimétricas (Abate et al., 1999; Collins y Franzblau, 1997; Franzblau et al., 1998; Mshana et al., 1998; Palomino et al., 1999^a) técnicas que detectan el consumo de oxígeno con reactivos fluorescentes, como el sistema MGIT (Badak et al., 1996; Hanna et al., 1999; Palomino et al., 1999^b; Pfyffer et al., 1997; Reisner et al., 1995; Walters y Hanna, 1996); la detección del ATP producido por *M. tuberculosis* a través de bioluminescencia (Nilsson et al., 1988); el ensayo del fago amplificado biológicamente o PhaB assay (Bergmann y Woods, 1997; McNerney, 1999; Wilson et al., 1997); entre otros.

También se han ensayado diversas variantes genéticas para la determinación rápida de la resistencia a las drogas antibacilares como: la reacción en cadena de la polimerasa unido al polimorfismo conformacional de cadena simple o PCR-SSCP (siglas en inglés) (Felmlee et al., 1995; Pretorius et al., 1996; Scarpellini et al., 1997; Sreevatsan et al., 1998; Telenti et al., 1993^a); la reacción en cadena de la polimerasa múltiple (Plikaytis et al., 1994); la secuenciación automática de ADN (Kapur et al., 1995; Telenti et al., 1993^b); la PCR-Heteroduplex (Williams et al., 1998); la hibridación en fase sólida o ensayo INNOLiPA (Innogenetics NV, Bélgica) (Cooksey et al., 1997; de Beenhouwer et al., 1999; Gamboa et al., 1998; Rossau et al., 1997); el ensayo de microarreglos de ADN (Troesch et al., 1999); sistemas de fagos reporteros (Arain et al., 1996; Carriere et al., 1997; Jacobs Jr et al., 1993;

Riska et al., 1999); proteínas fluorescentes reporteras (Hiekey et al., 1996; Shawar et al., 1997; Srivastava et al., 1998); entre otras.

2.6. Caracterización de *Mycobacterium tuberculosis*.

La caracterización de *M. tuberculosis* ha constituido un gran reto para la micobacteriología y en este sentido, ésta se ha encaminado hacia el desarrollo de técnicas que permitan diferenciar las cepas de esta especie aisladas de pacientes involucrados o no en microepidemias.

Durante muchos años esto fue llevado a cabo utilizando diferentes métodos microbiológicos que permitían evaluar las características fenotípicas, siendo los más empleados:

- Determinación de resistencia inusual a drogas (Reves et al., 1981).
- Serotipaje (Grange y Laszlo, 1990).
- Electroforesis de enzimas multilocus (Small y van Embden, 1994)
- Heterogeneidad bioquímica (Hoffner et al., 1993).
- Fagotipaje (Jones Jr, 1988).

Esta última fue la técnica estándar hasta finales de los años ochenta. Tiene como principales impedimentos el bajo número de fagotipos identificados y la gran laboriosidad (Gicquel, 1993; Otal et al., 1991; Snider et al., 1994; van Soolingen et al., 1991).

La primera técnica molecular basada en el ADN empleada en la caracterización de *M. tuberculosis* fue el análisis de restricción. Esta técnica está basada en la comparación de los fragmentos de restricción del cromosoma bacteriano separados por electroforesis. Fue aplicada por Collins y de Lisle para diferenciar cepas salvajes y de referencia de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG (Collins y de Lisle, 1984). Al año siguiente fue utilizada por estos mismos autores para comparar todos los miembros del complejo tuberculosis (Collins y de Lisle, 1985).

A pesar de ser una técnica simple, la interpretación de los resultados se convierte en una tarea difícil por el gran número de fragmentos generados por las enzimas de restricción empleadas (de mediana frecuencia de corte) en la tipificación de *M. tuberculosis*, además del escaso número de patrones que se pueden llegar a diferenciar con estas.

Por estas razones se desarrolló la técnica denominada electroforesis en campo pulsado, basada en los polimorfismos de mayor peso molecular relativo generados por endonucleasas con baja frecuencia de corte y separados bajo condiciones especiales de electroforesis por el empleo de un sistema de campos pulsados (Varnerot et al., 1992; Zhang et al., 1992). Esta técnica mejora sustancialmente la interpretación de los resultados, pero su principal limitación está dada en los escasos patrones de polimorfismo que genera entre las cepas en estudio, además del alto costo de los equipos necesarios (Ross et al., 1992).

El estudio de secuencias de ADN del cromosoma de *M. tuberculosis* ha aportado información genética valiosa, encontrándose dentro de ellas elementos repetitivos específicos del complejo tuberculosis que han ayudado a su caracterización.

Una vez acumulados estos conocimientos surge la técnica denominada análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción o RFLP (siglas en inglés), la cual está basada en el mismo principio del análisis de restricción, realizando además una hibridación con una sonda de ADN conocida, constituida por un fragmento del elemento de inserción IS6110 (van Embden et al., 1993).

2.7. Análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción de *M. tuberculosis*.

La técnica de RFLP-IS6110 fue desarrollada por iniciativa de Dick van Soolingen (del Instituto Nacional de Salud Pública y el Ambiente de Holanda) quién ensayó una secuencia de ADN repetitiva, recién descubierta en su laboratorio, como sonda en el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción de cepas de *M. tuberculosis* aisladas durante un brote en el sur de Holanda. Para gran sorpresa de él y su grupo encontraron (por primera

vez) patrones de RFLP idénticos en cepas de pacientes diferentes (Sêbek, 2000). Este hallazgo le dio una nueva dimensión a la epidemiología de la tuberculosis, siendo ahora posible reconocer cepas de *M. tuberculosis* diferentes y seguir su transmisión en la población a diferentes niveles, desde brotes institucionales a estudios globales de epidemiología (Hermans et al., 1990; Kiers et al., 1997; van Soolingen et al., 1991)

El RFLP utilizando como sonda el elemento repetitivo IS6110 ha sido en los últimos tiempos el método más empleado en la caracterización del bacilo tuberculoso y es considerada la tecnología de referencia para estudios epidemiológicos (Martin, 1996; van Soolingen y Hermans, 1995).

Esta técnica establecida recientemente consiste en el aislamiento de micobacterias en cultivo, la extracción del ADN cromosomal y su digestión con la enzima de restricción *PvuII* en múltiples fragmentos de diferentes tamaños, cuyo número depende del número de copias IS6110 en el cromosoma. Estos fragmentos se visualizan en un gel de electroforesis y posteriormente son transferidos a una membrana de nylon, la cual se hibridiza con una sonda de IS6110 marcada. La posición de los fragmentos de ADN en el gel utilizado para la electroforesis dependerá del peso molecular de dichos fragmentos (la diferencia en peso molecular surge debido a la variación de las distancias entre las secuencias de inserción). Finalmente, son obtenidos patrones de banda de los fragmentos de ADN de tamaños específicos que constituyen la huella única que varía de una cepa a otra (Chevre~~t~~ Dellagi et al., 1993; Hayward, 1995).

2.7.1. Elemento repetitivo IS6110 y su aplicación.

IS6110: Esta secuencia de inserción es miembro de la familia de las secuencias de inserción IS3 originalmente descubiertas en *Escherichia coli* y *Shigella* (van Soolingen et al., 1994). El elemento IS6110 fue aislado inicialmente del cromosoma de *M. tuberculosis* por Thierry y colaboradores (Thierry et al., 1990^b) y posteriormente se encontró distribuido en todo el complejo tuberculosis (Hermans et al., 1990). Dependiendo de la especie donde se caracterice se llamará IS6110, IS986 ó IS987; diferenciándose sólo en unos pocos pares de

bases (Hermans et al., 1990; Thierry et al., 1990^a) pudiendo ser considerados en la práctica como idénticos (Hayward, 1995).

IS6110 es un segmento de aproximadamente 1355 pares de bases y es cortado por la enzima de restricción *PvuII* en el par de base 461. La sonda reconoce una sección de la secuencia de inserción a la derecha de los pares de bases cortados por *PvuII* (Hayward, 1995).

El número de copias y la posición en el cromosoma son altamente variables entre una cepa y otra, pudiendo llegar a 20 o más en el caso de *M. tuberculosis* (van Soolingen et al., 1994; van Soolingen y Hermans, 1995) aunque se han identificado cepas con una o ninguna copia (Fang y Forbes, 1997).

Producto de la amplia distribución de esta secuencia en el genoma de *M. tuberculosis* y su frecuencia de transposición relativamente baja (van Soolingen et al., 1991), es posible obtener patrones simples y estables para la comparación entre cepas empleándola en la técnica de RFLP, por lo que dicho elemento es usado con preferencia en estudios epidemiológicos sobre todo en brotes (Cave et al., 1994; van Soolingen et al., 1995).

Se debe señalar que este elemento es insuficiente para distinguir entre sí cepas de *M. tuberculosis* con pocas (cinco copias o menos) o ninguna copia de IS6110. Esto ha llevado a la utilización de otros marcadores genéticos alternativos como son: DR, PGRS y (GTG)₅ que se describen a continuación (van Soolingen et al., 1993; Warren et al., 1996).

2.7.2. Otros marcadores genéticos utilizados.

IS1081: Esta secuencia de inserción posee 1324 pares de bases y fue descubierta por Collins y Stephen en 1991 (Collins y Stephen, 1991). Este elemento genético está relacionado con la familia del IS256 de *Staphylococcus aureus* y aunque en un inicio se pensó que era específica de este complejo, posteriormente se encontró en cepas de *M. xenopi* (Collins et al., 1993). En contraste con la secuencia IS6110, el IS1081 exhibe un

reducido polimorfismo (van Soolingen et al., 1993) lo cual hace que su utilidad en los análisis epidemiológicos sea muy limitado. Sin embargo, con este elemento de inserción se pueden distinguir las cepas de *M. bovis* BCG de los otros integrantes del complejo *M. tuberculosis* (van Soolingen et al., 1992).

DR: La secuencia repetitiva directa o DR (siglas en inglés) posee pocos pares de bases agrupados en un único locus cromosomal y entremezcladas con secuencias espaciadoras repetitivas (Beggs et al., 1996). El número de secuencias de DR varía de 10 a 50 copias en cepas del complejo tuberculosis. La mayoría de las cepas de *M. tuberculosis* contienen una o dos copias de IS6110 en la sección del genoma donde se encuentra la secuencia DR, siendo esta en específico la región preferencial de integración del elemento IS6110 en el cromosoma (Fang y Forbes, 1997; Hermans et al., 1991).

PGRS: La secuencia polimórfica repetitiva rica en Guanina-Citosina o PGRS (siglas en inglés) es una secuencia corta compuesta por muchas repeticiones imperfectas presentes en múltiples agrupaciones cromosomales. Las PGRS no están restringidas solamente al complejo tuberculosis sino que están incluidas en *M. kansasii*, *M. szulgae* y *M. malmøense* (Suffys et al., 1997). El mecanismo que genera el polimorfismo asociado a PGRS todavía no es conocido (van Soolingen y Hermans, 1995).

(GTG)₅: Es un oligonucleótido repetitivo recientemente descubierto, el cual genera un número de elementos informativos altamente polimórficos, por lo que permite ser utilizado como marcador genético (Kamerbeek et al., 1997; Wiid et al., 1994).

2.7.3. Aplicaciones de la técnica de RFLP-IS6110.

Desde que fue descubierto el alto polimorfismo del ADN micobacteriano detectado por IS6110 entre aislamientos clínicos no relacionados y la estabilidad de este elemento genético en el cromosoma de *M. tuberculosis*, la técnica de RFLP ha sido ampliamente utilizada para comprender la transmisión de la tuberculosis, y se ha llegado a convertir en

una herramienta valiosa en estudios epidemiológicos. Entre las aplicaciones más relevantes se pueden mencionar:

- Monitoreo de cepas individuales sobre la base de la ocurrencia de elementos repetitivos de ADN en el cromosoma (Bifani et al., 1996; de Boer y van Soolingen, 2000; Fletcher, 2001; Yang et al., 1994; 1995). Esto adquiere mayor relevancia si se tiene en cuenta la asociación de dos grandes pandemias: SIDA y tuberculosis (Raviglione, 1996).
- Estudios de transmisión de la tuberculosis en el área urbana, los cuales han arrojado excelentes resultados que han permitido evidenciar la importancia de los programas de control de tuberculosis para disminuir su transmisión en la población (Genewein et al., 1993; Suffys et al., 1997). Por ejemplo, investigaciones recientes usando esta técnica han demostrado una transmisión extensiva en grandes ciudades de Estados Unidos y Europa y que factores como la resistencia a drogas, edad, raza, clase social, etc., pueden ser de riesgo para adquirir la enfermedad (Alland et al., 1994; Borgdorff et al., 2000; Gutiérrez et al., 1998; Samper et al., 1998; Small et al., 1994; van Deutekom et al., 1997).
- Análisis de casos de infecciones adquiridas recientemente o casos de tuberculosis secundarias "reactivación endógena-reinfección exógena"; lo que permite comprender mejor el fenómeno de transmisión de la tuberculosis y además permite ubicar con más certeza los contactos de los diferentes pacientes (Caminero et al., 2001; Niemann et al., 1997; Stead y Bates, 2000; Strässle et al., 1997; Warren et al., 1996).
- Este tipo de estudios en poblaciones determinadas han aportado importantes sugerencias para mejorar los programas de control de dichas áreas (Smith y Moss, 1994; Suffys et al., 1997).
- El análisis de la influencia del VIH en la transmisión de la tuberculosis es otro aspecto de interés, demostrándose a través de varios estudios como las personas infectadas por el VIH tienen un riesgo considerablemente alto de desarrollar la enfermedad por una

infección exógena de transmisión reciente, lo que contribuye al desarrollo rápido de la tuberculosis en estos pacientes (Portugal et al., 1999; Strässle et al., 1997; Suffys et al., 1997).

- El seguimiento de la eficacia de la quimioterapia es otra aplicación de la técnica. Mediante estudios realizados se ha podido demostrar que la diversidad de patrones obtenidos por el RFLP- IS6110 entre cepas MDR podría sugerir el uso de medidas de control específicas como la observación directa de la terapia. No obstante una limitada diversidad de patrones obtenidos entre cepas MDR, sugiere fallas en el diagnóstico y en el tratamiento de casos infecciosos (Suffys et al., 1997).
- Resulta una herramienta poderosa en el análisis epidemiológico de la tuberculosis en áreas geográficas restringidas y la transmisión a causa del movimiento transcontinental de un gran número de personas, permitiendo además determinar el origen geográfico de las cepas (Hermans et al., 1995; Samper et al., 1997; Spidola de Miranda et al., 1996; Sterling et al., 2000).
- Análisis epidemiológicos de brotes de tuberculosis en lugares cerrados o grupos determinados como: escuelas (Ridzon et al., 1997; Toyota y Morioka, 2001), hospitales (Cleveland et al., 1995; Hannan et al., 2001; Harris et al., 2000; Lemaitre et al., 1996), hogares para desamparados (Curtis et al., 2000; Kearns et al., 2000) y prisiones (Bergmire-Sweart et al., 1996; Chaves et al., 1997; Holton et al., 1996), fundamentalmente.
- La combinación de esta técnica con la investigación epidemiológica tradicional, puede aportar información para establecer los contactos de los enfermos involucrados en los brotes y llegar incluso a la ubicación del caso fuente (Small y van Embden, 1994; Suffys et al., 1997).

- Entre otras aplicaciones está el impacto de la inmunosupresión sobre la susceptibilidad a la reinfección (van Soolingen et al., 1994); el seguimiento de las infecciones nosocomiales (Hannan et al., 2001; van Soolingen y Hermans, 1995), las adquiridas en el laboratorio (Mazurek et al., 1991), las contaminaciones cruzadas de laboratorio (Bauer et al., 1997; Braden et al., 1997^b; Small et al., 1993; Trakas et al., 2000) y las infecciones multiclonales (Braden et al., 1997^a).

2.7.4. Empleo de la técnica de RFLP-IS6110 al estudio de la tuberculosis en poblaciones.

El porcentaje de disminución de la tuberculosis, varía en los diferentes lugares del mundo y depende principalmente de la situación económica de los países. No obstante algunos países que se conoce tienen un alto nivel de vida, presentan actualmente un incremento en el número de individuos con tuberculosis, probablemente como resultado de transmisión reciente (Suffys et al., 1997). Este es el caso de países europeos como: Dinamarca, Irlanda, Italia, Holanda, España, y Suiza entre otros (Smith y Moss, 1994).

Uno de los factores de riesgo más asociados a ese incremento parece ser el aumento de inmigración hacia estos países, según ha podido concluirse después de algunos estudios realizados en países como: Holanda (van Deutekom et al., 1997) y Austria (Vogetseder et al., 1994). Sin embargo, la inmigración hacia Estados Unidos desde países de alta incidencia no parece estar asociado con la transmisión reciente de la tuberculosis en esa nación (Alland et al., 1994; Bishai et al., 1998; Borgdorff et al., 2000; el-Sahly et al., 2001; Small et al., 1994).

Un estudio realizado en Francia sugirió que las malas condiciones socioeconómicas en determinados grupos sociales también pueden ser un factor de riesgo importante asociado con la transmisión activa de la tuberculosis (Gutiérrez et al., 1998).

Una situación similar se vive en algunas ciudades de Estados Unidos, donde el resurgimiento de la tuberculosis en el área urbana ha incitado a diferentes grupos de investigación a realizar estudios que permitan analizar tal fenómeno en grandes ciudades norteamericanas. Este es el caso de los estudios realizados en San Francisco (Small et al.,

1994), Nueva York (Alland et al., 1994) y Los Angeles (Barnes et al., 1997), ciudades que han presentado un incremento en el número de casos de tuberculosis en los últimos años.

El objetivo de estos estudios fue investigar la transmisión reciente y los factores de riesgo relacionados, encontrando que: tanto los factores de riesgo epidemiológicos asociados a la transmisión como los biológicos asociados al desarrollo de la enfermedad eran necesarios para la transmisión y rápida progresión de la tuberculosis. En estos estudios, la combinación del RFLP-IS6110 para tipificar cepas de *M. tuberculosis* y los datos obtenidos por medio de la epidemiología convencional, han mejorado sustancialmente la comprensión de la transmisión de la tuberculosis en el área urbana (Alland et al., 1994; Small et al., 1994).

Es así como el uso de la técnica RFLP-IS6110 para identificar la vía de transmisión de la tuberculosis en estas ciudades, se basó en la premisa que casos no relacionados epidemiológicamente ocurren como resultado de una infección latente y estos presentan un patrón de RFLP único. Los pacientes ubicados en éste grupo tuvieron características comunes como: edad avanzada (mayor de 60 años), mejores condiciones de vida, y poco común el diagnóstico de SIDA. Contrariamente los casos que están relacionados epidemiológicamente son consecuencia de una infección reciente y tendrán los mismos patrones. Para este grupo de pacientes, los factores de riesgo más comunes fueron: edad (personas jóvenes, y generalmente menores de 60 años), diagnóstico de SIDA, raza negra, origen hispánico y malas condiciones de vida (Alland et al., 1994; Small et al., 1994).

Las conclusiones derivadas de estos estudios traen tres grandes implicaciones para el control de la tuberculosis en áreas urbanas en general. Primera, como van en aumento los casos como resultado de una infección reciente con *M. tuberculosis*, deben ser identificados los lugares de transmisión y aplicarse un control epidemiológico riguroso. Segunda, como un solo caso de tuberculosis puede tener un efecto devastador en el programa de control, se hace necesario asegurar un tratamiento puntual y efectivo para los pacientes infectados con tuberculosis. Tercera, debido al bajo porcentaje de pacientes relacionados que fueron identificados por investigaciones convencionales de los contactos,

nuevas metodologías en este campo deben ser abordadas para ser aplicadas en poblaciones específicas (Alland et al., 1994; Small et al., 1994).

2.7.5. Empleo del RFLP-IS6110 en el estudio de la transmisión de la tuberculosis en brotes institucionales.

Aunque la tuberculosis (TB) es un problema de salud reemergente en los países desarrollados, los resultados de varios estudios epidemiológicos obtenidos hasta el momento evidencian el marcado incremento del número de individuos con tuberculosis activa. Esta situación es más grave aún en sitios donde las personas con esta afección son además individuos inmunocomprometidos (o conviven con ellos) y que se caracteriza por períodos extremadamente cortos entre exposición y desarrollo de la enfermedad activa. Debido a ello, los residentes de instituciones como correccionales, guarderías, orfanatorios, instituciones mentales y trabajadores de la salud son actualmente reconocidos como poblaciones con alto riesgo para la transmisión extensiva del bacilo (Greenberg et al., 1995).

En estos momentos gracias a la disponibilidad de una herramienta molecular, el RFLP-IS6110, los métodos epidemiológicos convencionales se han visto complementados para brindar un enfoque más objetivo y real acerca de la transmisión de la tuberculosis. El empleo del RFLP-IS6110 ha permitido confirmar la presencia de eventos nosocomiales en instituciones cerradas. De esta manera se ha podido confirmar o refutar la cadena de transmisión propuesta por la epidemiología convencional (cadena de transmisión teórica). Ejemplos de este hecho se han reportado recientemente en varias instituciones, principalmente hospitales y prisiones de la Ciudad de Nueva York, donde el estudio genético-molecular de varios brotes nosocomiales de tuberculosis resistente a múltiples drogas se ha podido realizar, gracias al RFLP (Michele et al., 1997; Nivin et al., 1998). En algunos casos pudiéndose detectar la presencia de más de una cepa transmisora dentro de un brote. La detección rápida y certera en estos casos se ha hecho sumamente importante ya que la transmisión de cepas multi-resistentes hace que el diagnóstico de la susceptibilidad a drogas sea más demorado y que el paciente responda mal al tratamiento clásico contra la

tuberculosis, diseminándose la enfermedad de manera acelerada (Alito et al., 1999; Palittapongarnpim et al., 1997).

El factor de riesgo más asociado con el incremento del número de individuos con tuberculosis parece ser el efecto adverso de la pobre calidad de los programas de control, según ha podido concluirse después de realizarse algunos estudios usando la técnica de RFLP en instituciones cerradas (Valway et al., 1994^b).

Entre los factores específicos identificados se destacan: el retraso en el reconocimiento de resistencia a drogas, la ausencia de resultados clínicos y el prolongamiento de baciloscopías positivas en un número considerable de pacientes con susceptibilidad al bacilo. Dichos factores traen consigo fallas en la aplicación de una terapia efectiva y el adecuado aislamiento de los pacientes (MacIntyre et al., 1995; Ridzon et al., 1997; Valway et al., 1994^a).

Otros estudios han implicado la ventilación y el acondicionamiento del aire en la transmisión nosocomial de cepas de esta especie; así como también, el alto grado de exposición de individuos a pacientes con tuberculosis activa (Beck-Sagué et al., 1992; Coronado et al., 1993; Niemann et al., 1997). Estos estudios demostraron que la posibilidad de exposición a la tuberculosis activa asintomática tanto para el personal médico como para los pacientes siempre está presente.

Otro factor responsable y que ha contribuido significativamente en la propagación del bacilo es la infección con el VIH, la cual ha ido cambiando drásticamente la epidemiología de la tuberculosis. Sin embargo, en contraste con reportes previos, en estudios de brotes de tuberculosis ocurridos en prisiones no se encontró asociación significativa entre la infección VIH y la conversión de los infectados con cepas MDR; aunque la infección por VIH sí se halló fuertemente asociada con la progresión rápida hacia la enfermedad activa una vez que la persona era infectada. Este es el caso de dos estudios llevados a cabo en prisiones del Estado de Nueva York (Valway et al., 1994^a; 1994^b) y en una prisión de Texas (Bergmire-Sweart et al., 1996).

En el caso particular del brote MDR ocurrido en Texas entre individuos con retraso mental, la coinfección VIH-TB sirvió además al personal médico como una señal de alerta sobre la posibilidad de desarrollo de un nuevo brote de tuberculosis, es decir, que los residentes coinfectados sirvieron como centinelas de la población en la identificación de un problema de transmisión. La importancia de ello estriba en el hecho, de que se trata, de una población especial de enfermos mentales, personas que están menos capacitadas para alertar al personal médico de la ocurrencia de cambios significativos en su estado de salud (Bergmire-Sweart et al., 1996).

En otros estudios realizados en prisiones usando la técnica de RFLP se han obtenido tasas de incidencia de tuberculosis con valores muy por encima de los reportados para la población urbana. Tal es el caso de dos investigaciones realizadas en una población grande de una prisión en España (Chaves et al., 1997) y en el sistema de prisiones del Estado de Nueva York (Valway et al., 1994^a). En el primer estudio, el 62% de los prisioneros había adquirido infección reciente y en el segundo fue detectada una tasa de incidencia de 156.2 por 100 000 en la prisión, contra una de 10.4 por 100 000 en la comunidad, lo cual revela el marcado incremento del número de casos de tuberculosis en estas instituciones cerradas.

El principal factor de riesgo asociado con dicho incremento parece ser las condiciones de hacinamiento en que viven virtualmente los prisioneros. Entre otros factores no menos importantes se subrayan: la alta prevalencia de infectados con el VIH entre los presos, retrasos en la identificación y aislamiento de los casos sintomáticos o sospechosos de tuberculosis y la frecuente transferencia de éstos entre distintas entidades correccionales, aún en período de establecimiento del régimen terapéutico (Portaels et al., 1999; Brewer, 1999).

De forma general, el objetivo principal de todos éstos estudios se basó en la investigación de los patrones de transmisión, así como también de los factores de riesgo relacionados con éstos, demostrándose que las condiciones existentes en las instituciones cerradas facilitan la transmisión del bacilo y la rápida progresión de la tuberculosis en estas instituciones

(Alland et al., 1994; Bergmire-Sweart et al., 1996; Chaves et al., 1997; Small et al., 1994; Valway et al., 1994^a).

Las conclusiones derivadas de estos estudios traen grandes implicaciones para el control de la tuberculosis en instituciones cerradas, y para la población en general. El aumento del número de casos de tuberculosis pulmonar con baciloscopia positiva y la existencia cada vez más acentuada de cepas MDR en dichas instalaciones evidencian la necesidad de la aplicación de un control epidemiológico más riguroso (Alland et al., 1994; Small et al., 1994).

Como puede evidenciarse, la combinación de la técnica RFLP-IS6110 para caracterizar cepas de *M. tuberculosis* y los datos obtenidos por medio de la epidemiología convencional, han mejorado sustancialmente la comprensión del fenómeno de transmisión de la tuberculosis en las instituciones cerradas, y consecuentemente han permitido establecer enfoques más precisos en las estrategias de control de la enfermedad (Alland et al., 1994; Small et al., 1994; Valway et al., 1994^a).

Toda la lucha contra esta nefasta epidemia continúa basándose en consistentes criterios epidemiológicos: la fuente de infección que es casi exclusiva de personas y puede identificarse con facilidad mediante el examen directo de esputos; la propagación puede reducirse si se buscan activamente los casos contagiosos y se les trata correctamente; se controlará la aparición de cepas MDR con la aplicación de un régimen de tratamiento basado en una adecuada prescripción de medicamentos, una supervisión estrecha por parte del personal de salud, el control directo de la toma de los medicamentos y el control de los resultados del tratamiento mediante exámenes bacteriológicos (estrategia DOTS, siglas en inglés); y por último, la transmisión del bacilo se tornará difícil si se realiza un adecuado control de la fuente de infección (Enarson et al., 2000). El control de la enfermedad requiere por otro lado, de una tecnología eficaz, barata, sencilla y en gran parte estandarizada, así como personal de gestión capacitado para aplicarla en gran escala en cada institución (OMS, 1996).

Actualmente la OMS plantea que si se realiza un correcto tratamiento de los casos nuevos con baciloscopía positiva, utilizando la estrategia DOTS, se puede alcanzar un 85% (o más) de curación del total de casos tratados; por el contrario, cuando se producen fallos en el tratamiento disminuye la efectividad de las drogas utilizadas, pudiendo llevar a la cronicidad, fracaso, recaída e incluso muerte de los pacientes (WHO, 1991).

Para prevenir la ocurrencia de brotes de tuberculosis por circunstancias similares a las señaladas anteriormente, es esencial, que en las instituciones cerradas se implementen de forma rápida y completa los lineamientos generales para el control de esta enfermedad potencialmente fatal (CDC, 1995).

La dimensión del problema es tal, que los departamentos de salud pública tienen que asumir de manera inaplazable la responsabilidad de prevenirla y controlarla, pues las fallas al enfrentar los objetivos centrales de un programa pueden llevar a disminuir su efectividad en el control de este emergente riesgo de la salud pública (CDC, 1995).

2.7.6. Limitaciones del RFLP-IS6110.

Una de las mayores limitaciones del sistema basado en RFLP es que requiere de un abundante crecimiento del cultivo para la obtención de ADN suficiente (Otal et al., 1997; Suffys et al., 1997). Esto se dificulta en las micobacterias porque la mayoría de los integrantes de este género se caracterizan por poseer un ritmo lento de crecimiento; además, los pasos inherentes a este método requieren como mínimo tres días, debido a la laboriosidad de cada uno de ellos, lo que hace la técnica moderadamente cara (Hayward, 1995; Suffys et al., 1997).

Otra limitación importante es el hecho de que existen cepas de *M. tuberculosis* (sobre todo en Etiopía y la India) que poseen pocas copias (o ninguna) del elemento IS6110 en su genoma (Hermans et al., 1995; van Soolingen y Hermans, 1995). Esto traería como consecuencia que dichas cepas no podrían ser tipificadas por medio de la técnica RFLP-IS6110 (van Soolingen y Hermans, 1995).

2.8. Técnicas moleculares alternativas al RFLP-IS6110.

Producto de las limitaciones del RFLP diferentes grupos de investigadores trabajan en el desarrollo de nuevos métodos que permitan eliminar o al menos reducir sus dificultades. Estos pueden acortar el tiempo desde varias semanas hasta un día e inclusive horas (Cousins et al., 1992), debido a que muchos no dependen de crecimiento micobacteriano y se basan en métodos de amplificación de ADN o de Reacción en Cadena de la Polimerasa (o PCR, siglas en inglés); pudiendo caracterizar las cepas de *M. tuberculosis* directamente de muestras clínicas por la necesidad de cantidades mínimas de ADN y sin requerir purificación previa. De modo que son más rápidos, simples y fáciles de realizar con un costo similar al RFLP (Goyal et al., 1997; Haas et al., 1993; Patel et al., 1996; Samper et al., 1997).

Uno de estos métodos es la **PCR inversa de IS6110**, en el cual se emplea un juego de cebadores exteriores al IS6110 y se amplifican entonces las secuencias aledañas a los IS6110 (Samper et al., 1997). Este sistema es muy sencillo y fácil de realizar pero tiene como desventajas a poca reproducibilidad, la baja especificidad y el escaso número de bandas obtenidas (Kremer et al., 1999).

Otro método también basado en la PCR es el “**ampliprinting-IS6110**”, que utiliza cebadores homólogos a la secuencia de inserción MPTR y una secuencia de amplificación adicional con el IS6110. Este sistema también puede realizarse a partir de muestras clínicas pero debido a la limitación en el número y tamaño de los fragmentos generados por la PCR, la información obtenida entre cepas relacionadas es menor en comparación con el RFLP-IS6110 (Plikaytis et al., 1993; Suffys et al., 1997). También se ha comprobado que es un método poco reproducible (Kremer et al., 1999).

Otra de las técnicas utilizadas es la PCR con doble elemento repetitivo (**PCR-DER** o DRE-PCR, en inglés), que esta basada en la amplificación de las secuencias IS6110 y PGRS generando bandas polimórficas debido a las diferencias de distancia entre dichos elementos (Friedman et al., 1995). A pesar de que es un método de sencilla ejecución su poder de

discriminación es aceptable con relación al RFLP-IS6110, pero su baja reproducibilidad dificulta su aplicación en estudios epidemiológicos (Kremer et al., 1999).

Usando sistemas de amplificación de ADN con cebadores arbitrarios (**PCR-CA** o arbitrarily primer PCR, en inglés) se han podido demostrar patrones polimórficos entre cepas de *M. tuberculosis*. Con el fin de mejorar la reproducibilidad de estos métodos basados en amplificaciones arbitrarias (una de las dificultades fundamentales), se han usado varios juegos de cebadores lográndose así aceptables valores de reproducibilidad y poder de discriminación (Kremer et al, 1999).

Otro método descrito hace algunos años por Haas et al. (1993), es la llamada PCR con Ligador Mezclado (**PCR-LM** o “Mixed Linker PCR”, en inglés), que consiste en la utilización de un cebador homólogo a la secuencia IS6110 y un segundo cebador complementario a un ligador. Este método genera más bandas que incluso el método estandarizado (RFLP-IS6110). Su reproducibilidad y poder de discriminación es muy alto (100% y 90%, respectivamente) por lo que es una de las técnicas propuestas para realizar estudios epidemiológicos a gran escala. El examen de la **PCR-LM** en muestras clínicas se encuentra aún en fase de prueba (Burger et al., 1999; Suffys et al., 1997).

También tenemos el análisis del polimorfismo cromosomal de las secuencias repetitivas en tandem de número variable o **VNTR** (siglas en inglés de variable number of tandem repeats). El análisis de los productos amplificados por PCR de cinco loci de VNTR (del ETR-A al ETR-E) permiten clasificar a las cepas de *M. tuberculosis* en perfiles alélicos VNTR diferentes (Frothingham et al., 1998). La tipificación por VNTR o **VNTR typing** ha mostrado una buena reproducibilidad y un aceptable poder de discriminación (Kremer et al., 1999). Recientemente, ha aparecido una variante del **VNTR typing** y es la metodología **MIRU/VNTR typing**, que emplea también secuencias VNTR que aparecen en 12 loci diferentes que contienen unidades repetitivas interespaciadas de micobacterias (MIRU, siglas en inglés). Esta variante ha brindado una excelente reproducibilidad, sensibilidad y buen poder de discriminación (Supply et al, 2001).

Finalmente tenemos la tipificación con oligonucleótidos espaciadores o **Spoligotyping** (en inglés), que se basa en la amplificación de la región aledaña a los DR y una posterior hibridación diferencial de los productos amplificados con oligonucleótidos unidos a una membrana y que son complementarios a las regiones espaciadoras variables localizadas entre los DR (van Soolingen y Hermans, 1995; Suffys et al., 1997). Con esta técnica se simplifica la comparación visual y se logra una excelente reproducibilidad (100%), pero el poder de discriminación es menor que el del RFLP-IS6110 cuando son analizadas cepas con alto número de copias del elemento IS6110. En el caso de cepas con bajo número de copias de dicho elemento, la diferenciación entre las mismas se logra con excelentes resultados (Kamerbeek et al., 1997; Kremer et al., 1999).

En la tabla III del anexo 2 se presenta un cuadro comparativo de las principales técnicas moleculares de caracterización de cepas de *M. tuberculosis*, basadas en RFLP o PCR (Kremer et al., 1999; Supply et al., 2001).

Como se puede observar en la tabla antes mencionada los métodos de RFLP tuvieron un 100% de reproducibilidad, excepto cuando se utilizó la sonda (GTG)₅ que entonces disminuyó al 94%. En el caso de los métodos rápidos de amplificación, sólo la PCR-LM y el **MIRU/VNTR typing** fueron 100% reproducibles; mientras que el **VNTR typing** y el **Spoligotyping** mostraron valores de 97% y 94%, respectivamente. El resto de los sistemas de amplificación fueron poco o nada reproducibles, como el caso de la PCR inversa de IS6110 donde se obtuvo solamente un 6%.

Al analizar el poder de discriminación de los métodos basados en PCR, la PCR-LM y el **MIRU/VNTR typing** también mostraron elevados valores (90% y 87%, respectivamente) y muy cercanos al del RFLP-IS6110 (93%). Otros cuatro métodos (la PCR-CA, la PCR-DER, el **Spoligotyping**, y el **VNTR typing**) tuvieron valores algo inferiores al método de referencia. Los restantes dos métodos (la PCR inversa de IS6110 y el **ampliprinting-IS6110**) no pudieron ser evaluados debido a su escasa reproducibilidad.

En resumen, los métodos **PCR-LM**, **Spoligotyping** y **MIRU/VNTR typing** son los únicos recomendados para lograr una tipificación molecular altamente reproducible y con un aceptable poder de discriminación. Adicionalmente, el **Spoligotyping** y el **MIRU/VNTR typing** tienen la ventaja de que sus resultados pueden ser completamente expresados en un formato simple, digital (Kremer et al., 1999; Supply et al., 2001).

Por otra parte, cuando se necesiten realizar estudios de epidemiología molecular con una elevada resolución se recomienda entonces utilizar sólo las técnicas de RFLP-IS6110 y la **PCR-LM** debido a su elevado poder de discriminación, especialmente en cepas de mediano y alto número de copias (Kremer et al., 1999).

En los últimos tres años han aparecido más de una veintena de artículos científicos donde aplican las metodologías de **Spoligotyping** y **(MIRU/VNTR) VNTR typing** a estudios epidemiológicos de tuberculosis. A pesar de que los resultados obtenidos con estas técnicas demuestran un poder de discriminación inferior que el RFLP-IS6110, su sencillez, rapidez y fácil interpretación favorecen su futura aplicación (Chan et al., 2001; Dorouchi et al., 2001; Sola et al., 2001; Supply et al., 2001).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó fundamentalmente en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis y Mycobacteria (LNRITM), Centro Colaborador OPS/OMS, del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK). También se completaron algunos estudios en la Unidad de Referencia de *Mycobacterium* (LIS) del Instituto Nacional de Salud Pública y el Ambiente (RIVM) de Holanda, bajo la dirección del Dr. Dick van Soolingen.

3.1. Cepas utilizadas.

3.1.1. Cepas de referencia.

Se emplearon en este trabajo las cepas de referencia *Mycobacterium tuberculosis* Mt14323 y *M. bovis* BCG P3 para realizar la técnica del análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) y las cepas *M. tuberculosis* H₃₇Rv y *M. bovis* BCG P3 para la ejecución del Spoligotyping.

Estas cepas integran la colección de micobacterias del LNRITM. Las cepas de esta colección son mantenidas en tubos de 1.5 mL con agua destilada estéril y guardadas en congelación a -70°C , según se recomienda internacionalmente (Kent y Kubica, 1985).

3.1.2. Cepas estudiadas.

En el presente trabajo se utilizaron 251 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* llegadas al LNRITM, procedentes de los Laboratorios Provinciales, para su identificación como especie y la realización de las pruebas de susceptibilidad a las drogas antibacilares. Los datos microbiológicos de estas cepas fueron obtenidos de la base de datos del LNRITM.

A continuación se detallan los grupos de cepas empleadas en cada estudio realizado.

3.1.2.1. Estudio molecular de transmisión de la tuberculosis en Cuba.

Se estudiaron 160 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de muestras de esputo de pacientes procedentes de diferentes laboratorios de todas las provincias de Cuba (excepto Ciudad de La Habana) y que fueron diagnosticados entre julio de 1994 y junio de 1995. Estos pacientes representaron el 37% del total de casos con cultivos positivos en este periodo.

3.1.2.2. Estudio molecular de transmisión de la tuberculosis en Ciudad de La Habana.

Las 51 cepas de *M. tuberculosis* analizadas en este estudio fueron aisladas de sintomáticos respiratorios que fueron diagnosticados con tuberculosis pulmonar entre el 20 de septiembre de 1997 y el 10 de marzo de 1998 en diferentes Laboratorios Municipales de Ciudad de La Habana y en el Laboratorio Provincial de Tuberculosis en el Centro Provincial de Higiene Epidemiología de Ciudad de La Habana (CPHE-CH). Estos casos constituyeron el 55% del total de pacientes con cultivos positivos en el período analizado.

3.1.2.3. Estudio molecular de transmisión de tuberculosis entre personas seronegativas y seropositivas al VIH.

Se analizaron 25 cepas de *M. tuberculosis* aisladas de personas seropositivas al VIH (o trabajadores de salud VIH negativos) con tuberculosis procedentes del Sanatorio Santiago de Las Vegas (SSV) o de otros sanatorios del país que ingresaron en el Hospital del Instituto Pedro Kourí (IPK) y diagnosticados bacteriológicamente entre julio de 1993 y junio de 1995 en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis y Mycobacteria del IPK (LNRITBM-IPK).

3.1.2.4. Estudio molecular de transmisión de tuberculosis en el Hospital Psiquiátrico de La Habana (HPH).

Se incluyeron en el trabajo 15 cepas de *M. tuberculosis* aisladas de muestras de esputo de pacientes con enfermedades mentales (o trabajadores) del HPH diagnosticados con tuberculosis en el Laboratorio de Microbiología del HPH entre marzo de 1995 y marzo de 1998.

3.1.2.5. Caracterización molecular de cepas de *M. tuberculosis* por RFLP-IS6110 y Spoligotyping.

En este trabajo se utilizaron 157 de las 160 cepas de *M. tuberculosis* empleadas en el estudio referido en el sub-acápite 3.1.2.1.

3.2. Datos clínico-epidemiológicos.

Se recogieron diversos datos clínico-epidemiológicos de los pacientes a partir de las encuestas para la vigilancia de la resistencia y la investigación de contactos. También se obtuvieron datos del sistema nacional de información de la Dirección Nacional de Estadísticas y de los registros de tuberculosis de la Dirección Nacional de Epidemiología, ambas pertenecientes al Ministerio de Salud Pública de Cuba. Los datos más importantes fueron: edad, sexo, origen geográfico, serología al VIH, fecha de diagnóstico, codificación del examen directo y el cultivo, tratamiento previo y contacto con pacientes tuberculosos.

3.3. Análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción con la sonda IS6110 (RFLP-IS6110).

Esta técnica se realizó de acuerdo a un protocolo de referencia internacional (van Embden et al., 1993; van Soolingen et al., 2002) (ver anexo 1). El ADN fue extraído y purificado utilizando enzimas (lisozima y proteinasa K), detergentes (duocilsulfato de sodio y bromuro de cetiltrimetilamonio), solventes orgánicos (cloroformo, alcohol isoamílico y propanol) y tratamiento mecánico por vórtex.

Al ADN resultante se le determinó su concentración y pureza por espectrofotometría. La integridad del ADN fue analizada por electroforesis en geles de agarosa.

El material genético fue fraccionado con la enzima de restricción Pvu II. Los fragmentos digeridos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% con solución

reguladora Tris-borato-EDTA y transferidos al vacío a una membrana Hybond N+ (Amersham, Inglaterra).

El ADN inmovilizado fue hibridado con una sonda de 245 pares de bases (pb) del elemento de inserción IS6110. La sonda de ADN fue previamente elaborada utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés) y unos cebadores específicos (INS-1 e INS-2).

El fragmento amplificado fue purificado a través de una columna Magic Prep PCR (Promega, EE.UU.) y unido a la enzima peroxidasa empleando el sistema quimioluminescente ECLtm (Amersham). La hibridación se realizó en un horno de hibridación (Amersham) durante toda la noche. La reacción enzimática de la peroxidasa se desarrolló según el protocolo del fabricante. Las membranas fueron finalmente expuestas a filmes de rayos X de alta sensibilidad y bajo fondo (Filmes ECL, Amersham) por varios minutos (10-30 minutos).

Para facilitar el análisis computarizado de los patrones de RFLP, se utilizó un marcador interno en cada línea (mezcla de ADN PhiX174 digerido con Hae III y DNA ladder digerido con la enzima Pvu II) y marcadores externos en los pocillos exteriores de cada gel (ADN de las cepas de referencia *M. tuberculosis* Mt14323 y *M. bovis* BCG P3 digeridos con Pvu II).

3.4. Spoligotyping.

Se ejecutó según la metodología establecida por Kamerbeek et al. (1997) y Kremer et al. (2002) (ver anexo 1).

Se amplificó por PCR la región externa a las secuencias Repetitivas Directas (DR, siglas en inglés) empleando los cebadores DRa y DRb (biotilado) derivados de esta región DR y un ciclaje específico.

El producto amplificado fue desnaturalizado e hibridado contra una membrana Byodyne C (Pall Biosupport, EEUU) utilizando un equipo Miniblotter MN 45 (Immunonetics, EE.UU.). La membrana tenía fijado covalentemente un grupo de 43 oligonucleótidos, derivados de la región espaciadora de las DR de las cepas *M. bovis* P3 y *M. tuberculosis* H37Rv.

Posteriormente se enfrentó la membrana hibridada a un conjugado de Estreptavidina-Peroxidasa (con elevada afinidad por la biotina) y luego se realizó una reacción quimioluminescente con el sistema ECL (Amersham), similar a como se explicó en la técnica anterior.

En cada membrana se utilizaron como controles positivos ADN de las cepas *M. bovis* P3 y *M. tuberculosis* H37Rv.

3.5. Visualización y análisis de los patrones genéticos.

3.5.1. Análisis visual.

Los patrones obtenidos por RFLP-IS6110 y Spoligotyping fueron comparados visualmente. Cepas con iguales patrones fueron agrupadas en clusters (también llamados agrupamientos o conglomerados, en el texto).

3.5.2. Análisis computarizado.

Los resultados de los filmes de rayos X de los estudios mencionados en los sub-acápites 3.1.2.1 y 3.1.2.5 fueron transferidos a una computadora utilizando un digitalizador HP Scanjet IICx/T (Hewlett Packard, EE.UU.) y almacenados en una base de datos.

Los patrones fueron analizados con un programa computarizado Gelcompar (ver. 4.0, Applied Maths, Bélgica) y comparados por el método de agrupamiento UPGMA utilizando

el coeficiente de Dice siguiendo las instrucciones del fabricante (van Soolingen et al., 1995).

3.5.3. Comparación con base de datos de patrones de RFLP-IS6110.

Los patrones de las cepas del estudio referido en la sección 3.1.2.1 fueron comparados con una base de datos internacional, de más de 6 000 patrones (en 1997) de RFLP-IS6110, establecida en el Instituto Nacional de Salud Pública y el Ambiente de Holanda.

Las cepas del estudio mencionado en el sub-acápite 3.1.2.2 fueron comparadas con una colección (existente en el LNRTBM) de 284 patrones de restricción de cepas de *M. tuberculosis* aisladas de varias regiones de Cuba entre 1993 y 1997.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde que a principios de la década pasada fue desarrollado el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) para la tipificación de *Mycobacterium tuberculosis*, decenas de investigadores han empleado esta metodología en diversos estudios clínico-epidemiológicos, taxonómicos y genético-moleculares (Behr y Small, 1997; Braden et al., 1997^c; Drobniewski y Pozniak, 1996; Dunlap, 2000; Hayward, 1995; Onorato, 2000; Suffys et al., 1997; van Soolingen, 2001). Las ventajas del RFLP como son: alta especificidad, elevado poder discriminatorio, buena repetibilidad y reproducibilidad, han permitido que en los últimos tiempos sea la herramienta de laboratorio más utilizada en la caracterización molecular de cepas de *M. tuberculosis* y en el campo de la epidemiología.

4.1. Estudio molecular de transmisión de la tuberculosis en Cuba.

4.1.1. Número de copias del elemento de inserción IS6110.

El número de copias de IS6110 osciló entre 0 y 20, con un promedio de 12 (ver ejemplos en Fig. 1 y 2). Este promedio fue mucho mayor que el obtenido por otros investigadores en diversas áreas geográficas como son: la India, el Sudeste Asiático y Holanda (Das et al., 1993; van Soolingen et al., 1991; 1995; 1999; Yuen et al., 1993).

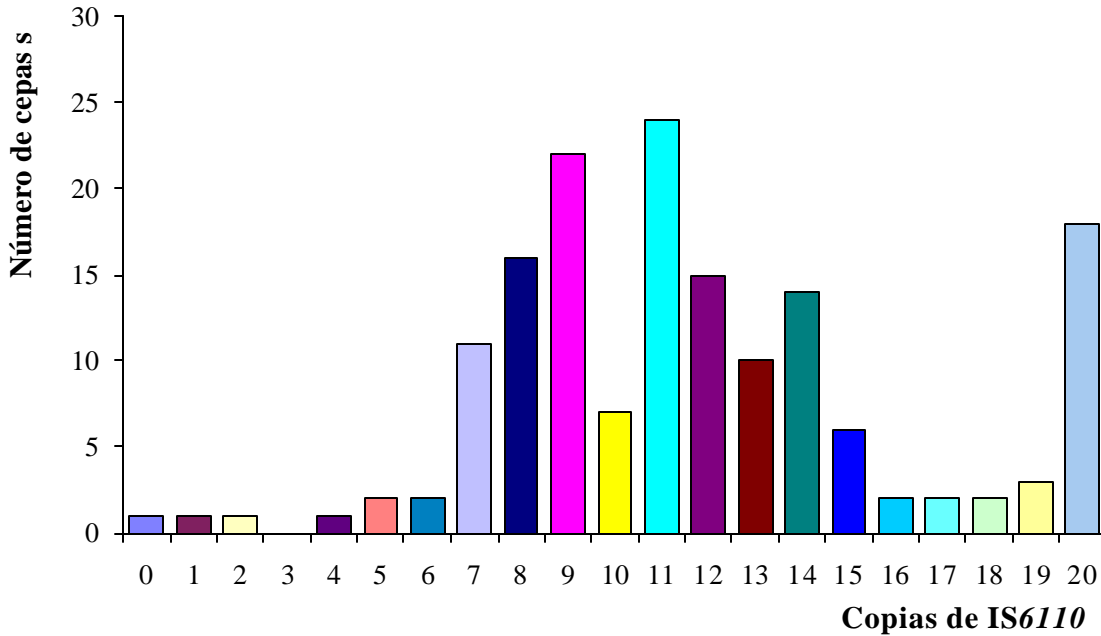


Figura 1- Número de copias de IS6110 de las 160 cepas de *M. tuberculosis* aisladas en Cuba en 1994-1995.

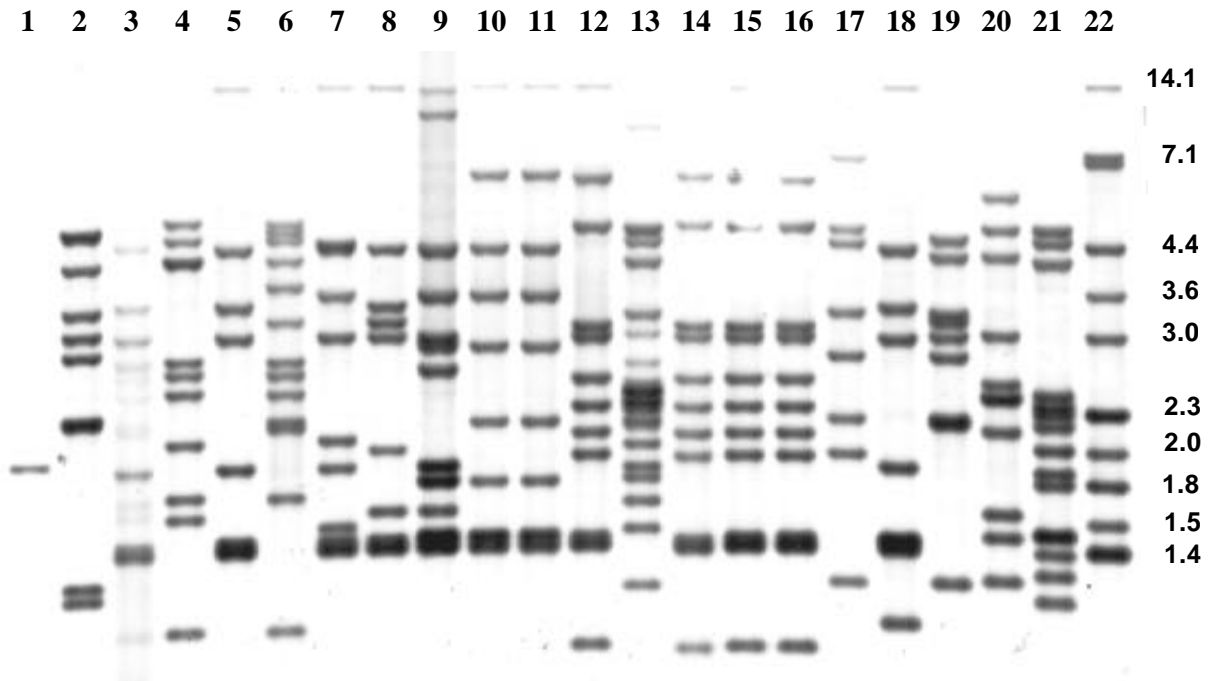


Figura 2 – Patrones de RFLP-IS6110 representativos de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en Cuba en 1994-1995.

Líneas 1 y 22 contienen ADN de las cepas de referencias *M. bovis* BCG P3 y *M. tuberculosis* Mt14323, respectivamente. Líneas 10-11 y 14-16 representan el ADN de cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes que vivían en la provincia de Holguín y que fueron incluidos en los clusters 4 y 5, respectivamente. Los números de la derecha indican el tamaño, en pares de Kilobases, de los fragmentos de restricción de la cepa de referencia *M. tuberculosis* Mt14323.

Se encontró una cepa que presentaba sólo una copia en su cromosoma. También hallamos otra cepa que no tenía *IS6110*. En este último caso, ante la duda de que estuviéramos en presencia de una micobacteria que no integrara el complejo *M. tuberculosis*, se le realizaron pruebas bioquímicas y moleculares (ensayo *Accu-Probe* test, Gen-Probe, EE.UU., y Spoligotyping) adicionales. Este peculiar aislamiento de *M. tuberculosis* mostró, además, una resistencia inusual frente a la rifampicina, isoniacida y etambutol.

El elevado número de copias de las cepas aisladas en Cuba nos permitió distinguir la inmensa mayoría de ellas sin la necesidad de utilizar marcadores genéticos adicionales, como las secuencias repetitivas PGRS, DR y (GTG)₅ (Chaves et al., 1997; Yuen et al., 1993).

4.1.2. Agrupamientos sobre la base de los patrones de RFLP-IS6110.

Entre las 160 cepas analizadas, se encontraron 84 patrones de RFLP-*IS6110* únicos (52%) y 19 compartidos por dos o más cepas (76 en total), que representó el 48% de agrupamiento. Algunos de los patrones de RFLP obtenidos son mostrados en la Figura 2.

En total, se encontraron 19 agrupamientos (o clusters). Los dos mayores agruparon a 18 y 10 cepas, respectivamente, mientras que la mayoría estuvo conformado por dos o tres cepas solamente (ver tabla 1).

Tabla 1- Agrupamiento en base al RFLP-IS6110, resistencia y distribución geográfica de las 160 cepas de *M. tuberculosis* aisladas en Cuba de julio de 1994 a junio de 1995.

Cluster	Patrón de RFLP-IS6110 ^a	No.de cepas	Resistencia (No. de cepas) ^b	Origen Geográfico (No. de cepas) ^c
1	83	18	S (9), S-R (2)	A(16), B(1), C(1)
2	35	10		D
3	1	7	S(2)	A(1), E(2), F(2), G(2)
4	21	5		H
5	12	5	S(1)	F(1), G(2), H(2)
6	41	3		I
7	69	3		J(2), K(1)
8	91	3		G
9	3	2		I, K
10	5	2		B
11	13	2		E
12	15	2	S-R-H (1), S(1)	A, F
13	23	2		L
14	26	2		M
15	34	2		K
16	39	2		H, I
17	64	2		M
18	73	2		J
19	75	2		J
No en cluster	Unico	84	S(1), H(2), R-H-E (1)	---
Total	---	160	20	---

^a Algunos de los patrones de RFLP se muestran en la Figura 2.

^b S: estreptomycin, R: rifampicina, H: isoniacida, E: etambutol.

^c A: Villa Clara, B: Ciego de Avila, C: Matanzas, D: Camagüey, E: Pinar del Río, F: Las Tunas, G: La Habana, H: Holguín, I: Cienfuegos, J: Santiago de Cuba, K: Granma, L: Guantánamo, M: Isla de la Juventud.

En algunos países, como la India y Etiopía, se ha encontrado que el RFLP-IS6110 tiene una utilidad limitada debido a la presencia de pocos patrones de RFLP-IS6110 en un gran número de cepas (Das et al., 1993; Hermans et al., 1995). En Cuba por el contrario, se observó una gran diversidad de patrones de RFLP-IS6110 y los dos patrones más frecuentes estuvieron relacionados a brotes, según se pudo confirmar en la investigación de contactos.

El elevado porcentaje de agrupamiento hallado en este trabajo (48%) es comparable con los valores reportados en otros lugares como: San Francisco (Small et al., 1994), Nueva York (Alland et al., 1994), Dinamarca (Yang et al., 1995) y Holanda (van Soolingen et al., 1999), en donde se encontró un rango de 35-47% de agrupamiento. Estos elevados porcentajes de agrupamiento sugirieron, que al parecer, la infección reciente era mucho mayor que lo clásicamente supuesto (10%) por los métodos epidemiológicos convencionales en años atrás (Rieder, 1999).

En otras áreas de baja incidencia como Noruega y Suiza se han registrado bajos porcentajes de cepas agrupadas (16 y 17.5%, respectivamente) reflejando así que la influencia de transmisión reciente de la tuberculosis podría jugar un papel menor en estos países debido, quizás, a la existencia de programas de control más eficientes (Heldal et al., 2000; Pfyffer et al., 1998). Así, se demuestra que los estudios de epidemiología molecular, empleando el RFLP-IS6110, pueden servir como una herramienta auxiliar para ayudar a monitorear el funcionamiento de los programas de control de tuberculosis (Burgos y Pym, 2002; Small y van Embden, 1994).

El valor de agrupamiento encontrado en nuestro estudio debe estar subestimado, porque el tiempo de estudio de nuestra investigación fue de un año y sólo se analizó por RFLP la tercera parte de los aislamientos posibles. Estudios analizando la influencia de estos dos factores en el porcentaje de agrupamiento de las cepas analizadas han corroborado esta afirmación (Glynn et al., 1999; Murray, 2002; van Soolingen et al., 1999). Recientemente, Murray (2002) empleó un modelo matemático de simulación para evaluar los cálculos realizados anteriormente, basados en el porcentaje de agrupamiento de las cepas analizadas, y medir así la influencia de la transmisión reciente de la tuberculosis en instituciones cerradas y en la comunidad. Tomando como ejemplo algunos de los principales estudios de

epidemiología molecular realizados, se pudo apreciar que el valor real del agrupamiento estaba siempre subestimado cuando no se analizaba el 100% de las cepas aisladas en una región determinada (Murray, 2002). También, varios autores han señalado la necesidad de extender el tiempo de estudio a no menos de 3 años para tratar de estudiar la inmensa mayoría de los casos que han desarrollado la tuberculosis a partir de una infección reciente (Burgos y Pim, 2002; Diel et al., 2002; Glynn et al., 1999; Murray, 2002; van Soolingen et al., 1999; Vynnycky et al., 2001; Yang, 2003).

Otra limitación del estudio es la no-inclusión de cepas de Ciudad de La Habana. Esta provincia tradicionalmente aporta un tercio del total de casos de tuberculosis (y de las cepas aisladas en todo el país) y funciona como “un puente” conectando a personas de todas las provincias facilitando así la transmisión de cepas de *M. tuberculosis*. Esta exclusión debe haber subestimado apreciablemente el agrupamiento.

El porcentaje total de agrupamiento (48%) se vio influido por dos grandes brotes ocurridos en instituciones cerradas. Si las cepas aisladas en estos brotes (28 en total) no se tomaran en cuenta en este estudio, el agrupamiento disminuiría de 48 a 36%.

4.1.3. Distribución geográfica de las cepas agrupadas.

La mayoría de los agrupamientos (68%) fue encontrada entre cepas de pacientes procedentes de la misma provincia, sugiriendo que la transmisión reciente debió haber ocurrido en determinadas áreas geográficas (Tabla 1). Sin embargo, en seis de los 19 clusters no ocurrió así y las posibles relaciones epidemiológicas entre los casos no pudieron ser establecidas. En la Figura 3 se puede observar las áreas geográficas de Cuba adonde pertenecían las cepas de los tres agrupamientos más grandes de este estudio (Clusters 1, 2 y 3).

4.1.4. Agrupamientos entre las cepas resistentes a drogas.

De las 160 cepas estudiadas, 20 (12.5%) fueron resistentes a una o más drogas. De estas 20, 14 fueron resistentes sólo a estreptomicina (S), dos a isoniacida (H), dos a estreptomicina y rifampicina (S-R) y otras dos mostraron resistencia a tres drogas, uno a SRH y otro a

rifampicina, isoniacida y etambutol (RHE) (Tabla 1). La mayoría de las cepas resistentes (11 de 20) se encontraron en el agrupamiento más grande (Cluster 1).

Tres de las 20 cepas resistentes fueron aisladas de pacientes que habían recibido tratamiento antituberculoso anterior y dos de estas estuvieron agrupadas en el cluster 1. También se encontró que 13 cepas del total (65%) formaron parte de los agrupamientos. Doce de las 14 cepas S-resistentes se encontraron en tres agrupamientos, sugiriendo una posible transmisión activa de resistencia a estreptomicina.

El porcentaje global de resistencia a drogas de las cepas de estudio fue relativamente bajo (12.5%). Aquí se debe destacar que la mayoría de las cepas resistentes a estreptomicina fue aislada en la provincia de Villa Clara indicando entonces, que el fenómeno de resistencia a esta droga era (en este momento) un problema local y no nacional. Sin embargo, es importante señalar que tres cuartas partes de las cepas resistentes se encontraron en clusters (con otras cepas también resistentes), indicando que la transmisión de cepas resistentes (resistencia primaria), sobre todo a estreptomicina, ocurrió en ese periodo.

El conglomerado mayor, que contenía a 18 cepas de las cuales el 61% era resistente a una o más drogas, se asoció a un evento de transmisión ocurrido en una institución cerrada. Esto corrobora que las condiciones en que se encuentran estos centros favorecen el desarrollo y transmisión de la tuberculosis resistente a drogas (Beck-Sagué et al., 1992; Valway et al., 1994^a).

4.1.5. Investigación de los tres agrupamientos más grandes.

Cluster 1: Este agrupamiento, con 18 cepas, estuvo relacionado con un brote ocurrido entre personas que vivían (o trabajaban) en una institución cerrada de la provincia de Villa Clara. Once de estas cepas (61%) fueron resistentes a S y a S-R. Diez de las 18 cepas fueron aisladas de personas que vivieron en dicha institución. Las restantes seis cepas (incluyendo tres resistentes a estreptomicina) fueron aisladas de pacientes que no tuvieron relación epidemiológica aparente con el resto de los casos.

Cluster 2: Este fue el segundo cluster más grande y contuvo a 10 cepas aisladas de hombres jóvenes (24 años, como promedio), seis de los diez vivían en una institución cerrada de la provincia de Camagüey. Las restantes cuatro cepas fueron aisladas de pacientes no relacionados con dicha instalación.

Cluster 3: Este agrupamiento estuvo integrado por siete cepas aisladas de personas, entre las cuales no se pudo encontrar ninguna relación epidemiológica (figura 3).

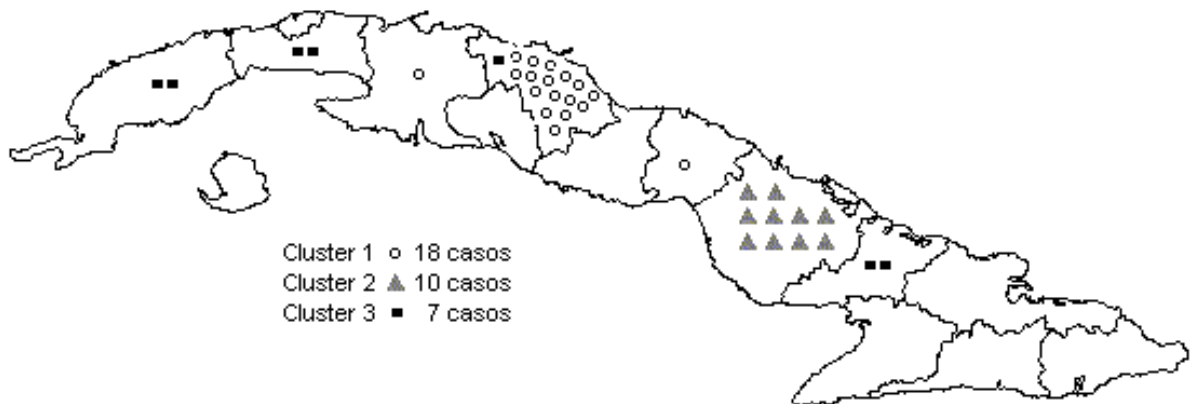


Figura 3 – Mapa de Cuba mostrando las provincias en donde se encontraron los casos de los tres agrupamientos más grandes.

4.1.6. Ocurrencia de cepas con el “genotipo Beijing” en Cuba.

La tipificación por RFLP-IS6110 brindó la posibilidad de investigar la estructura de la población de las familias de los genotipos de *M. tuberculosis* aislados en un área dada. En Cuba se observó un elevado polimorfismo entre los patrones de restricción, lo que refleja la influencia de casos de tuberculosis entre poblaciones de descendientes de antiguos inmigrantes. La comparación de los patrones de RFLP-IS6110 de las 160 cepas cubanas con la Base de Datos Internacional de Patrones de restricción (con más de 7 000 patrones de RFLP de cepas aisladas en diversas áreas geográficas de todos los continentes) mostró que 23 cepas (14%) tenían más del 80 % de similitud con la familia del “genotipo Beijing” descrita anteriormente (van Soolingen et al., 1995). Esta familia de cepas es una de las más predominantes en una gran parte de Asia, pero también se ha encontrado en diversas áreas geográficas de otros continentes (Bifani et al., 2002; Burgos y Pym, 2002; Glynn et al., 2002;

van Soolingen et al., 2001). Por ejemplo, en varias áreas de China se ha encontrado este patrón genético en el 92% de las cepas estudiadas (Qian et al., 1999; Park et al., 2000; van Soolingen et al., 1995). Sin embargo, en otros lugares asiáticos como: Corea, Hong Kong, Indonesia, Malasia, Tailandia y Vietnam este genotipo se ha encontrado entre el 24 y el 72% de las cepas estudiadas (Anh et al., 2000; Chan et al., 2001; Dale et al., 1999; Palittapongarnpim et al., 1997; Prodinger et al., 2001; van Crevel et al., 2001). En otras regiones del mundo el hallazgo de este “genotipo Beijing” ha sido menor, reportándose frecuencias de aparición entre 1-10% en Latinoamérica (Laserson et al., 2000; Sola et al., 1999), de 3-29% en Europa (Caminero et al., 2001; Krunner et al., 2001; Niemann et al., 1997; van Soolingen et al., 1995) y de 0.02-27% en Estados Unidos (Agerton et al., 1999; Barnes et al., 1997; Bifani et al., 1996; 1999; Soini et al., 2000; Yang et al., 1998).

En nuestro estudio, las cepas del cluster mayor (Cluster 1) fueron también del tipo “Beijing”. Este agrupamiento estuvo relacionado con el brote ocurrido en una institución cerrada de Villa Clara, como ya se dijo anteriormente, donde 11 de las 18 cepas analizadas eran resistentes a una o más drogas. Coincidentemente, la llamada cepa ‘W’, encontrada en muchos casos con resistencia a múltiples drogas en Nueva York, también muestra el genotipo Beijing (Bifani et al., 1996; 2002). Se conoce que la inmigración china a Cuba comenzó en la segunda mitad del siglo XIX y en unas décadas después arribaron a nuestras tierras cientos de miles de personas de esa región. Esto pudiera quizás explicar la presencia en nuestro país de cepas con el genotipo Beijing.

4.2. Estudio molecular de transmisión de la tuberculosis en Ciudad de La Habana.

4.2.1. Número de copias del elemento de inserción IS6110.

El número de copias de IS6110 entre las 51 cepas estudiadas estuvo entre 6 y 20 con un promedio de 10 (± 4) (Fig. 4). Este elevado número de copias en cepas aisladas en Cuba fue anteriormente descrito en el sub-acápite anterior. En este caso no se encontró ninguna cepa con menos de seis copias de este elemento repetitivo y esto nos permitió diferenciar la totalidad de los aislamientos sin el empleo de marcadores genéticos adicionales.

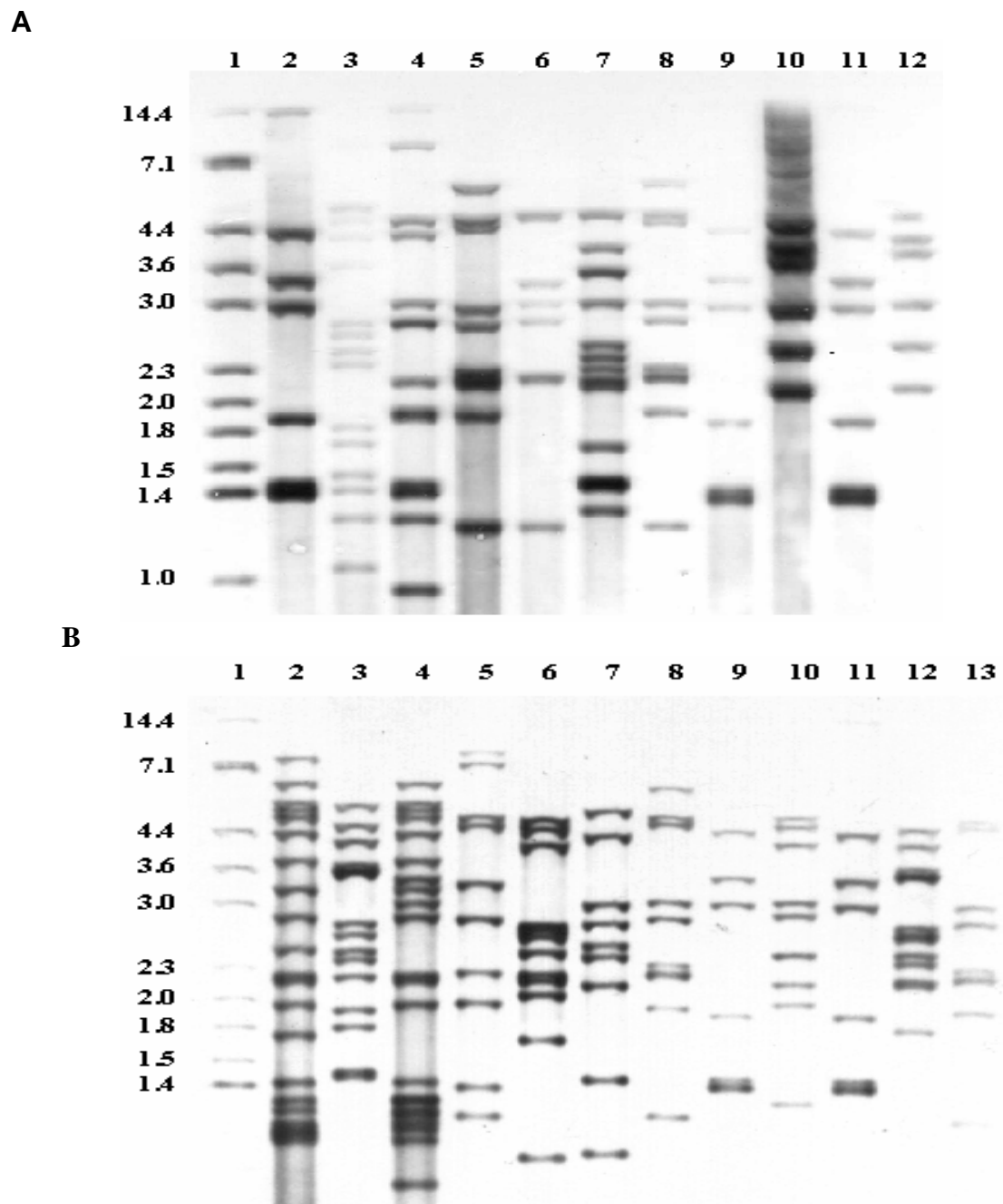


Figura 4- Patrones de RFLP-IS6110 de 23 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de diferentes áreas de Ciudad de La Habana.

A: línea 1, representa la cepa de referencia *M. tuberculosis* Mt 14323 (en ambos paneles), líneas 2-12, pacientes 6 (cluster 3), 24, 26, 14 (cluster 5), 32, 34, 15 (cluster 5), 7 (cluster 3), 12 (cluster 4), 8 (cluster 3) y 36.

B: líneas 2-13, pacientes 38, 39, 23 (cluster 7), 40, 42, 43, (cluster 5), 10 (cluster 3), 44, 11 (cluster 3), 45 y 18 (cluster 5).

Los números de la izquierda indican la talla de los fragmentos de restricción de la cepa de referencia en pares de kilobases (Kb).

El hecho de que ninguna cepa tuviera menos de seis copias de *IS6110*, confirmó el elevado porcentaje de cepas aisladas en Cuba que tienen más de cinco copias, como se describió previamente (sub-acápite 4.1). Hasta el momento de este estudio, se habían tipificado en Cuba por RFLP-*IS6110* 359 cepas de *M. tuberculosis*, y sólo 15 de ellas (4,1%) habían mostrado menos de seis copias de este elemento IS en su genoma (Datos del LNRITBM, 2001). Además, el análisis del número de copias de *IS6110* en cepas aisladas en Ciudad de La Habana refuerza aún más esta observación, ya que sólo se había encontrado una cepa (0.8%), de 128 estudiadas, con un bajo número de copias. El alto porcentaje de cepas conteniendo un elevado número de copias de *IS6110* en Ciudad de La Habana es mayor que el reportado en otros estudios para cepas de origen norteamericano y europeo como en: San Francisco (Small et al., 1994), Nueva York (Alland et al., 1994), París (Gutiérrez et al., 1998), Zaragoza (Samper et al., 1998) y Londres (Maguire et al., 2002). Además, es muchísimo más alto que lo encontrado en la India, Etiopía, Vietnam, Madagascar, Tailandia y Malasia, donde es más frecuente encontrar cepas con pocos *IS6110* en su cromosoma (Dale et al., 1999; Das et al., 1993; Hermans et al., 1995; Palittapongarnpim et al., 1997; Rasoloforazanamparany et al., 2001; Yuen et al., 1993).

Nuestros hallazgos también refuerzan la hipótesis planteada por otros investigadores (Samper et al., 1998; van Soolingen et al., 1995; Yang et al., 1995) de que ciertos genotipos de *M. tuberculosis* se pueden asociar con mayor frecuencia a una determinada área geográfica.

4.2.2. Agrupamientos sobre la base del RFLP-*IS6110*.

Entre las 51 cepas estudiadas se observaron 35 patrones de RFLP diferentes, siete de estos fueron compartidos por dos o más cepas y se observaron en 23 de ellas (cepas relacionadas). Estas cepas agrupadas abarcaron el 45% del total analizado y formaron siete clusters (de dos a seis pacientes cada uno) (Tabla 2). Los restantes 28 patrones se encontraron en cepas únicas. En la Figura 4 se observan algunos de los patrones genéticos encontrados en este estudio.

Tabla 2- Principales características de las cepas de Ciudad de La Habana del estudio.

No Cepa	Lugar de Procedencia	Fecha de Diagnóstico	Patrón de RFLP ^a
1	Guanabacoa	97/10/30	1
2	Playa	98/01/16	1
3	Institución B	97/11/28	2
4	Institución B	98/01/07	2
5	Institución B	98/03/10	2
6	Centro Habana ^b	97/10/03	3
7	Institución A	98/01/16	3
8	Institución A	97/10/08	3
9	Institución A	98/02/18	3
10	Institución A	98/01/15	3
11	Institución A	97/11/28	3
12	Institución A	97/09/19	4
13	Institución A	97/10/17	4
14	Cerro	97/09/10	5
15	Institución A	97/12/10	5
16	A. Naranjo ^b	97/12/04	5
17	Institución A	98/02/20	5
18	Centro Habana	98/03/19	5
19	Centro Habana	97/12/10	6
20	Centro Habana	97/11/15	6
21	Institución A ^c	97/12/12	7
22	Centro Habana ^c	98/01/16	7
23	San M. del Padrón	98/01/08	7
24	Diez de Octubre	97/10/03	Unico
25	Playa	97/11/13	Unico
26	Marianao	97/11/14	Unico
27	Arroyo Naranjo	97/09/23	Unico
28	Habana Vieja	97/10/21	Unico
29	Institución A	97/10/08	Unico
30	Playa	97/11/26	Unico
31	Guanabacoa	97/12/02	Unico
32	Guanabacoa	97/10/28	Unico
33	San M. del Padrón	97/11/11	Unico
34	Habana del Este	97/09/01	Unico
35	San M. del Padrón	97/10/14	Unico
36	Institución A	97/11/08	Unico
37	Arroyo Naranjo	97/09/25	Unico
38	Habana del Este	97/12/17	Unico
39	Guanabacoa	98/01/07	Unico
40	Guanabacoa	98/01/27	Unico
41	San M. del Padrón	97/12/19	Unico
42	Institución A	98/03/20	Unico
43	Cotorro	98/03/15	Unico
44	Arroyo Naranjo	98/02/11	Unico
45	Centro Habana	98/03/19	Unico
46	Habana Vieja	97/12/10	Unico
47	Habana Vieja	97/12/15	Unico
48	Habana del Este	98/03/15	Unico
49	Diez de Octubre	98/03/10	Unico
50	Cerro	98/02/26	Unico
51	Marianao	98/02/24	Unico

a: Patrón de RFLP-IS6110 de cada cepa. Los números representan los clusters, **b:** Cepa de paciente que residió anteriormente en la Institución A.
c: Cepa de paciente que residió anteriormente en la provincia de Villa Clara.

Al inicio de nuestra investigación pensamos encontrar un alto porcentaje de agrupamiento entre las cepas de Ciudad de La Habana debido a la alta densidad de la población en esta provincia (3 021 personas/ Km²) (Anuario Demográfico de Cuba, 1997), al hacinamiento en algunas áreas de la ciudad y al deterioro del Programa Provincial de Control de la tuberculosis en los años anteriores (que motivó un incremento del 300% de la incidencia en esta región). A diferencia de otros países como: Estados Unidos, Holanda, Francia y Dinamarca (Alland et al., 1994; Borgdorff et al., 1998; 2000; Gutiérrez et al., 1998; Small et al., 1994; Yang et al., 1995) en Cuba se reportan muy pocos casos “importados” de tuberculosis, y estos no se asocian con los agrupamientos (Datos del LNRITBM, 2001).

El hecho de que el 45% de las cepas de Ciudad de La Habana formara parte de los agrupamientos pudiera reflejar la existencia de transmisión reciente en esta provincia. Este porcentaje de agrupamiento es compatible con los resultados del estudio anterior (donde se encontró un 48% de agrupamiento) con cepas aisladas en diferentes provincias de Cuba. Sin embargo, en este trabajo tipificamos tres veces menos cepas que en el estudio discutido en el epígrafe anterior (4.1).

En otros estudios genético-poblacionales en áreas urbanas de países desarrollados (con baja o media incidencia de tuberculosis) como en: San Francisco (Small et al., 1994), Nueva York (Alland et al., 1994), París (Gutiérrez et al., 1998), Sevilla (Safi et al., 1997) y Amsterdam (van Deutekom et al., 1997), el porcentaje de cepas en agrupamiento fue de 35% a 47%.

Por otra parte, en países de alta incidencia en donde se esperaba una elevada proporción de cepas en conglomerados y una menor cuantía de cepas con RFLP únicos, los resultados han sido muy contradictorios y se han reportado porcentajes de agrupamiento entre 14-41% (Chevreil-Dellagi et al., 1993; Dale et al., 1999; Godfrey-Fausett et al., 1992; Gómez-Marín et al., 1995; Hermans et al., 1995; Yuen et al., 1993). Estos hallazgos fueron inesperados ya que los valores de agrupamiento en algunos casos son comparables o más bajos que los encontrados en países de baja incidencia de tuberculosis. Sin embargo, la mayoría de estos

estudios no reportaron la incidencia y en muchos casos es difícil conocer el porcentaje de las muestras que fueron analizadas con relación a las disponibles en la comunidad. Esto es sumamente importante porque el número de aislamientos “muestreados” en un estudio puede ser muy pequeño en proporción al número total de aislamientos circulantes (contribuyendo a la transmisión) en el área y entonces el valor encontrado puede ser groseramente subestimado (Burgos y Pym, 2002; Glynn et al., 1999; Murray, 2002).

En nuestro estudio el valor real del agrupamiento encontrado (45%) debe estar subestimado ya que sólo se analizó el 55% del total de cultivo positivos en Ciudad de La Habana durante un período de 6 meses. Este podría haber sido más alto, si el período de estudio se hubiera extendido a 3-5 años y se hubiera incluido la mayoría de las cepas aisladas en ese periodo, como han planteado varios autores (Burgos y Pim, 2002; Glynn et al., 1999; Murray, 2002; Vynnycky et al., 2001; Yang, 2003).

Por ejemplo, en Holanda se realiza un estudio de epidemiología molecular poblacional desde 1993 hasta la fecha. En este trabajo, el porcentaje de agrupamiento se incrementó de forma proporcional con el tiempo de estudio hasta llegar a los dos años. De aquí en adelante se alcanzó una meseta en la cual el porcentaje de agrupamiento quedó casi inalterado con respecto al tiempo (Glynn et al., 1999; van Soolingen et al., 1999).

En cambio, el porcentaje de agrupamiento encontrado en Ciudad de La Habana también podría estar sobrestimado ya que más del 50% de las cepas agrupadas estuvieron directamente relacionadas con dos instituciones cerradas. Esta correlación en Cuba entre el agrupamiento y dichas instalaciones fue mencionada anteriormente en el sub-acápite anterior (4.1), e indica que el porcentaje total de cepas en cluster en la comunidad está siendo afectado por cepas directamente relacionadas con brotes institucionales.

4.2.3. Investigación de los agrupamientos.

Cluster 1- Estuvo conformado por dos cepas. Las cepas 1 y 2 fueron aisladas de pacientes los cuales vivían en lugares distantes y ninguna conexión entre ellos pudo establecerse.

Cluster 2- Las cepas 3 y 5 estuvieron relacionadas con un brote grande ocurrido en un hospital psiquiátrico (Institución B) que será discutido en el sub-acápite 4.4. En este estudio se encontró una nueva cepa (cepa 4) aislada de una enfermera del hospital, que trabajaba en una de las salas involucradas en el brote durante ese periodo.

Clusters 3, 4 y 5 – Trece cepas (cepas 6-18) conformaron estos agrupamientos representando el 56% de las cepas relacionadas. Diez de ellas se asociaron a un brote ocurrido en otra institución cerrada (Institución A).

Inicialmente, las investigaciones de los contactos habían establecido que 15 de los pacientes analizados en este estudio vivían o habían vivido en esta Institución A. Aquí parecía que todos los casos habían estado relacionados con un brote de tuberculosis que se había desarrollado en la Unidad 3 de dicha instalación. Sin embargo, los resultados del RFLP-IS6110 definieron siete patrones en este grupo de 15 cepas.

El primer patrón (siete bandas) se observó en seis cepas, que formaron el cluster 3, de ellas cinco (incluyendo las cepas 9 y 10) fueron aisladas de pacientes que residieron en la misma Unidad (Unidad 3) por algunos meses y estos pacientes visitaban frecuentemente áreas comunes lo que les debe haber dado la posibilidad de ponerse en contacto. La otra cepa (No. 6) fue aislada de un paciente que a pesar de haber vivido en este lugar tres años atrás no se pudo encontrar ninguna relación epidemiológica directa con los anteriores casos.

Otras dos cepas, con el segundo patrón (12 copias de IS6110), se agruparon en el cluster 4. Las cepas 12 y 13 fueron aisladas de casos que vivieron en la misma habitación en la Unidad 1 por algunos meses hasta que fueron movidos a la Unidad 3 donde permanecieron muy poco tiempo antes del diagnóstico.

Otras cinco cepas tuvieron un patrón de RFLP de nueve bandas y conformaron el cluster 5. Los pacientes a los cuales se les aislaron las cepas 15 y 17 vivieron en la misma institución cerrada que el resto, pero ellos no pudieron ser conectados a los otros pacientes agrupados.

La cepa 16, cuyo paciente había permanecido en la institución hasta hace unos pocos años atrás, fue incluida también en este grupo; aunque no se pudo demostrar la conexión de este paciente con el resto. La cepa 18 fue obtenida del esputo de un paciente que vivía en un municipio distante de la institución y la única relación posible con los otros casos fue que vivió un tiempo en el mismo barrio del paciente de la cepa 15. La última cepa (cepa 14) de este cluster (5) fue aislada de un paciente sin relación epidemiológica aparente con el resto.

Los otros cuatro patrones se observaron en la cepa agrupada No. 21 (cluster 7) y las cepas no agrupadas 29, 35 y 41.

Cluster 6- Las cepas 19 y 20 formaron este agrupamiento. Los pacientes a los cuales se les aislaron estas cepas vivían en el mismo barrio y participaban en actividades sociales comunes.

Cluster 7- Las cepas 21, 22 y 23 mostraron un patrón de RFLP muy peculiar (*familia genotipo Beijing*), que ya fue mencionado en la sección 4.1 sobre la existencia en Cuba, y por van Soolingen et al. (1995) en cepas de otras regiones del mundo. Este patrón fue encontrado anteriormente en 18 cepas relacionadas con un brote ocurrido en una institución cerrada de la provincia de Villa Clara. Los pacientes de las cepas 21 y 22 habían residido anteriormente en esta provincia y uno de ellos estuvo también viviendo un tiempo en la mencionada institución. La cepa 23 tuvo el mismo patrón, pero el paciente del cual se obtuvo esta cepa no pudo ser relacionado con el resto de los casos.

El hecho de que más del 50% de las cepas agrupadas (y el 25% del total de los aislamientos analizados) estuvieran relacionados con brotes ocurridos en una sola institución (Institución A) refleja la situación de la tuberculosis en este lugar en el período analizado. Esta instalación debe ser continuamente monitoreada en el futuro para evitar así próximos brotes de tuberculosis en este lugar y la posible diseminación de estas cepas de *M. tuberculosis* a la comunidad.

4.2.4. Comparación de los patrones de RFLP-IS6110 de Ciudad de La Habana con la colección de patrones de restricción de Cuba.

Se compararon los 51 patrones de cepas de Ciudad de La Habana con una colección de patrones genéticos de diferentes provincias del país y archivados en el LNRITBM-IPK. Trece cepas del estudio compartieron tres patrones con las cepas de la colección.

Un patrón de 9 bandas (cluster 2) encontrado en este estudio en tres cepas, había sido observado anteriormente en cepas aisladas durante un brote ocurrido en la institución B (ver sección 4.4). Este patrón fue idéntico al registrado para cuatro cepas aisladas en 1994-1995 en tres provincias: Holguín, La Habana y Las Tunas, pero no se encontró relación epidemiológica entre los pacientes a los cuales se les aislaron estas cepas.

El segundo patrón (7 copias), que fue representativo del cluster 3 (relacionado con la Institución A), fue encontrado también en siete cepas de la colección nacional. Dos cepas de estas fueron aisladas en Ciudad de La Habana en 1994-1995. Otra cepa con este patrón fue hallada en un paciente anteriormente diagnosticado en una instalación similar a la Institución A y que había mantenido contacto anterior con personas de esta Institución. No se encontraron otros nexos epidemiológicos entre estos pacientes.

El último patrón de RFLP-IS6110 fue encontrado entre cuatro aislamientos de nuestro estudio (cluster 5) y tres cepas procedentes de las provincias La Habana y Ciudad de La Habana de 1994-1995; pero no se halló conexión epidemiológica para transmisión potencial entre los pacientes involucrados.

En general, se encontraron pocas similitudes entre las cepas del estudio y la base de datos nacional de patrones de RFLP-IS6110. Tales comparaciones podrían ser muy útiles en el futuro para ayudar a identificar posibles vías de transmisión en instituciones cerradas o en la comunidad. Recientemente, investigadores europeos han demostrado la utilidad de una Base de Datos Internacional (localizada en el Instituto Nacional de Salud Pública y el Ambiente (RIVM) de Holanda) para descubrir transmisión de la tuberculosis a través de las fronteras (Kiers et al., 1997; Samper et al., 1997).

De este estudio se puede concluir que, a pesar de tener dos limitaciones fundamentales, como son: el corto periodo de estudio (seis meses) y pocas cepas analizadas (la mitad de las posibles), se agrupó un número importante de cepas sugiriendo que la transmisión reciente de la enfermedad debió haber ocurrido con intensidad apreciable en el periodo estudiado. Las instituciones cerradas de la capital del país, especialmente la institución A, deben haber contribuido al incremento de la tuberculosis en Ciudad de La Habana en los años 90.

4.3. Estudio molecular de transmisión de tuberculosis entre personas seronegativas y seropositivas al VIH.

La transmisión de la tuberculosis es un riesgo bien reconocido tanto para pacientes ingresados en instituciones de salud como para el personal médico y paramédico de estos lugares, y es particularmente importante entre personas infectadas por el VIH (Beck-Sagué et al., 1992; Coronado et al., 1993, Hennessey et al., 2000). La tuberculosis en estas personas puede resultar de nuevas infecciones adquiridas a través del curso de la infección con el VIH o por reactivación de una infección latente (Beck-Sagué et al., 1992; Daley et al., 1992; Portugal et al., 1999). Sin embargo, el periodo de incubación es generalmente mucho más corto en personas VIH positivas que en individuos no infectados por este virus (Beck-Sagué et al., 1992; Coronado et al., 1993; Daley et al., 1992; Portugal et al., 1999).

En este trabajo empleamos el RFLP-IS6110 para determinar los patrones genéticos de las cepas de *M. tuberculosis* aisladas durante un brote nosocomial entre individuos infectados por el VIH y VIH negativos y auxiliar a la investigación epidemiológica a conformar la cadena de transmisión más probable.

4.3.1. Procedencia de los casos estudiados y resultados bacteriológicos.

De los 25 casos con tuberculosis, 18 procedían del sanatorio de Santiago de las Vegas (SSV), dos del Sanatorio de Matanzas (SMZ), dos casos del Sanatorio de Villa Clara (SVC), y uno de los Sanatorios de Sancti Spiritus (SSS), Holguín (SHL) y La Habana (SNA), respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3- Principales características de los pacientes y de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas durante el primer brote reportado en Cuba de tuberculosis entre personas VIH positivas y VIH negativas.

Paciente	Cepa	Lugar de Origen	Fecha de Diagnóstico	Tipo de Muestra	Examen Directo (Cod.)	Serología al VIH	Patrón de RFLP-IS6110
I	1	SSV	20/07/93	Espuito	8	+	1
II	2	SSV	22/07/93	Espuito	0	+	1
III	3	SSV	06/09/93	Espuito	0	+	1
IV	4	SSV	16/09/93	L. Cefalorraquídeo	-	+	2
V	5	SMZ	10/11/93	Espuito	9	+	1
VI	6	SSV	16/11/93	Espuito	0	-	1
VII	7	SSV	16/11/93	Espuito	8	+	1
VIII	8	SSV	16/11/93	Espuito	0	+	1
IX	9	SSV	23/11/93	Espuito	9	+	1
X	10	SSV	25/11/93	Espuito	0	+	1
XI	11	SSV	25/11/93	Espuito	0	+	1
XII	12	SVC	26/11/93	Espuito	9	+	1
XIII	13	SSV	30/11/93	Espuito	0	+	1
XIV	14	SSS	02/12/93	Espuito	0	+	1
XV	15	SMZ	02/12/93	Espuito	0	+	1
XVI	16	SSV	02/12/93	Espuito	0	+	1
XVII	17	SSV	02/12/93	Espuito	0	+	1
XVIII	18	SSV	02/12/93	Espuito	0	+	1
XIX	19	SSV	12/01/94	Espuito	0	+	1
XX	20	SVC	19/01/94	Espuito	9	+	1
XXI	21	SSV	03/02/94	Espuito	0	-	1
XXII	22	SHL	03/02/94	Espuito	9	+	1
XXIII	23	SNA	22/03/94	Espuito	6	+	3
XXIV	24	SSV	19/08/94	Espuito	6	+	1
XXV	25	SSV	01/06/95	Espuito	8	-	1

SSV: Sanatorio de Santiago de Las Vegas
SMZ: Sanatorio de Matanzas

SVC: Sanatorio de Villa Clara
SSS: Sanatorio de Sancti Spiritus

SHL: Sanatorio de Holguín
SNA: Sanatorio Nazareno

Los pacientes del estudio se separaron en dos grandes grupos para su mejor análisis: uno de 18 casos, en donde se encontraban los residentes (seropositivos al VIH) y personal médico (VIH negativos) del SSV y otro grupo con siete personas VIH positivas que residían en otras provincias.

Todos los casos tuvieron tuberculosis pulmonar excepto el paciente IV que sufrió una tuberculosis meníngea.

Sólo una de las 25 cepas de *M. tuberculosis* aisladas de los pacientes involucrados en este brote fue resistente a alguna droga antibacilar (a isoniacida), el resto fue susceptible.

4.3.2. Análisis por RFLP-IS6110.

Se observaron tres patrones diferentes de RFLP-IS6110 entre las 25 cepas de *M. tuberculosis* analizadas (Fig. 5, Tabla 3).

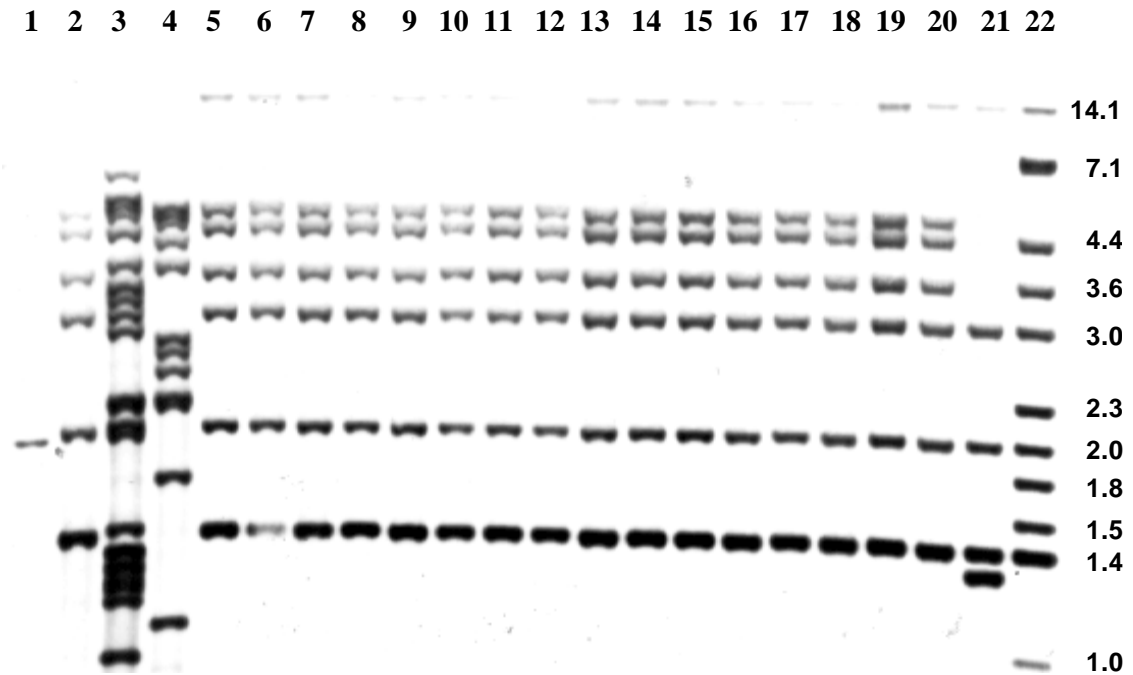


Figura 5 – Patrones de RFLP-IS6110 de 20 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas durante un brote de tuberculosis entre pacientes seropositivos al VIH.

Líneas 1 y 22 contienen ADN de las cepas de referencias *M. bovis* BCG P3 y *M. tuberculosis* Mt14323, respectivamente. Línea 2, ADN de una cepa aislada de una enfermera del SSV (VIH-negativa). Línea 3, cepa del primer paciente infectado por el VIH diagnosticado bacteriológicamente con una tuberculosis (ganglionar), pero no relacionado al brote. Línea 4, cepa aislada de un paciente infectado por el VIH con una tuberculosis meníngea. Línea 5, representa el ADN de la cepa aislada del caso índice del brote. Líneas 6-20, ADN de cepas de pacientes con infección por VIH. Línea 21, representa una cepa resistente a isoniácida aislada de un paciente VIH-positivo.

Los números de la derecha indican el tamaño de los fragmentos de restricción de la cepa de referencia *M. tuberculosis* Mt14323 (en Kilobases).

De las 25 cepas estudiadas, 23 mostraron un perfil de restricción de siete bandas (patrón 1). Entre los 23 casos a quienes se le aislaron estas cepas, estaban 17 personas del SSV (14 VIH+ y tres VIH-), dos pacientes del sanatorio de Matanzas, dos casos de Villa Clara y uno de Sancti Spiritus y Holguín, respectivamente.

Otra cepa aislada de un caso VIH positivo con tuberculosis meníngea (cepa 4) tuvo un patrón de RFLP con 10 copias de IS6110 (patrón 2).

El patrón restante, patrón 3 (5 bandas), fue visto en una cepa resistente a isoniacida aislada de un individuo VIH+ (cepa 23) recluido en una institución cerrada diferente del resto de los casos (SNA) y que al parecer nunca estuvo en contacto con los pacientes del brote.

En resumen, creemos que varios factores deben haber facilitado la transmisión de esta cepa de *M. tuberculosis* en el SSV y el HIPK:

- 1- El retardo en el diagnóstico, el tratamiento y el aislamiento efectivo del caso índice y de los primeros casos secundarios de este brote.
- 2- El frecuente movimiento de las personas VIH positivas en el SSV que posibilitó una mayor diseminación de la cepa.
- 3- El elevado riesgo de infección por tuberculosis y de desarrollar la enfermedad que tiene los individuos inmunocomprometidos.

Este estudio confirmó una vez más las observaciones previas de otros autores de que el RFLP-IS6110 es una herramienta molecular poderosa en investigaciones de brotes institucionales de tuberculosis, especialmente en clínicas, residencias u hospitales para personas VIH positivas (Beck-Sagué et al., 1992; Coronado et al., 1993; Bergmire-Sweat et al., 1996; Valway et al., 1994^a; 1994^b).

Los resultados del RFLP-IS6110 nos ayudaron a identificar el posible caso primario (paciente I) y a proponer la posible ruta de transmisión.

4.4. Estudio molecular de transmisión de tuberculosis en el Hospital Psiquiátrico de La Habana.

Evidencias epidemiológicas y microbiológicas sugirieron al inicio una transmisión nosocomial de *M. tuberculosis* en el Hospital Psiquiátrico de La Habana (HPH). Se empleó en este estudio el RFLP-IS6110 como herramienta complementaria en las investigaciones epidemiológicas.

4.4.1. Datos clínico-epidemiológicos y resultados bacteriológicos.

De 1990 a 1994 el número de casos de tuberculosis en el HPH fue de alrededor de uno por año. Sin embargo, a partir de 1995 estos se incrementaron a tres en ese año y seis en 1996. De enero de 1997 a marzo de 1998 ocurrieron otros seis casos. En total, 14 pacientes (hombres) con enfermedades mentales crónicas y una enfermera fueron diagnosticados en el periodo de marzo de 1995 a marzo de 1998. Todos los casos presentaron tuberculosis pulmonar y fueron VIH-. Trece casos fueron diagnosticados por baciloscopia y dos por cultivo (Tabla 4). Todas las cepas fueron susceptibles a las drogas antibacilares, como es frecuente en nuestro país y ha sido ampliamente reportado (Espinal et al., 2001; de Kantor y Ritacco, 1994; Pablos-Mendez et al., 1998).

Tabla 4 – Principales características de los pacientes y de las cepas aisladas durante un brote de tuberculosis en el Hospital Psiquiátrico de La Habana.

Paciente	Cepa	Fecha de Diagnóstico	Baciloscopia (Codificación)	Sala del paciente	Patrón Genético
I	1	28 Marzo 95	9	G	1
II	2	8 Septiembre 95	6	C	2
III	3	22 Septiembre 95	7	K	1
	(3a) #	15 Noviembre 96 *	9 @		1
IV	4	12 Marzo 96	9	A	1
V	5	2 Abril 96	6	G	1
VI	6	25 Abril 96	9	E	3
VII	7	7 Mayo 96	9	G	1
VIII	8	14 Mayo 96	9	H	1
IX	9	27 Diciembre 96	6	G	4
X	10	16 Mayo 97	0	K	1
XI	11	10 Junio 97	8	G	1
XII	12	11 Septiembre 97	0	I	1
XIII	13	28 Noviembre 97	9	B	1
XIV †	14	7 Enero 98	9	G	1
XV	15	10 Marzo 98	9	F	1

Otra cepa del paciente

* Recaída.

@ Codificación de muestra en recaída.

† Enfermera del HPH.

El paciente III tuvo una recaída de la enfermedad (reactivación endógena) un año después de su diagnóstico inicial y como era esperado, las dos cepas aisladas (cepas 3 y 3a) mostraron el mismo patrón de RFLP-IS6110 (Tabla 4).

Trece de los 15 pacientes se encontraban dispersados en 10 de las 14 salas (Salas A-I) de la Unidad 2, incluyendo seis que residían en una sola sala (Sala G). También había dos casos que estaban en salas de acceso limitado (Salas C y F). Otros dos casos estaban alojados en una pequeña granja (Sala K) de la Unidad 3 (ver Tabla 4).

Los resultados de la investigación epidemiológica convencional revelaron que existió un contacto efectivo entre 11 de los 15 casos de tuberculosis. Estos once pertenecían a la Unidad 2 y compartieron diversas actividades comunes, como son: alimentación, trabajos manuales y artesanales, práctica de deportes, y otras actividades. Los restantes 4 casos (2 pacientes de las salas de acceso limitado C y F y otros 2 de la sala K) no tuvieron contacto con el resto.

4.4.2. Análisis por RFLP-IS6110.

El análisis por RFLP-IS6110 se les realizó a las 15 cepas del estudio obteniéndose cuatro patrones de restricción diferentes (Fig. 6 y Tabla 4).

El primer patrón, con nueve copias de IS6110, se observó en 12 cepas de las 15 analizadas (Figura 6, Tabla 4). Esto nos sugiere que debió haber ocurrido una transmisión de la cepa del posiblemente caso primario (paciente I) al resto de los 11 pacientes con cepas de idéntico patrón de RFLP (ver propuesta de cadena de transmisión en anexo).

Los otros tres patrones estuvieron relacionados con tres cepas únicas. Las cepas 6 y 9, aisladas de pacientes que vivían en las salas E y G, respectivamente, exhibieron patrones diferentes y como ambos casos eran menores de 45 años, se supuso que ellos habían desarrollado la tuberculosis a partir de otras fuentes de infección diferentes a las del brote (quizás provenientes de afuera del hospital).

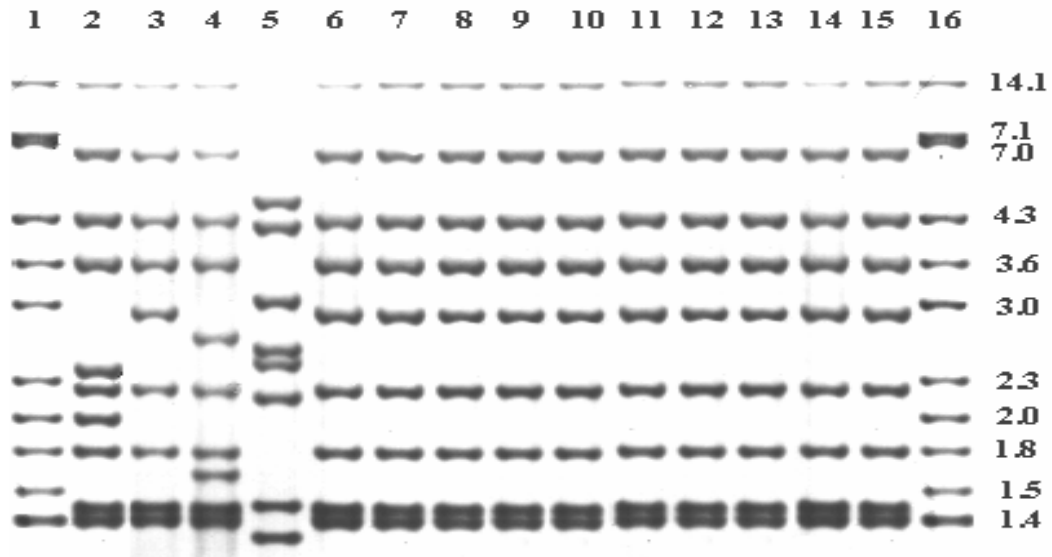


Figura 6- Patrones de RFLP-IS6110 de 14 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas durante un brote de tuberculosis en el Hospital Psiquiátrico de La Habana.

Línea 1 y 16, contienen el ADN de la cepa de referencia de *M. tuberculosis*, Mt 14323. Línea 2, representa la cepa aislada del paciente IX (Sala G). Línea 3, muestra el patrón de restricción del caso índice (paciente I). Línea 4, representa el ADN del paciente VI de la sala E. Línea 5, cepa del paciente II que residió en un área de acceso restringido (Sala C). Líneas 6 – 15, Muestran los patrones genómicos de los pacientes III-V, VII, VIII, X-XIII y XV (de las Salas K, A, G, G, H, K, G, I, B y F), respectivamente.

Los números de la derecha indican el tamaño de los fragmentos de restricción de la cepa de referencia *M. tuberculosis* Mt14323 (en Kilobases).

En los últimos años han aparecido varios reportes de brotes de tuberculosis ocurridos en instituciones cerradas en donde se emplean herramientas epidemiológicas convencionales y moleculares, fundamentalmente el RFLP-IS6110. En la mayoría de estos trabajos se ha demostrado que las malas condiciones existentes en muchos de estos lugares facilitan la diseminación de la tuberculosis y dificultan seriamente el control de esta enfermedad (Beck-Sagué et al., 1992; Chaves et al., 1997; Coronado et al., 1993; Bergmire-Sweat et al., 1996; Valway et al., 1994^a).

Una especial importancia reviste la ocurrencia de brotes de tuberculosis en hospitales o clínicas de enfermos mentales, como el caso del HPH, ya que estas personas están menos capacitadas para alertar al personal médico de la ocurrencia de cambios significativos en su estado de salud (Bergmire-Sweat et al., 1996; Lemaitre et al., 1996).

En resumen, pensamos que tres factores deben haber facilitado la transmisión de la tuberculosis en el HPH:

- 1- La coexistencia, por largos períodos, de los pacientes de la Unidad 2 en una determinada área de esta institución.
- 2- El retardo en el diagnóstico, el tratamiento y el aislamiento del probable caso primario y de los casos secundarios.
- 3- La dificultad del personal médico para examinar, tomar muestras para el diagnóstico y tratar a estos pacientes con insuficiencia mental, severa en algunos casos.

Este estudio confirmó una vez más que el RFLP-IS6110 es una herramienta poderosa en investigaciones de epidemiología molecular. Permitió simplificar el diagnóstico de este brote, identificar el posible caso primario (paciente I) y la posible vía de transmisión. También se demostró que los métodos convencionales de epidemiología no fueron suficientes para predecir las relaciones epidemiológicas entre los casos de tuberculosis incluso en una institución cerrada con patrones regulares aparentes de contactos entre los pacientes.

4.5. Caracterización molecular de cepas de *M. tuberculosis* por RFLP-IS6110 y Spoligotyping.

En la actualidad se considera al RFLP-IS6110 como la técnica de referencia para realizar estudios moleculares de caracterización de *M. tuberculosis* o en estudios epidemiológicos. Su habilidad para diferenciar cepas de esta especie ha sido ampliamente probada (Behr y Small, 1997; Braden et al., 1997^c; Drobniowski y Pozniak, 1996; Dunlap, 2000; Hayward, 1995; Onorato, 2000; Suffys et al., 1997). No obstante, esta metodología presenta algunas desventajas como son: que requiere de un abundante crecimiento del cultivo para la extracción del ADN (Otal et al., 1997; Suffys et al., 1997). Esto se dificulta en las micobacterias porque la mayoría de los integrantes de este género se caracterizan por poseer un ritmo lento de crecimiento; además, los pasos inherentes a este método requieren como mínimo tres días, debido a la laboriosidad de cada uno de ellos, lo que hace la técnica moderadamente cara (Suffys et al., 1997). Otra limitación importante es el hecho de que

existen cepas de *M. tuberculosis*, sobre todo en Etiopía y el Sudeste Asiático, que poseen pocas copias o ninguna del elemento IS6110 en su genoma (Hermans et al., 1995; van Soolingen y Hermans, 1995). Esto ha traído como consecuencia que dichas cepas no han podido ser tipificadas por medio de la técnica RFLP-IS6110 y se ha hecho necesario recurrir a marcadores genéticos adicionales como: las secuencias *PGRS* y *DR* (van Soolingen y Hermans, 1995).

Motivado por estos inconvenientes diversos autores han diseñado más de una decena de métodos nuevos, basados en PCR, que tratan de suplir algunas de las desventajas del RFLP-IS6110 (ver sección 2.8 y anexo 2)

En este trabajo se analizaron 157 cepas de *M. tuberculosis* aisladas en Cuba en el periodo 1994-1995 por las técnicas de RFLP-IS6110 y Spoligotyping para evaluar el poder de discriminación de esta última técnica en estudios poblacionales.

4.5.1. Resultados del RFLP-IS6110.

Al realizar el análisis por RFLP-IS6110 se encontraron 102 patrones de restricción diferentes, de ellos había 83 únicos y 19 compartidos por 74 cepas (Fig. 7).

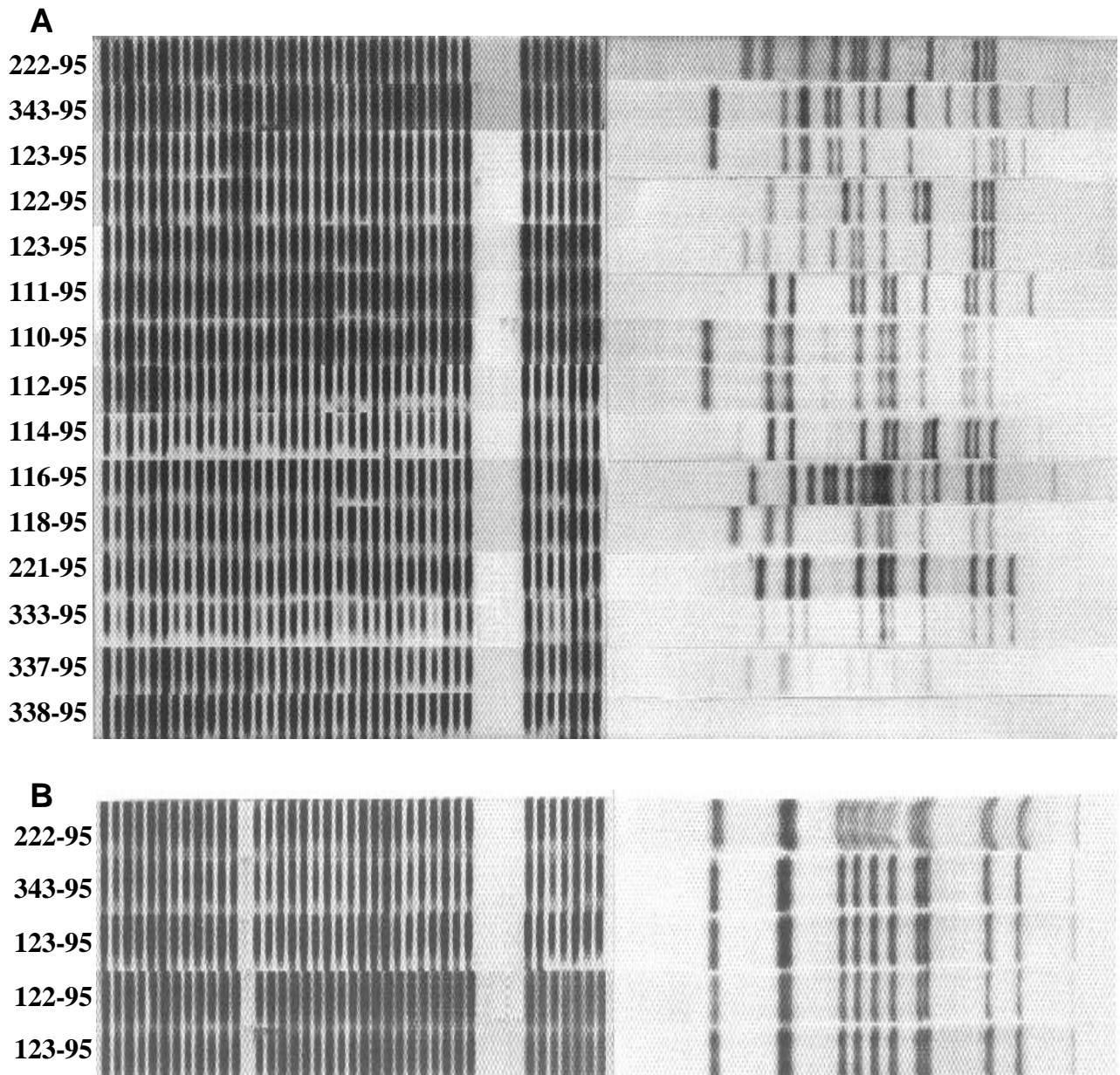


Figura 7- Comparación de los patrones de RFLP-IS6110 y Spoligotyping en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en Cuba entre 1994-1995.

A- Alta diversidad de patrones de RFLP-IS6110 en 15 cepas con idéntico Spoligotipo.

B- Ejemplo de correlación entre las dos técnicas moleculares en 5 cepas de *M. tuberculosis*.

La mayoría de estos patrones (11 de 19) fue compartido por sólo dos cepas; aunque tres de los 19 patrones (patrones de los agrupamientos) fueron observados en 18, 10 y siete cepas, respectivamente.

4.5.2. Resultados del Spoligotyping.

En el caso del Spoligotyping se observaron 47 Spoligotipos diferentes, de ellos 32 únicos y 15 compartidos por 125 cepas (Fig. 7).

En algunos casos, las cepas agrupadas por Spoligotyping tenían patrones de RFLP-IS6110 idénticos o casi idénticos, como los Spoligotipos 2, 19 y 82 (ver Fig. 7).

Sin embargo, también se observó que algunos patrones de Spoligotyping (patrones 1, 3, 14 y 20) fueron vistos en un gran número de cepas (Tabla 5) con patrones de RFLP-IS6110 diferentes, como se puede observar en Fig. 7.

Tabla 5 - Comparación entre los métodos de RFLP-IS6110 y Spoligotyping empleando 157 cepas de *M. tuberculosis* aisladas en Cuba entre 1994-1995.

Método	Promedio de bandas	Patrones Obtenidos	Unicos	Compartidos o en <u>Cluster</u>	Cepas Agrupadas	Tamaño promedio de <u>Clusters</u>
RFLP-IS6110	12	102	83	19	74	4
<u>Spoligotyping</u>	28	47	32	15	125	8

4.5.3. Comparación de los resultados entre el RFLP-IS6110 y el Spoligotyping.

El poder de discriminación del Spoligotyping fue sensiblemente inferior al del RFLP-IS6110, observándose una menor cantidad de patrones genéticos y mayor cantidad de cepas con un mismo patrón con esta primera técnica.

Recientemente, otros autores han notado también el moderado poder resolutivo del Spoligotyping (Cronin et al., 2001; Doroudchi et al.; 2000, Kremer et al, 1999; Wobeser et al., 2000).

La mayoría de los agrupamientos establecidos por Spoligotyping (16 de 23) fueron subdivididos por el RFLP-IS6110. Por el contrario, ninguno de los agrupamientos definidos por el RFLP-IS6110 fue subdividido sobre la base de los resultados del Spoligotyping.

Empleando la técnica de Spoligotyping solamente en el análisis de la transmisión de persona a persona esta puede ser irrealizable ya que muchas cepas con idéntico patrón de Spoligotyping tuvieron varios patrones de RFLP con bajo grado de similitud.

Nuestros resultados confirman las conclusiones tempranas de Goyal et al. (1997), de que el Spoligotyping puede ser usado como un método rápido para excluir relaciones epidemiológicas. En caso de que se encuentren patrones diferentes las cepas ensayadas deberán tener también diferentes patrones de RFLP haciendo la tipificación adicional innecesaria. Por el contrario, si se observan idénticos Spoligotipos, entonces se hará necesario realizar la subtipificación por medio del RFLP- IS6110.

A pesar de tener un menor poder de discriminación que el RFLP- IS6110, la técnica de Spoligotyping posee numerosas ventajas como son: rapidez, sencillez, fácil interpretación y expresión de sus resultados (Chan et al., 2001; Kamerbeek et al., 1997; Kremer et al., 1999; Sola et al., 2001).

Otro de los atributos de esta metodología es que puede ser empleada en la detección y tipificación directa a partir de muestras clínicas, en casos donde se necesite una identificación molecular rápida de una determinada cepa (Kamerbeek et al., 1997).

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

- 1- El elevado número de copias de *IS6110* de las cepas aisladas en Cuba posibilitó la diferenciación, con la técnica de RFLP-*IS6110*, de la inmensa mayoría de los aislamientos estudiados sin el empleo de marcadores genéticos adicionales.
- 2- Se reforzó la hipótesis planteada por otros autores sobre la asociación, con mayor frecuencia, de ciertos genotipos en determinadas regiones geográficas.
- 3- El alto porcentaje de agrupamiento encontrado pudiera sugerir que el fenómeno de transmisión reciente influyó en la reemergencia de la tuberculosis en Cuba.
- 4- Se encontró evidencia molecular, por primera vez en Cuba, de transmisión de resistencia primaria a drogas antibacilares.
- 5- El empleo del RFLP-*IS6110* en el análisis de dos brotes nosocomiales ocurridos en instituciones de salud auxilió a los estudios de epidemiología convencional a proponer posibles vías de transmisión de la tuberculosis en estos lugares.
- 6- La técnica de Spoligotyping no debe ser empleada en estudios genético-poblacionales que requieran de un elevado poder de discriminación de las cepas de *M. tuberculosis*.

6. RECOMENDACIONES

6. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios genético-poblacionales para conocer la magnitud de la transmisión reciente de la tuberculosis en Cuba en el periodo actual y determinar los factores de riesgo asociados a esta.
2. Ensayar nuevas técnicas moleculares de caracterización de *M. tuberculosis* (como la tipificación con MIRU/VNTR) y evaluar su factibilidad en laboratorios con recursos limitados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abate G, Mshana RN, Miorner H. Evaluation of a colorimetric assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis 1998; 2: 1011-6.
2. Agerton TB, Valway SE, Blinkhorn RJ, Shilkret KL, Reves R, Schluter W, et al. Spread of strain W, a highly drug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*, across the United States. Clin Infect Dis 1999; 29: 85-92.
3. Aldereguía G. Nuestra experiencia en un programa de control de tuberculosis sobre la base de la pesquisa bacteriológica y tratamiento ambulatorio controlado. Bol Hig Epidemiol 1972; 10: 41-52.
4. Alito A, Morcillo N, Scipioni S, Dolmann A, Romano M, Cataldi A, 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.
5. Alland D, Kalkut GE, Moss AR, McAdam RA, Hahn JA, Bosworth A, et al. Transmission of tuberculosis in New York City. An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. N Engl J Med 1994; 330: 1710-6.
6. American Thoracic Society, American Academy of Paediatrics, Centers for Disease Control, Infectious Diseases Society of America. Control of tuberculosis in the United States. Am Rev Respir Dis 1992; 146: 1623-33.
7. Anh DD, Borgdorff MW, Van LN, Lan NT, van Gorkom T, Kremer K, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype emerging in Vietnam. Emerg Infect Dis 2000; 6: 302-5.

8. Anuario Demográfico de Cuba. Oficina Nacional de Estadísticas. 1997.
9. Arain TM, Resconi AE, Hickey MJ, Stover CK. Bioluminescence screening in vitro (Bio-Siv) assays for high-volume antimycobacterial drug discovery. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1536-41.
10. Ausina V, Gamboa F, Gazapo E, Manterola JM, Lonca J, Matas L, et al. Evaluation of the semiautomated Abbott *LCx Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 1996-2002.
11. Badak FZ, Kiska DL, Setterquist S, Hartley C, O'Connell MA, Hopfer RC. Comparison of mycobacteria growth indicator tube with BACTEC 460 for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2236-9.
12. Barnes PF, Yang Z, Preston-Martin S, Pogoda JM, Jones BE, Otaya M, et al. Patterns of tuberculosis transmission in Central Los Angeles. *JAMA* 1997; 278: 1159-63.
13. Bates JH, Stend WW. The history of tuberculosis as a global epidemic. *Med Clin Am* 1993; 77: 1205- 17.
14. Bauer J, Thomsen V, Poulsen S, Andersen AB. False-positive results from cultures of *Mycobacterium tuberculosis* due to laboratory cross-contamination confirmed by restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 988-91.
15. Beck-Sagué C, Dooley SW, Hutton MD, Otten J, Breden A, Crawford JT, et al. Hospital outbreak of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections. Factors in transmission to staff and HIV-infected patients. *JAMA* 1992; 268: 1280-6.
16. Beggs ML, Cave MD, Marlove C, Cloney L, Duck P, Eisenach KD. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex direct repeat sequence for use in cycling probe reaction. *J Clin Microb* 1996; 34: 2985-9.
17. Behr MA, Small PM. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. How can it help the clinician? *Clin Infect Dis* 1997; 25: 806-10.
18. Beldarrain E. Apuntes par la historia de la lucha antituberculosis en Cuba. *Rev Cub Salud Pub* 1998; 24: 97-105.

19. Bergmann JS, Woods GL. Mycobacterial growth indicator tube for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997; 28: 153-6.
20. Bergmire-Sweart D, Barnett BJ, Harris SL, Taylor JP, Mazurek JH, Reddy V. Tuberculosis outbreak in a Texas prison, 1994. *Epidemiol Infect Dis* 1996; 117: 485-92.
21. Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, Kreiswirth BN. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol* 2002; 10: 45-52.
22. Bifani PJ, Mathema B, Liu Z, Moghazeh S, Shopsin B, Tempalski B, et al. Identification of a W variant outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* via population-based molecular epidemiology. *JAMA* 1999; 282: 2321-7.
23. Bifani PJ, Plikaytis BB, Kapur V, Stockbauer K, Pan X, Lutfey ML, et al. Origin and interstate spread of a New York City multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family. *JAMA* 1996; 275: 452-7.
24. Bishai WR, Graham NMH, Harrington S, Pope DS, Hooper N, Astemborski J, et al. Molecular and geographic patterns of tuberculosis transmission after 15 years of directed observed therapy. *JAMA* 1998; 280: 1679-84.
25. Borgdorff MW, Behr MA, Nagelkerke N, Hopewell PC, Small PM. Transmission of tuberculosis in San Francisco and its association with immigration and ethnicity. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4: 287-94.
26. Borgdorff MW, Nagelkerke N, van Soolingen D, de Haas PEW, Veen J, van Embden JDA. Analysis of tuberculosis transmission between nationalities in the Netherlands in the period 1993-1995 using DNA fingerprinting. *Am J Epidemiol* 1998; 147:187-95.
27. Braden CR, Templeton GL, Cave MD, Valway SE, Onorato IM, Castro KG, et al. Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of mycobacteria isolates from a state with a large rural population. *J Infect Dis* 1997^a; 175: 1446-52.

28. Braden CR, Templeton GL, Stead WW, Bater JH, Cave MD, Valway SE. Retrospective detections of laboratory cross contamination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures with use of DNA fingerprint analysis. Clin Infect Dis 1997^b; 24: 35-40.
29. Braden CR. Current concepts in *Mycobacterium tuberculosis* DNA fingerprinting. Infect Dis Clin Practice 1997^c; 24: 35-40.
30. Brewer TF, Heymann SJ. Reducing the impact of tuberculosis transmission in institutions: beyond infection control measures. Int J Tuberc Lung Dis 1999; 2: S118-23.
31. Britton WJ, Roche PW, Winter N. Mechanisms of persistence of Mycobacteria. Trends Microbiol 1994; 2: 284-8.
32. Brooks GF, Butel JS, Ornston LN. Micobacterias. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick, Adelberg, 15^a edic. México D.F.: El Manual Moderno, S.A. de C.V., 1996:323-34.
33. Buehler JW, Ward JW. A new definition for AIDS surveillance. Ann Intern Med. 1993; 118: 390-2.
34. Burger M, Raskin S, Brockelt SR, Amthor B, Geiss HK, Haas WH. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* complex culture isolates collected in Brazil and spotted onto filter paper. J Clin Microbiol. 1998; 36: 573-6.
35. Burgos MV, Pym AS. Molecular epidemiology of tuberculosis. Eur Respir J Suppl 2002; 36: 54s-65s.
36. Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, Rodriguez JC, Afonso O, Martin C, et al. Exogenous reinfection with tuberculosis on a European island with a moderate incidence of disease. Am J Respir Crit Care Med. 2001; 163: 717- 20.
37. Canetti G, Fox W, Khomenko A, Smelev NA, Menon NK, Mahler HT. Advances in techniques of testing Mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity test in tuberculosis programs. Bull WHO 1969; 29: 565-79.
38. Carriere C, Riska PF, Zimhony O, Kriakov J, Bardarov S, Burns J, et al. Conditionally replicating luciferase reporter phages: improved sensitivity for rapid detection and assessment of drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. J

- Clin Microbiol 1997; 35: 3232-9.
39. Casal M. Microbiología clínica de las enfermedades por micobacterias. Universidad de Córdoba, España. 1990.
 40. Cave MD, Eisenach KD, Templeton G, Salfinger M, Mazurek G, Bates J, et al. Stability of DNA fingerprint pattern produced with IS6110 in strains of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1994; 32: 262-6.
 41. Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). Essential components of a tuberculosis prevention and control program; and screening for tuberculosis and tuberculosis infection in high-risk populations: recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. MMWR 1995; 44: 1-29.
 42. Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). Outbreak of multidrug-resistant tuberculosis at a hospital – New York City, 1991, MMWR 1993^a; 42: 427-33.
 43. Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). Probable transmission of multidrug-resistant tuberculosis in a correctional facility - California, MMWR 1993^b; 42: 48-51.
 44. Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas. Alerta ONUSIDA sobre incremento de casos de tuberculosis. Boletín de Información Diaria. La Habana, Cuba. 1998.
 45. Chan MY, Borgdorff M, Yip CW, de Haas PE, Wong WS, Kam KM, van Soolingen D. Seventy percent of the *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong represent the Beijing genotype. Epidemiol Infect 2001; 127:169-71
 46. Chaves F, Dronda F, Cave M, Alonso-Sanz M, Eisenach K. A longitudinal study of transmission of tuberculosis in a large prison population. Am J Respir Crit Care Med 1997; 155: 719-25.
 47. Chevrel-Dellagi D, Abderrahman A, Haltiti R, Koubaji H, Gicquel B, Dellagi K. Large-scale DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains as a tool for epidemiological studies of tuberculosis. J Clin Microbiol 1993; 31: 2446-50.
 48. Clarridge JE 3rd, Shawar RM, Shinnick TM, Plikaytis BB. Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. J Clin Microbiol. 1993; 31: 2049-56.

49. Cleveland JL, Kent J, Gooch BF, Valway SE, Marianos DW, Butler WR, et al. Multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in an HIV dental clinic. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; 16: 7-11.
50. Cole ST, Telenti A. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Respir J* 1995; 8: S701-13.
51. Collins DM, de Lisle GW. DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis BCG*. *J Gen Microbiol* 1984; 130: 1019-21.
52. Collins DM, de Lisle GW. DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of the tuberculosis complex. *J Clin Microbiol* 1985; 21: 562-64.
53. Collins DM, Erasmuson SK, Stephens DM, Yates GF, de Lisle GW. DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* strains by restriction fragment analysis and hybridization with insertion elements IS1081 and IS6110. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1143-7.
54. Collins DM, Stephens DM. Identification of an insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. *FEMS Microbiol Lett* 1991; 67: 11-5.
55. Collins L, Franzblau SG. Microplate alamar blue assay versus BACTEC460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 4: 1004-9.
56. Cooksey RC, Morlock GP, Glickman S, Crawford JT. Evaluation of a line probe assay kit for characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York City. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1281-3.
57. Coronado VG, Beck-Sagué CM, Hutton MD, Davis BJ, Nicholas P, Villareal C, et al. Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among persons with human immunodeficiency virus infection in an urban hospital: epidemiologic and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Infect Dis* 1993; 168: 1052-5.
58. Cousins DV, Wilson SD, Francis BR, Gwo BL. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 255-8.

59. Crofton J, Horne N, Fred M. Tuberculosis Clínica. 1^{ra} Ed. Paris-Francia: Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER). 68 Boulevard Saint Michel; 1992.
60. Cronin WA, Golub JE, Magder LS, Baruch NG, Lathan MJ, Mukasa LN, et al. Epidemiologic usefulness of spoligotyping for secondary typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110. J Clin Microbiol 2001; 39: 3709-11.
61. Curtis AB, Ridzon R, Novick LF, Driscoll J, Blair D, Oxtoby M et al. Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* transmission patterns in a homeless shelter outbreak. Int J Tuberc Lung Dis 2000; 4: 308-13.
62. Dale JW, Nor RM, Ramayah S, Tang TH, Zainuddin ZF. Molecular epidemiology of tuberculosis in Malaysia. J Clin Microbiol 1999; 37: 1265-8.
63. Daley CL, Small PM, Schechter GF, Schoolnik GK, McAdam RA, Jacobs Jr WR, et al. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons with Human Infected Virus. N Engl J Med 1992; 326: 231-5.
64. Daniel TM, Bates JH, Downes KA. History of Tuberculosis. En: Bloom BR, editors. Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control. Washington D.C: American Society for Microbiology; 1994. p.13-19.
65. Das S, Paramasivan CN, Lowrie B, Prabhakar R, Narayanan PR. IS6110 restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, South India. Tub Lung Dis 1993; 76: 550-4.
66. De Beenhouwer H, Lhiang Z, Jannes G, Mijs W, Machtelinckx L, Rossau R, et al. Rapid detection of rifampicin resistance in sputum and biopsy specimens from tuberculosis patients by PCR and line probe assay. Tuber Lung Dis 1995; 76: 425-30.
67. De Boer AS, van Soolingen D. Recurrent tuberculosis due to exogenous reinfection. N Engl J Med 2000; 342: 1050-1.
68. De Kantor IN, Ritacco V. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programmes. Vet Microbiol 1994; 40: 5-14.

69. De Ruiz Holgado P. *Mycobacterium*. En: Basuoldo JA, Coto CE, de Torres RA, editores. Microbiología Biomédica. Argentina: Editorial Atlante; 1996. p.377-87.
70. Departamento de Epidemiología y Estadísticas. Centro Provincial de Higiene y Epidemiología-Ciudad de La Habana. Registro de tuberculosis. 1997.
71. Diel R, Schneider S, Meywald-Walter K, Ruf CM, Rusch-Gerdes S, Niemann S. Epidemiology of tuberculosis in Hamburg, Germany: long-term population-based analysis applying classical and molecular epidemiological techniques. J Clin Microbiol 2002; 40: 532-9.
72. Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. Bull WHO 1994; 72: 213-20.
73. Dooley S W, Villarino M E, Lawrence M, Salinas L, Amil S, Rullan JV, et al. Nosocomial transmission of tuberculosis in a hospital unit for HIV-infected patients. JAMA 1992; 267: 2632-4.
74. Doroudchi M, Kremer K, Basiri EA, Kadivar MR, van Soolingen D, Ghaderi AA. IS6110-RFLP and spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Iran. Scand J Infect Dis 2000; 32: 663-8.
75. Drobniewski FA, Pozniak AL. Diagnosis, detection of drug resistance and epidemiology of tuberculosis. British J Hosp Med 1996; 56: 204-8.
76. Drobniewski FA, Wilson SM. The rapid diagnosis of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a molecular story. J Med Microbiol 1998; 47: 189-96.
77. Dunlap NE. The use of RFLP as a tool for tuberculosis control: utility or futility? Int J Tuberc Lung Dis 2000; 4: S134-8.
78. Edlin BR, Tokars JI, Grieco MH, Crawford JT, William J, Sordillo EM, et al. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 1992; 326: 1514-21.
79. Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis 1990; 161: 977-81.

80. El-Sahly HM, Adams GJ, Soini H, Teeter L, Musser JM, Graviss EA. Epidemiologic differences between United States- and foreign-born tuberculosis patients in Houston, Texas. *J Infect Dis* 2001; 183: 461-8.
81. Enarson DA, Rieder HL, Arnadottir T, Trébuchq A. Manejo de la tuberculosis. Guía para los países con escasos recursos económicos, 5^{ta} Ed., Paris, Francia: Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER), 2000.
82. Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L, Boulahbal F, Kim SJ, Reniero A, et al. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *N Engl J Med* 2001; 344: 1294-303.
83. Fadda G, Sanguinetti M. Polymerase chain reaction and other molecular techniques used in the diagnosis of tuberculosis. *Rays* 1998; 23: 48-54.
84. Fang Z, Forbes K. A *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 preferential locus (ipl) for insertion into the genome. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 479-81.
85. Fauci AS, Lane HC. Human Immunodeficiency Virus (HIV) disease. AIDS and related disorders. En: McGraw F, Hill R, editors. Principles of Internal Medicine. 13ed. New York: Interamericana de España; 1995. p. 822-35.
86. Felmler TA, Liu Q, Whelen AC, Williams D, Sommer SS, Persing DH. Genotypic detection of *Mycobacterium tuberculosis* rifampin resistance: comparison of single-strand conformation polymorphism and dideoxy fingerprinting. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1617-23.
87. Fletcher HA. Molecular epidemiology of tuberculosis: recent developments and applications. *Curr Opin Pulm Med* 2001; 7: 154-9.
88. Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernandez A, et al. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 362-6.
89. Frieden TR, Sherman LF, Maw KL, Fujiwara PI, Crawford JT, Nivin B, et al. A multi-institutional outbreak of highly drug-resistant tuberculosis. Epidemiology and clinical outcomes. *JAMA* 1996; 276: 1229-35.

90. Friedman CR, Stoeckle MY, Johnson JR. WD, Riley LW. Double-repetitive-element PCR method for subtyping *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. J Clin Microbiol 1995; 33: 1383-4.
91. Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiology. 1998; 144: 1189-96.
92. Gamboa F, Cardona PJ, Manterola JM, Lonca J, Matas L, Padilla E, et al. Evaluation of a commercial probe assay for detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* directly from respiratory and nonrespiratory clinical samples. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998; 17: 189-92.
93. García-Rodríguez JA. *Mycobacterium*. En: Pumarola A, Rodríguez-Torres A, García-Rodríguez JA, Piédrola-Angulo G, eds. Microbiología y Parasitología Médica, 2^{da} Ed. Mallorca-Barcelona: Salvat, Editores, S.A., 1987: 511-32.
94. Genewein A, Telenti A, Bernasconi C, Mordasini C, Weiss S, Maurer AM, et al. Molecular approach to identifying routes of transmission of tuberculosis in the community, Lancet 1993; 343: 841-4.
95. Gicquel B. RFLP typing of *Mycobacterium tuberculosis* bacilli. Tuber Lung Dis 1993; 74: 223-4.
96. Glynn JR, Vynnycky E, Fine PE. Influence of sampling on estimates of clustering and recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis* derived from DNA fingerprinting techniques. Am J Epidemiol 1999; 149: 366-71.
97. Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, van Soolingen D. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. Emerg Infect Dis 2002; 8: 843-9.
98. Gómez-Marín JE, Rigouts L, Villegas Londono LE, Portaels F. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and tuberculosis epidemiology. Bull Pan Am Health Organ 1995; 29: 226-36.
99. González E, Armas L, Alonso A. Tuberculosis in the Republic of Cuba: its possible elimination. Tub Lung Dis 1994; 75: 188-94.

100. González E, Armas L, Machin A. The trends by province of tuberculosis in Cuba: 1979–1993. *Bol Oficina Sanit Panam* 1995; 119: 369–404.
101. González E, Carabaloso M. Massive application of an antituberculosis chemoterapeutique programme in Cuba. *Bull Int Union Tuberc* 1974; 49: 118–26.
102. González E, García MM, Armas L. Etapas de la evolución histórica de la campaña antituberculosa en Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 1993; 45: 49–54.
103. Goyal M, Saunders NA, van Embden JDA, Young DB y Shaw RJ. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by Spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 647-51.
104. Grange JM, Laszlo A. Serodiagnostic test for tuberculosis: a need for assessment of their predictive accuracy and acceptability. *Bull WHO* 1990; 68: 571-6.
105. Grange JM. The biology of the genus *Mycobacterium*. *J Appl Bacteriol Suppl* 1996; 81: 1-9.
106. Greenberg RS, Eley JW y Boring JR. *Epidemiología Médica*. México, D.F.:Editorial El Manual Moderno; 1995. p. 35-50.
107. Greifinger R, Grabau J, Quinlan A, Loeder A, Di Ferdinando Jr G, Morse D L. Transmission of multidrug-resistant tuberculosis among immunocompromised persons in a correctional system - New York 1991, *MMWR* 1992; 41: 507-9.
108. Gutiérrez MC, Vincent V, Aubert D, Bizet J, Gaillot O, Lebrun L, et al. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 486-92.
109. Haas WH, Butler WR, Goodley CL, Crawford JT. Mixer-Linker-PCR: a new method for rapid fingerprinting of isolates of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1293-8.
110. Hanna BA, Ebrahimzadeh A, Elliott LB, Morgan MA, Novak SM, Rüsck-Gerdes S, et al. Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 748-52.
111. Hannan MM, Peres H, Maltez F, Hayward AC, Machado J, Morgado A, et al. Investigation and control of a large outbreak of multi-drug resistant tuberculosis at a

- central Lisbon hospital. *J Hosp Infect* 2001; 47: 91-7.
112. Harris KA Jr, Mukundan U, Musser JM, Kreiswirth BN, Lalitha MK. Genetic diversity and evidence for acquired antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* at a large hospital in South India. *Int J Infect Dis* 2000; 4: 140-7.
 113. Hausdorfer J, Sompek E, Allerberger F, Dierich MP, Rusch-Gerdes S. E-test for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2: 751-5.
 114. Hayward AC. Restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Thorax* 1995; 50: 1211-8.
 115. Heifets L, Good RC. Current laboratory methods for the diagnosis of tuberculosis. En: Bloom BR (ed.). *Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control*. Washington, DC, EE.UU. ASM Press, 1994.
 116. Heifets L. Mycobacteriology laboratory. *Clin Chest Med*. 1997;18: 35-53.
 117. Heldal E, Docker H, Caugant DA, Tverdal A. Pulmonary tuberculosis in Norwegian patients. The role of reactivation, re-infection and primary infection assessed by previous mass screening data and restriction fragment length polymorphism analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4: 300-7.
 118. Hennessey KA, Schulte JM, Valway SE, Joglar OT, Rios N, Sheppard JD, et al. Using DNA fingerprinting to detect transmission of *Mycobacterium tuberculosis* among AIDS patients in two health-care facilities in Puerto Rico. *Southern Med J* 2000; 93: 777-82.
 119. Hermans PWM, van Soolingen D, Bik EM, de Hass PEW, Dale JW, van Embden JDA. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect Immun* 1991; 59: 2695-705.
 120. Hermans PWM, van Soolingen D, Dale JW, Schwidema ARJ, MacAdam RA, Catty D, et al. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2051-8.
 121. Hermans PWM, Messadi F, Guebrexabher H, van Soolingen D, de Haas PE, Heersma H, et al. Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in

- Ethiopia, Tunisia, and the Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. *J Infect Dis* 1995; 171: 1504-13.
122. Hoffner SE, Svenson SB, Norberg R, Dias F, Ghebremichael S, Kallenius G. Biochemical heterogeneity of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in Guinea-Bissau. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2215-7.
123. Holton D, Pearson M, Larson C, Allen J, Hanssen TA, MacKeough E, et al. Investigation of tuberculosis outbreak in a Canadian federal penitentiary. *Tuber Lung Dis* 1996; 77: 51.
124. Iovannisci DM, Winn-Deen ES. Ligation amplification and fluorescence detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA. *Mol Cell Probes* 1993; 7: 35-43.
125. Jacobs RF. Multiple-drug resistance tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 1-10.
126. Jacobs WR Jr, Barletta RG, Udani R, Chan J, Kalkut G, Sosne G, et al. Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. *Science* 1993; 260: 819-22.
127. Jereb JA, Burwen DR, Dooley SW, Haas WH, Crawford JT, Geiter LJ, et al. Nosocomial outbreak of tuberculosis in a renal transplant unit: application of a new technique for restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Infect Dis* 1993; 168: 1219-24.
128. Jonas V, Alden MJ, Curry JI, Kamisango K, Knott CA, Lankford R, et al. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2410-6.
129. Jones Jr WD. Phage typing of *Mycobacterium tuberculosis* cultures from incidents of suspected laboratory cross-contamination. *Tubercle* 1988; 69: 43-46.
130. Kamerbeek J, Kock A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Burshoten A. Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and tuberculosis control. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 907-14.
131. Kapur V, Li LL, Hamrick MR, Plikaytis BB, Shinnick TM, Telenti A, et al. Rapid *Mycobacterium* species assignment and unambiguous identification of mutations associated with antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by

- automated DNA sequencing. Arch Pathol Lab Med 1995; 119: 131-8.
132. Kearns AM, Barrett A, Marshall C, Freeman R, Magee JG, Bourke SJ, et al. Epidemiology and molecular typing of an outbreak of tuberculosis in a hostel from homeless men. J Clin Pathol 2000; 53: 122-4.
133. Kent PT, Kubica GP. Mycobacteriology: A guide for the level III laboratory. Atlanta, Ga. US Dept of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control. 1985.
134. Kiers A, Drost AP, van Soolingen D, Veen J. Use of DNA fingerprinting in international source case finding during a large outbreak of tuberculosis in the Netherlands. Int J Tuberc Lung Dis 1997; 1: 239-45.
135. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Hass WH, Hermans PWM, Martin C, et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of power of discrimination and reproducibility. J Clin Microbiol 1999; 37: 2607-18.
136. Kremer K, Bunschoten A, Schouls L, van Soolingen D, and van Embden JDA. Spoligotyping, a PCR-based method to simultaneously detect and type *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. Protocol. RIVM. Netherlands. 2002.
137. Laserson KF, Osorio L, Sheppard JD, Hernandez H, Benitez AM, Brim S, 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.
138. Lemaitre N, Souga KW, Coëtmeur D, Vausel J, Jarlier V y Groset J. Nosocomial transmission of tuberculosis among mentally-handicapped patients in a long-term care. Tuberc Lung Dis 1996; 77: 531-6.
139. Leowski J, Miller M. Tuberculosis and AIDS: European and worldwide perspectives. Soz Praventivmed. 1992; 37: 199-206.
140. MacIntyre CR, Plant AJ, Hulls J, Streeton JA, Graham NM, Rouch GJ. High rate of transmission of tuberculosis in an office: impact of delayed diagnosis. Clin Infect Dis 1995; 21: 1170-4.

141. Maguire H, Dale JW, McHugh TD, Butcher PD, Gillespie SH, Costetsos A et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in London 1995–7 showing low rate of active transmission. *Thorax* 2002; 57: 617–622.
142. Marrero A, Caminero JA, Rodriguez R, Billo NE. Towards elimination of tuberculosis in a low income country: the experience of Cuba, 1962-1997. *Thorax* 2000; 55: 39-45.
143. Marrero A, Carrera L. Tuberculosis in Cuba. *Tuber Lung Dis* 1996; 77: S46.
144. Marrero A, Carreras L. El programa de control de la tuberculosis en Cuba. *Rev Cubana Med Gen Integr* 1996; 12: 381–5.
145. Martin C. Molecular typing in the investigation of outbreaks. *Tuber Lung Dis* 1996; 77: S18.
146. Mazurek GH, Cave MD, Eisenach KD, Wallace RJ, Bates JH, Crawford JT. Chromosomal DNA fingerprint patterns produced with *IS6110* as strain-specific markers for epidemiologic study of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2030-3.
147. McNerney R. TB: the return of the phage. A review of fifty years of mycobacteriophage research. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3: 179-84.
148. Menéndez M, González E, Rodriguez R. Analisis de la tendencia de las notificaciones por tuberculosis en Cuba. *Rev Cub Hig Epid* 1981; 19: 211-21.
149. Michele TM, Cronin WA, Graham MH, Dwyer DM, Pope DS. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* by a fiberoptic bronchoscope. Identification by DNA fingerprint. *JAMA* 1997; 278: 1093-5.
150. Ministerio de Salud Pública (MINSAP). Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. Cuba, 1995.
151. Ministerio de Salud Pública (MINSAP). Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. Cuba, 1999.
152. Mshana RN, Genet T, Getahun A, Miörner H. Use of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of rifampin-resistant in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1214-9.
153. Murray M. Sampling bias in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Emerg Infect Dis* 2002, 8: 363-9.

154. Niemann S, Riisch GS, Richter E. IS6110 fingerprinting of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Germany during 1995. J Clin Microbiol 1997; 35: 3015-20.
155. Nilsson LE, Hoffner SE, Ansehn S. Rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by bioluminescence assay of mycobacterial ATP. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32: 1208-12.
156. Nivin B, Nicholas P, Gayer M, Frieden T, Fujiwara P. A continuing outbreak of multidrug-resistant tuberculosis, with transmission in a Hospital Nursery. Clin Infect Dis 1998; 26: 303-7.
157. Onorato IM. Tuberculosis outbreaks in the United States. Int J Tuberc Lung Dis. 2000; 4: S121-6.
158. Organización Mundial de la Salud (OMS). Directrices para el tratamiento de la tuberculosis farmacorresistente. WHO/TUB/96. 210(Rev.1)S: 5-15, 1996.
159. Organización Mundial de la Salud (OMS). La OMS declara a la tuberculosis como una emergencia global (WHO/31, 23 de abril de 1993). En: Boletín Mensual SIDA/ETS. México. Sistema Nacional de Salud. Junio de 1993; 6: 2448-9.
160. Otal I, Martin C, Levy-Frébault VV, Thierry D y Gicquel B. Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis. J Clin Microbiol 1991; 29: 1252-4.
161. Otal I, Samper S, Asensio MP, Victoria MA, Rubio MC, Gómez LR, et al. Use of PCR method based an IS6110 polymorphism for typing *Mycobacterium tuberculosis*: strains from BACTEC cultures. J Clin Microbiol 1997; 35: 273-7.
162. Pablos-Méndez A, Raviglione MC, Laszlo A, Binkin N, Rieder HL, Bustreo F, et al. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. N Engl J Med 1998; 338: 1641-9.
163. Pablos-Méndez AP, Laszlo, A, Bustreo F, Benkin N, David L, Catherina SB et al. Anti-Tuberculosis drug resistance in the world. The WHO / IUATLD global proyect on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. World Health Organization. Ed.

- Stabilimento topográfico Ferrero-Romano Canavese, Italia pp 227, 1997.
164. Palittapongarnpim P, Luangsook P, Tansuphaswadikul S, Chuchottaworn C, Prachaktam R, Sathapatayavongs B. Restriction fragment length polymorphism study of *Mycobacterium tuberculosis* in Thailand using IS6110 as probe. *Tuber Lung Dis* 1997; 1: 370-6.
 165. Palomino JC, Novel rapid antimicrobial susceptibility tests for *Mycobacterium tuberculosis*. Chapter 9. In: Bastian I, Portaels F (eds.), *Multidrug-resistant tuberculosis*. Kluwer Academic Publ., The Netherlands, 2000.
 166. Palomino JC, Portaels F. Simple procedure for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using a commercial colorimetric assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999^a; 18: 380-3.
 167. Palomino JC, Traore H, Fissette K, Portaels F. Evaluation of mycobacteria growth indicator tube (MGIT) for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999^b; 3: 344-8.
 168. Park YK, Bai GH, Kim SJ. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from countries in the western pacific region. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 191-7.
 169. Patel S, Wall S y Saunders NA. Heminested inverse PCR for IS6110 fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1686-90.
 170. Pfyffer GE, Strässle A, Rose N, Wirth R, Brandli O, Shang H. Transmission of tuberculosis in the metropolitan area of Zurich: a 3 year survey based on DNA fingerprinting. *Eur Respir J* 1998; 11: 804-8.
 171. Pfyffer GE, Welscher HM, Kissling P, Cieslak C, Casal MJ, Gutierrez J, et al. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 364-8.
 172. Plikaytis BB, Crawford JT, Woodley CL, Butler WR, Eisenach KD, Cave MD. Rapid, amplification-based fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Gen Microbiol* 1993;139:1537-42.
 173. Plikaytis BB, Morden JL, Crawford JT, Woodley CL, Butter WR, Shinnick TM, et al. Multiplex PCR assay specific for the multidrug-resistant strain of *Mycobacterium*

- tuberculosis*. J Clin Microbiol 1994; 32: 1542-6.
174. Portaels F, Rigouts L, Bastian I. Addressing multidrug-resistant tuberculosis in penitentiary hospital and in the general population of the former Soviet Union. Int J Tuberc Lung Dis 1999; 3:S82-8.
 175. Portugal I, Covas MJ, Brum L, Viveiros M, Ferrinho P, Moniz-Pereira J, et al. Outbreak of multiple drug-resistant tuberculosis in Lisbon: detection by restriction fragment length polymorphism analysis. Int J Tuberc Lung Dis 1999; 3: 207-3.
 176. Pretorius GS, Sirgel FA, Schaaf HS, van Helden PD, Victor TC. Rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*-rapid detection and implications in chemotherapy. S Afr Med J 1996; 86: 50-5.
 177. Prodinger WM, Bunyaratvej P, Prachaktam R, Pavlic M. *Mycobacterium tuberculosis* isolates of Beijing genotype in Thailand. Emerg Infect Dis 2001; 7: 483-4.
 178. Qian L, van Embden JD, van der Zanden AG, Weltevreden EF, Duanmu H, Douglas JT. Retrospective analysis of the Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis* in preserved lung tissues. J Clin Microbiol 1999; 37: 471-4.
 179. Rasolofo-Razanamparany V, Ramarokoto H, Auregan G, Gicquel B, Chanteau S. A combination of two genetic markers is sufficient for restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex in areas with a high incidence of tuberculosis. J Clin Microbiol 2001; 39: 1530-5.
 180. Raviglione MC. The global epidemiology of tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 2001; 5: S7-8.
 181. Raviglione MC. What is the current situation of TB/HIV?. Tuber Lung Dis 1996; 77: 13-4.
 182. Raviglione MC, Dye D, Schmidt S, Kochi A. Assessment of worldwide tuberculosis control. WHO global surveillance and monitoring project. Lancet 1997; 350: 624-9.
 183. Reisner BS, Gatson AM, Woods GL. Evaluation of mycobacteria growth indicator tubes for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin. Diagn Microbiol Infect Dis 1995; 22: 325-9.

184. Reves R, Blakey D, Snider DE, Farer LS. Transmission of multidrug-resistant tuberculosis: report of a school and community outbreak. *Am J Epidemiol* 1981; 113: 423-35.
185. Ridzon R, Joseph HK, Valway S, Weismuller P, Maxwell R, Elcock M. Outbreak of drug-resistant tuberculosis with second-generation transmission in a high school in California. *J Pediatr* 1997; 131: 863-8.
186. Rieder HL. Bases epidemiológicas del control de la tuberculosis, 1^{ra} Ed., Paris, Francia: Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER), 1999.
187. Riska PF, Su Y, Bardarov S, Freundlich L, Sarkis G, Hatfull G, et al. Rapid film-based determination of antibiotic susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* strains by using a luciferase reporter phage and the Bronx Box. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1144-9.
188. Roberts GD, Goodman NL, Heifets L, Larsh HW, Lindner TH, McClatchy JK, et al. Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens. *J Clin Microbiol* 1983; 18: 689-96.
189. Roca GR. Tuberculosis pulmonar. Temas de Medicina Interna. 3ra ed. Tomo I. Cuba: Pueblo y Educación; 1985.p. 212-9.
190. Ross BC, Raios K, Jackson K y Dwyer B. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 942-6.
191. Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, Mijs W, Jannes G, De Rijk P, et al. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2093-8.
192. Safi H, Aznar J, Palomares JC. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated during a 3-year period (1993 to 1995) in Seville, Spain. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2472-6.

193. Samper S, Iglesias MJ, Rabanaque MJ, Lezcano MA, Vitoria LA, Rubio MC, et al. The molecular epidemiology of tuberculosis in Zaragoza, Spain: a retrospective epidemiology study in 1993. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2: 281-7.
194. Samper S, Martin C, Pinedo A, Rivero A, Blázquez J, Baquero F, et al. Transmission between HIV-infected patients of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. *AIDS* 1997; 11: 1237-42.
195. Scarpellini P, Braglia S, Brambilla AM, Dalessandro M, Cichero P, Gori A, et al. Detection of rifampin resistance by single-strand conformation polymorphism analysis of cerebrospinal fluid of patients with tuberculosis of the central nervous system. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2802-6.
196. Schaberg T, Gloger G, Reichert B, Mauch H, Lode H. Drug-resistant pulmonary tuberculosis in Berlin, Germany, 1987-1993. *Eur Respir J* 1995; 8: 278-84.
197. Sêbek M. DNA fingerprinting and contact investigation. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4: S45-8.
198. Selwyn PA, Hartel D, Lewis VA, Schoenbaum EE, Vermund SH, Klein RS, et al. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug user with human immunodeficiency virus infection. *New Engl J Med* 1989; 320: 545-50.
199. Shawar RM, Humble DJ, van Dalmsen JM, Stover CK, Hickey MJ, Steele S, et al. Rapid screening of natural products for antimycobacterial activity by using luciferase-expressing strains of *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium intracellulare*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 570-4.
200. Sheldon M, Han B, Suffys P, Portillo L, Fairchok M, Rouse D. Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1995; 171: 954-60.
201. Shinnick TM, Good RC. Diagnostic mycobacteriology laboratory practices. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 291-9.
202. Siddiqui SH, Libonati JP, Middlebrook G. Evaluation of rapid radiometric method for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1981; 13: 908-12.

203. Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, 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.
204. Small PM, McClenny NB, Singh SP, Schoolnik GK, Tompkins LS, Mickelsen PA. Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis* to confirm cross-contamination in the mycobacteriology laboratory and modification of procedures to minimize occurrence of false-positive cultures. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1677-82.
205. Small PM, van Embden JDA. Molecular epidemiology of tuberculosis. En: Bloom BR, ed. *Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control*. Washington D.C: American Society for Microbiology, 1994: 569-82.
206. Smith PG, Moss AR. Epidemiology of Tuberculosis. En: Bloom BR, editors. *Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control*. Washington D.C.: American Society for Microbiology; 1994. p. 47-57.
207. Snider DE, Jones WD, Good RC. The usefulness of phage typing *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Am Rev Respir Dis* 1994; 130: 1095-9.
208. Soini H, Pan X, Amin A, Graviss EA, Siddiqui A, Musser JM. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in Houston, Texas, by spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 669-76.
209. Sola C, Devallois A, Horgen L, Maisetti J, Filliol I, Legrand E, et al. Tuberculosis in the Caribbean: using spacer oligonucleotide typing to understand strain origin and transmission. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 404-14.
210. Sola C, Ferdinand S, Mammina C, Nastasi A, Rastogi N. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Sicily based on Spoligotyping and variable number of tandem DNA repeats and comparison with a Spoligotyping database for population-based analysis. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 1559-65.
211. Spidola de Miranda S, Drout E, Kritski AL, Peillon R, Panteix G y Gantijo PP. Similar patterns of polymorphism between Brazilian and French *Mycobacterium tuberculosis* strains demonstrated by using IS6110-RFLP. *Tuber Lung Dis* 1996; 77: 116.

212. Sreevatsan S, Bookout JB, Ringpis FM, Mogazeh SL, Kreiswirth BN, Pottathil RR, et al. Comparative evaluation of cleavase fragment length polymorphism with PCR-SSCP and PCR-RFLP to detect antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Diagn 1998; 3: 81-91.
213. Srivastava R, Deb DK, Srivastava KK, Loch C, Srivastava BS. Green fluorescent protein as a reporter in rapid screening of antituberculosis compounds in vitro and in macrophages. Biochem Biophys Res Commun 1998; 253: 431-6.
214. Stead WW, Bates JH. Recurrent tuberculosis due to exogenous reinfection. N Engl J Med 2000; 342: 1050.
215. Sterling TR, Thompson D, Stanley RL, McElroy PD, Madison A, Moore K, et al. A multi-state outbreak of tuberculosis among members of a highly mobile social network: implications for tuberculosis elimination. Int J Tuberc Lung Dis 2000; 4: 1066-73.
216. Strässle A, Putnik J, Weber R, Fehr MA, Weist J, Pfyffer GE. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in a Human Immunodeficiency Virus cohort in Switzerland. J Clin Microbiol 1997; 35: 374-8.
217. Styblo K, Enarson D. The impact of HIV infection on the global epidemiology of tuberculosis. Bull Int Union Tuberc Lung Dis 1991; 66: 27-32.
218. Suffys PN, Ivens de Araujo ME, Degrave WM. The changing face of the epidemiology of tuberculosis due to molecular strain typing-a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 1997; 92: 297-316.
219. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Loch C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. J Clin Microbiol 2001; 39: 3563-71.
220. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet 1993^a; 341: 647-50.

221. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Schmidheini T, Bodmer T. Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993^b; 37: 2054-8.
222. Telzak EE, Sepkowitz K, Alpert P, Mannheimer S, Medard F, el-Sadr W, et al. Multidrug-resistant tuberculosis in patients without HIV infection. *N Engl J Med*. 1995; 333: 907-11.
223. Thierry D, Brisson NA, Levy-Fréubault VV, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110 and its application in diagnostic. *J Clin Microbiol* 1990^a; 28: 2668-73.
224. Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH, Gicquel B, et al. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res* 1990^b; 18: 188.
225. Trakas K, Stosor V, Dietrich S, Mosher L, Warren JR. Persistent tuberculosis or specimen contamination? *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 902-3.
226. Troesch A, Nguyen H, Miyada CG, Desvarenne S, Gingeras TR, Kaplan PM, et al. *Mycobacterium* species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 49-55.
227. Valway SE, Greifinger RB, Papania M, Kilburn JO, Woodley C, DiFerdinando GT, et al. Multidrug-resistant tuberculosis in the New York State prison system, 1990-1991. *J Infect Dis* 1994^a; 170: 151-6.
228. Valway SE, Richards SB, Kovacovich J, Greifinger RB, Crawford JT, Dooley SW. Outbreak of multi-drug-resistant tuberculosis in a New York State prison, 1991. *Am J Epidemiol* 1994^b; 140: 113-22.
229. Van Crevel R, Nelwan RHH, de Lenne W, Veeraragu Y, van der Zanden AG, Amin Z, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains associated with febrile response to treatment. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 1-4.
230. Van Deutekom H, Gerritsen JJJ, van Soolingen D, van Ameijden EJC, van Embden JDA, Coutinho RA. A molecular epidemiological approach to studying the transmission of tuberculosis in Amsterdam. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 1071-7.

231. Van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardised methodology. J Clin Microbiol 1993; 31: 406-9.
232. Van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. J Intern Med 2001; 249: 1-26.
233. Van Soolingen, D, Borgdorff MW, de Haas PEW, Kremer K, Veen J, Sêbek MGG, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in The Netherlands: a nationwide study during 1993 through 1997. J Infect Dis 1999; 180: 726-36.
234. Van Soolingen D, de Haas PEW, Hermans PWM, Groenen PMA, van Embden JDA. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1993; 31: 1987-95.
235. Van Soolingen D, de Haas P, Kremer K. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of mycobacteria. Protocol. RIVM. The Netherlands. 2002.
236. Van Soolingen D, Hermans PW. Epidemiology of tuberculosis by DNA fingerprinting. Eur Respir J Suppl 1995; 20: 649-56.
237. Van Soolingen D, Hermans PWM, de Haas PEW, Soll DR, van Embden JDA. 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.
238. Van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, van Embden JD Insertion element IS1081-associated restriction fragment length polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. J Clin Microbiol 1992; 30: 1772-7.
239. Van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. J Clin Microbiol 1995; 33: 3234-8.
240. Varnerot A, Clement F, Gheorghin M, Levy-Frêbault VV. Pulse field gel electrophoresis of representative of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains. FEMS Microbiol Letters 1992; 98: 155-60.

241. Vogetseder W, Fille M, Patscheider S, Dierich MP, Allerberger F. Molecular epidemiology of tuberculosis in Austria. *Clin Investig* 1994; 72: 107-10.
242. Vynnycky E, Nagelkerke N, Borgdorff MW, van Soolingen D, van Embden JDA, Fine PEM: The effect of age and study duration on the relationship between 'clustering' of DNA fingerprint patterns and the proportion of tuberculosis disease attributable to recent transmission. *Epidemiol Infec* 2001; 126: 43-62.
243. Waecker Jr NJ, Stefanova R, Cave MD, Davies CE, Dankner WM. Nosocomial transmission of *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin to children receiving therapy and to their health care providers. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 356-62.
244. Walker GT, Nadeau JG, Spears PA, Schram JL, Nycz CM, Shank DD. Multiplex strand displacement amplification (SDA) and detection of DNA sequences from *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *Nucl Acid Res* 1994; 22: 2670-7.
245. Wallace TM. Tuberculosis in the 1990s. *Advances in chest Radiology. Radiol Clin North Amer* 1994; 32: 649-61.
246. Walters SB, Hanna BA. Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin by Mycobacterium growth indicator tube method. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1565-7.
247. Warren R, Richardson M, Sampson S, Hauman JH, Beyers N, Donald PR, van Helden PD. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* with additional markers enhances accuracy in epidemiological studies. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2219-24.
248. Wiid IJ, Werely C, Beyers N, Donald P, van Helden PD. Oligonucleotide (GTG)₅ as a marker for *Mycobacterium tuberculosis* strain identification. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1318-21.
249. Williams DL, Spring L, Gillis TP, Salfinger M, Persing DH. Evaluation of a polymerase chain reaction-based universal heteroduplex generator assay for direct detection of rifampin susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 446-50.

250. Wilson SM, al-Suwaidi Z, McNerney R, Porter J, Drobniewski F. Evaluation of a new rapid bacteriophage-based method for the drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Med 1997; 3: 465-8.
251. Wobeser W, Broukhanski G, Hoepfner V, Jamieson FB. Application of a commercial DNA typing kit (Isogen) for analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from remote Northern Canadian communities. Int J Tuberc Lung Dis 2000; 4: S105.
252. Wolenisky E. Tuberculosis. En: Wyngaar der JB, Smith LH, Bennett JC, editors. Cecil TextBook of Medicine. 19ed. Tomo II. Philadelphia: WB Saunders; 1992. p. 1733-42.
253. World Health Organization (WHO). A global emergency Geneva: World Health Organization. WHO TB 1994. p. 177.
254. World Health Organization (WHO). Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World: TheWHO/IUTLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance 1994-1997. WHO/TB/97.229. Geneva: World Health Organization, 1997.
255. World Health Organization (WHO). Guidelines for tuberculosis treatment in adults and children in National Tuberculosis Programmes 1991. WHO/TUB/91; 161: 3-6.
256. World Health Organization (WHO). WHO tuberculosis programme: framework for effective tuberculosis control. WHO/TB/94.179. Geneva: World Health Organization, 1994.
257. World Health Organization (WHO). Tuberculosis control and research strategies for the 1990s. Memorandum from WHO meeting. Bull WHO 1992; 70: 17-21.
258. Yang Z. Molecular epidemiology of tuberculosis. Frontiers Biosci 2003; 8: 440-50.
259. Yang Z, Barnes PF, Chaves F, Eisenach KD, Weis SE, Bates JH, Cave MD. Diversity of DNA fingerprints of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States. J Clin Microbiol 1998; 36: 1003-7.
260. Yang ZH, de Haas PE, van Soolingen D, van Embden JD, Andersen AB. Restriction fragment length polymorphism *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from Greenland during 1992: evidence of tuberculosis transmission between Greenland and Denmark. J Clin Microbiol 1994; 32: 3018-25.

261. Yang ZH, de Haas PEW, Wachmann CH, van Soolingen D, van Embden JDA, Andersen AB. Molecular epidemiology of tuberculosis in Denmark in 1992. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2077-81.
262. Yuen L K W, Ross B C, Jackson K M, Dwyer B. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1615-8.
263. Zhang Y, Mazurek GH, Cave DM, Eisenach KD, Pang Y, Murphy DT y Wallace Jr RJ. DNA polymorphisms in strains of *Mycobacterium tuberculosis* analyzed by pulsed field gel electrophoresis: a tool for epidemiology. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1551-6.

ANEXOS

ANEXO 1 – Protocolos de trabajo

TIPIFICACION DE *M. TUBERCULOSIS* POR RFLP-IS6110
(Adaptado del Protocolo de Van Soolingen et al., RFLP typing of Mycobacteria. 2002)

I- Método de purificación de ADN de micobacterias.

- 1- Inocular la cepa de interés en un tubo de medio Löwestein Jensen utilizando un gabinete biológico de seguridad clase II GELAIRE BSB₄A (Flow Laboratories, Inglaterra).
- 2- Incubar los tubos a 37°C hasta crecimiento óptimo en una incubadora Memmert (Alemania).
- 3- Transferir 1-2 asadas de masa bacteriana a un tubo limpio con 400 µl de solución TE.
- 4- Calentar los tubos a 80°C por 30 min en un Recirculador Termostatado Multitemp II (Farmacia, Suecia). Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- 5- Añadir 50 µl de Lisozima (10 mg/ml). Agitar en Vórtex Spinmix™ (Gallenkamp, Inglaterra) e incubar al menos 1 h a 37°C en un baño termostatado Gallenkamp (Inglaterra).
- 6- Adicionar 70 µl de SDS (10%) y 5 µl de Proteina sa K. Vórtex e incubar 10 min a 65°C.
- 7- Añadir 100 µl de NaCl 5M sin quitar las muestras de 65°C. Mezclar bien.
- 8- Adicionar 100 µl de la solución CTAB/NaCl (incubada a 65°C). Vórtex hasta que el líquido se ponga blanco "**lechoso**". Incubar 10 min a 65°C.
- 9- Añadir igual volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (650 µl). VORTEX por 20 seg. Centrifugar a 12000 rpm x 5 min a temperatura ambiente.
- 10- Transferir cuidadosamente la fase acuosa (fase superior) a un tubo limpio.
- 11- Precipitar el ADN con 0.6 volúmenes de Isopropanol (420 µl). Incubar 30 min a -20°C.
- 12- Centrifugue a 12000 rpm x 15 min a temperatura ambiente en una microcentrífuga Sigma 201 M. (Sigma, Alemania).
- 13- Desechar el sobrenadante y adicionar 700 µl de Etanol al 70%.
- 14- Centrifugue a 12000 rpm x 5 min a temperatura ambiente.
- 15- Desechar el sobrenadante y secar el precipitado (20 min en gabinete GELAIRE BSB₄A).
- 16- Resuspender el precipitado en 20 µl o más de solución TE (en dependencia del tamaño del precipitado). Guardar a 4°C hasta su uso.

II- Determinación de la concentración del ADN purificado por espectrofotometría.

- 1- Encender el espectrofotómetro 8625 (Philips, Inglaterra) y colocar la longitud de onda del equipo a 260 nm.
- 2- Diluir las muestras 1/100 en H₂O bidestilada (2 µl de ADN en 200 µl de solución).

3- Ajustar el cero del equipo con el blanco (H₂O bid.) y medir la absorbancia de todas las muestras.

4- Utilizar la siguiente fórmula para calcular la concentración de ADN:

$$\text{Absorbancia de la muestra} \times \text{dilución} \times 50 = \text{Concentración de ADN } (\mu\text{g/ml})$$

5- Emplear la siguiente fórmula para calcular la cantidad de ADN necesaria para la digestión:

$$4500/\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g/ml}) = \mu\text{l ADN}$$

III- Digestión de ADN cromosomal con la enzima Pvu II.

1- Digerir 4,5 μg de ADN de cada muestra (según volumen calculado) con 10 unidades de la enzima Pvu II en un volumen final de 20 μl .

$$\begin{array}{r} X \mu\text{l} \text{ H}_2\text{O bidest.} \\ 2 \mu\text{l} \text{ Buffer 10X} \\ 1 \mu\text{l} \text{ Pvu II (10 U/\mu l)} \\ Y \mu\text{l} \text{ ADN (4,5 } \mu\text{g)} \\ \text{-----} \\ 20 \mu\text{l} \end{array}$$

Mezclar bien y dar un golpe de centrifuga.

2- Incubar 1 hora a 37°C.

3- Añadir 5 μl de azul ADN a cada muestra digerida.

III- Separación de los fragmentos de ADN por electroforesis.

A- Estimación de la concentración de las muestras digeridas.

1- Pesar 0.4 g de agarosa para ADN/ARN y añadirle 50 ml de buffer TBE. Calentar el buffer con la agarosa hasta su total disolución. Dejar refrescar unos minutos y adicionarle 50 μl de bromuro de etidio (1000X).

2- Preparar el molde del gel (7 x 10 cm) con su peine (12 pocillos). Verter 30 ml de la agarosa disuelta (aproximadamente) en el molde del gel y dejar solidificar bien.

3- Quitar el peine y colocar el gel en la minicámara de electroforesis submarina HE33 (Hofer Scientific Instruments, EE.UU.) con buffer TBE con bromuro de etidio en su interior.

4- Aplicar 5 μl de cada muestra dentro de un pocillo diferente del gel.

5- Tapar la minicámara de electroforesis submarina, conectarla a la fuente de poder EPS 400 (Pharmacia, Suecia) y hacer una corrida electroforética de 20 min a 100 V.

6- Localizar el gel en el transiluminador UV N90 MW 312 nm (Konrad Benda, Alemania), comparar la concentración de ADN digerido de cada muestra y estimar el volumen necesario para la electroforesis final. (alrededor de 2 μg en cada línea).

B- Electroforesis del gel para la Transferencia (o Southern blotting).

- 1- Pesar 1.6 g de agarosa para ADN/ARN y añadirle 200 ml de buffer TBE. Calentar el buffer con agarosa hasta su total disolución. Dejar refrescar unos minutos y adicionarle 200 µl de bromuro de etidio (1000X).
- 2- Preparar el molde del gel (14,5 x 20 cm) con su peine (16 pocillos). Vertir los 200 ml de la agarosa disuelta en el molde del gel y dejar solidificar bien.
- 3- Cuando el gel esté bien sólido, quitar el peine y colocarlo en la cámara de electroforesis submarina MaxTM HE 99 (Hoefer Scientific Instruments), que debe tener en su interior buffer TBE con bromuro de etidio al 0.5 µg/ml.
- 4- Aplicar 5 µl del marcador de peso molecular (*Lambda-HindIII* / *PhiX174-HaeIII*) en el primer pocillo del gel.
- 5- Depositar en el segundo y último pocillo el volumen calculado previamente de la cepa de referencia (2 µg de ADN aproximadamente).
- 6- Aplicar ahora las cantidades determinadas para cada muestra, dentro de un pocillo diferente del gel.
- 7- Tapar la minicámara de electroforesis submarina, conectarla a la fuente de poder EPS 400 (Farmacia) y hacer una corrida electroforética a 30 V toda la noche.
- 7- Localizar (al siguiente día) el gel en el transiluminador UV N90 MW 312 nm (Konrad Benda) y chequear la migración electroforética de las muestras.
- 8- Detenga la electroforesis cuando la banda de 2 Kb del marcador de peso molecular arribe a 7.0 cm (± 0.4 cm).
- 9- Tome una fotografía del gel sobre el transiluminador UV.

IV- Transferencia de los fragmentos de ADN de gel a membrana.

A- Tratamiento del gel para la transferencia.

- 1- Exponga el gel sobre luz UV por 5 min.
- 2- Depositar el gel en una bandeja con 500 ml de HCl 0.25 M por 10 min.
- 3- Desechar la solución y lavar con H₂O bidestilada por 10 seg.
- 4- Colocar el gel en una bandeja con 500 ml de NaOH 0.4 M por 20 min.
- 5- Desechar la solución y lavar con H₂O bidestilada por 10 seg.
- 6- Tratar el gel de nuevo con otros 500 ml de NaOH 0.4 M por 20 min.

B- Transferencia por el método de vacío (Blotting alcalino).

- 1- Cortar 4 papeles de filtro Whatman 3MM (o equivalente) del tamaño del gel, un pedazo de membrana Hybond-N+ (Amersham, Inglaterra) del tamaño del gel (exactamente).
- 2- Humedecer los papeles de filtro y la membrana en la solución de transferencia.
- 3- Colocar en el equipo de vacío Christ-Alpha 1-4 (Blanc-Labo S.A, Suiza) un papel de filtro humedecido y encima de este la membrana también humedecida.
- 4- Localizar arriba de la membrana el gel haciendo coincidir la esquina cortada en cada caso. Poner encima los 3 papeles restantes.
- 5- Poner la cubierta el equipo de vacío, conectar el equipo y cerciorarse de que hace buen vacío. Realizar la transferencia por 1h.
- 6- Separar la membrana de los papeles de filtro y el gel. Poner a secarla a 37°C por 30 min.
- 7- Colocar la membrana en luz ultravioleta durante 5 min por cada cara.
- 8- Esta membrana puede ser utilizada inmediatamente o se puede sellar en bolsa de nylon y guardar a 4°C hasta su uso.

V-Preparación de la sonda para hibridación.

A- Obtención de la sonda por la técnica de PCR.

- 1- Preparación de la mezcla de reacción (para cada muestra):

Buffer Taq polimerasa 10X	5 µl
Mezcla de dNTP (cada dNTP a 2.5 mM)	4 µl
Primer INS-1 (50 ng/µl)	5 µl
Primer INS-2 (50 ng/µl)	5 µl
- 9- Adicionar 0.25 µl de Taq polimerasa (1.25 U) por reacción a la mezcla de PCR. Vortex con SpinmixTM (Gallenkamp) y mantener en hielo.
- 10- Transferir alicuotas de 20 µl de la mezcla de reacción a tubos limpios y adicionar 30 µl de la solución de ADN-muestra (1 ng de ADN) a la mezcla.
- 11- Mezclar y dar un golpe de centrifuga en equipo Sigma 201 M (Sigma). Mantener las muestras en hielo hasta su uso.
- 12- Encender el equipo MiniCyclerTM PTC 150 (MJ Research Inc., EE.UU.) e instalar el siguiente programa:

3 min 94°C	
1 min 94°C	}
1 min 65°C	} 25 ciclos
2 min 72°C	}
4 min 72°C	}
- 13- Analizar el resultado de la amplificación por electroforesis en geles de agarosa al 1.2 % en TBE (ver sección III - Electroforesis) o guardar las muestras a -20°C.

B- Purificación de la sonda por Cromatografía de Filtración Molecular (según el protocolo Wizard PCR Preps DNA Purification System, PROMEGA, EE.UU.).

- 1- Transferir la fase acuosa (inferior) a tubo limpio.
- 2- Adicionar 100 µl de buffer de purificación directa. Dar vórtex breve.
- 3- Adicionar 1 ml de la resina y dar vórtex breves (3 X 1min).
- 4- Preparar una columna Wizard para cada muestra a purificar. Tomar una jeringuilla de 5ml y quitarle el embolo. Colocar este en la minicolumna.
- 5- Añadir la mezcla resina/ADN en la base de la jeringuilla. Insertar el embolo y empujar suavemente la resina/ADN dentro de la columna.
- 6- Lavar la columna con 2 ml de Isopropanol al 80%.
- 7- Colocar la minicolumna en un tubo de 1.5 ml y centrifugar 20 seg a 12 000 rpm (Sigma 201 M, Sigma).
- 8- Transfiera la columna a tubo limpio y aplique 50 µl de H₂O o buffer TE 1X.
- 9- Espere un min y centrifugue de nuevo la columna. Tome la solución eluída (ADN) y consérvela a 4°C (por poco tiempo) o a -20°C.

VI- Hibridación y detección de los fragmentos de ADN (Sistema no radiactivo ECL, Amersham).

A- Marcaje no radiactivo de la sonda.

- 1- Diluir la sonda a 10 ng/µl con H₂O bidestilada.
- 2- Calentar 100 ng (10 µl) de sonda a 95-100°C por 5 min. Enfriar inmediatamente el ADN en hielo. Dar un golpe de centrifuga.
- 3- Añadir igual volumen (10 µl) de reactivo de marcaje y mezclar suave pipeteando sucesivamente.
- 4- Adicionar igual volumen de glutaraldehído (10 µl). Idem 5. Dar un golpe de centrifuga.
- 5- Incubar por 10 min a 37°C en un baño Gallenkamp.
- 6- Si no se va a usar la sonda inmediatamente se puede guardar a -20°C por varios meses.

B- Hibridación de los fragmentos de ADN.

- 1- Preparar el buffer de hibridación según el tamaño de la membrana (De 0.125 a 0.25ml/cm²).
- 2- Tomar una cantidad adecuada de buffer de hibridación y adicionar NaCl a una concentración final de 0.5 M.
- 3- Añadir el agente bloqueante, poco a poco, hasta una concentración de 5%.

- 4- Mezclar rápida y abundantemente (con agitador magnético) hasta obtener una suspensión fina.
- 5- Calentar a 42°C de 30-60 min agitando ocasionalmente.
- 6- Poner la membrana en la solución de prehibridación (precalentada) e incubar de 15-60 min, agitando suavemente.
- 7- Sacar la membrana de la solución para añadir la sonda. Mezclar bien y poner el filtro nuevamente en contacto con la solución.
- 8- Incubar a 42°C toda la noche a 6 rpm en un horno de hibridación RPN 2510 (Amersham).

C- Lavado de la membrana.

- 1- Desechar el buffer de hibridación.
- 2- Añadir el buffer de lavado primario (precalentado) en un volumen de 2-5 ml/cm² de membrana. Incubar 20 min a 42°C con agitación suave.
- 3- Descartar la solución anterior y repetir el lavado con buffer fresco.
- 4- Desechar la solución de lavado primario.
- 5- Adicionar buffer de lavado secundario e incubar a temperatura ambiente por 5 min con agitación suave.
- 6- Descartar dicha solución y repetir el paso anterior.

D- Detección de la señal (en cuarto oscuro).

- 1- Mezclar en igual proporción los Reactivos 1 y 2 para obtener suficiente volumen de solución (0.125 ml/cm²).
- 2- Apagar la luz blanca y encender la infrarroja. Preparar los filmes ECL (Amersham) a utilizar.
- 3- Sacar la membrana del buffer de lavado secundario y ponerla en una bandeja limpia con la cara de los fragmentos de ADN hacia arriba.
- 4- Añadir la mezcla de Reactivos 1 y 2 y agitar suavemente durante un minuto a temperatura ambiente.
- 5- Eliminar la mezcla anterior y envolver la membrana en película plástica adherente, evitando las burbujas de aire.
- 6- Poner la membrana en un cassette de Autorradiografía ECL (Amersham).
- 7- Tomar un filme fotosensible y colocarlo sobre la cara de la membrana que tiene el ADN.
- 8- Cerrar el cassette y esperar un minuto.
- 9- Revelar el filme con líquidos reveladores de fotografía.

VII- Preparación de soluciones.

1. Solución TE (Tris 10 mmol/l, EDTA 1 mmol/l).

Pesar 1.2 g de Tris-base y 372 mg de EDTA Disolver en 800 ml de agua destilada, ajustar el pH a 8 y completar el volumen a un litro con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos Almacenar a 4°C.

2. Solución de lisozima.

Pesar 10 mg de lisozima (Sigma, EE.UU.) y disolver en 1 ml de agua destilada. Almacenar a -20°C.

3. SDS 10 % (Duodecilsulfato de sodio o Laurilsulfato de sodio).

Pesar 11.11 g de SDS al 90% (Riedel-de Haën, Alemania) y disolver en 100 ml de agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

4. Solución de proteinasa K.

Pesar 10 mg de proteinasa K (Sigma, EE.UU.) y disolver en 1 ml de agua destilada. Almacenar a -20°C.

5. NaCl 5 mol/l.

Pesar 29.2 g de NaCl y disolver en 100 ml de agua destilada. Esterilizar en autoclave por 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.

6. Solución de CTAB/NaCl.

Pesar 4.1g de NaCl y 10g de CTAB (Bromuro de N-hexadecil N,N,N-trimetil amonio) (Sigma) y disolver en 80ml de agua destilada (calentando a 65°C). Ajustar a 100 ml con agua destilada y almacenar a temperatura ambiente.

7. Etanol al 70%.

Mezclar 70 ml de etanol absoluto con 30 ml de agua bidestilada. Almacenar a 4°C.

8. Buffer de muestra o Azul ADN (5X).

Pesar 0.3 g de Tris-base, 0.1 g EDTA y 25 mg de bromofenol azul. Disolver en 3 ml de agua destilada. Añadir 5 ml de glicerol. Ajustar el pH a 8 en un pHmetro y llevar a 10 ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave por 15 min.

9. Buffer TBE (Tris-borato-EDTA).

Pesar 10.8 g de Tris-base (Sigma), 5.5 g de Acido Bórico y 0.74 g de EDTA. Disolver en 800 ml de agua destilada, ajustar el pH a 8 y llevar el volumen a 1000 ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

10. Bromuro de Etidio (EtBr) 10 mg/ml.

Disolver 0.1 g de EtBr (Sigma) en 10 ml de agua destilada. Almacenar a 4°C.

11. HCl (0.25 mol/l) (Solución de depurinación).

Tomar 21.4 ml de HCl (37 %) y adicionarle 978.6 ml de agua destilada. Guardar a temperatura ambiente.

12. NaOH (0.4mol/l).

Pesar 16 g de NaOH y disolver en 800 ml de agua destilada, luego completar hasta 1l.

13. Solución desnaturalizadora.

Disolver 87.66 g de NaCl y 20 g de NaOH en 800 ml de agua destilada, luego completar hasta 1l.

14. Solución neutralizadora.

Disolver 87.66 g de NaCl y 60.55 g de Tris base en 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7.5 con HCl y luego completar hasta 1l.

15. SSC 20X.

Pesar 17.53 g de NaCl y 88.2 g de citrato de sodio. Disolver en 80 ml de agua destilada. Ajustar a pH 7.0 con NaOH 5M y llevar a 100 ml. Esterilizar en autoclave por 15 min.

16. Solución de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP) a 0.2 mM.

Tomar 10 µl de cada dNTP (soluciones de dATP, dCTP, dGTP, dTTP a 100 mM, Sigma) y añadir 360 µl de agua destilada. Guardar en alicuotas a -20°C.

17. Solución de lavado primario.

Mezclar 360 g de urea con 4 g de SDS y 25 ml de SSC 20X. Completar a 1l con agua destilada. Filtrar por membrana de 0.2 µm.

VIII- Otros materiales utilizados.

ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y MODIFICACIÓN

- 1- Pvu II (Boehringer Mannheim, Alemania)
Condiciones de incubación: Tris/HCl 10 mmol/l, NaCl 50 mmol/l, MgCl₂ 10 mmol/l
Ditioeritrol 1 mmol/l, pH 8.0, 37°C.
- 2- Taq Polimerasa (Boehringer Mannheim)
Condiciones de incubación: Tris HCl 100 mmol/l, MgCl₂ 15 mmol/l, KCl 500 mmol/l,
Gelatina 1 mg/ml. pH 8.3, 72°C.

OLIGONUCLEOTIDOS (PRIMERS) PARA SINTETIZAR LA SONDA IS6110.

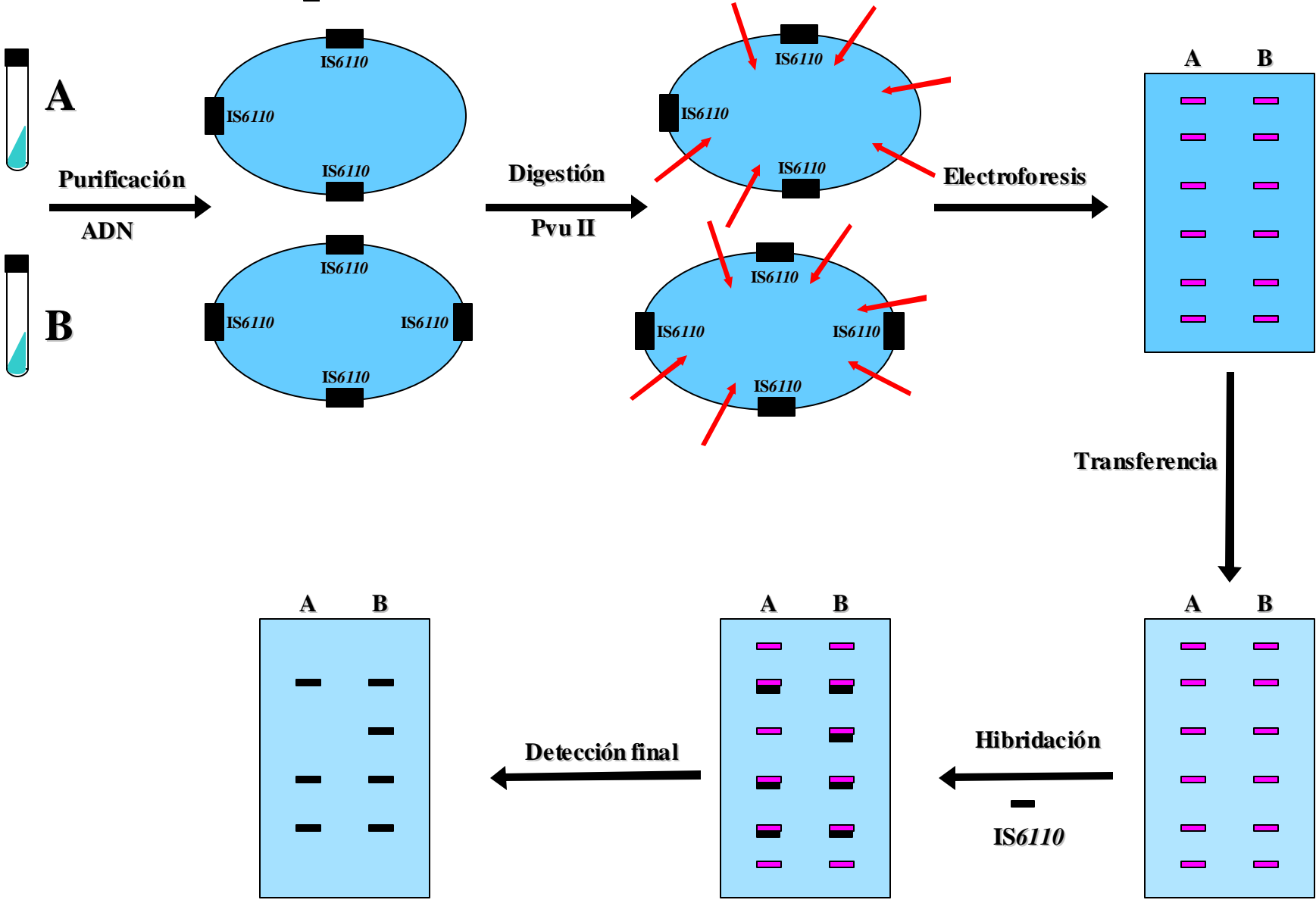
- 1- Primer INS-1 : 5' CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC 3'
- 2- Primer INS-2 : 5' GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA 3'

MARCADORES DE PESO MOLECULAR

Fago Lambda digerido con la enzima Hind III + Plásmido pBR 322 digerido con la enzima Alu II. (Tamaño de los fragmentos en kilobases).

23.130
9.416
6.557
4.361
2.322
2.027
0.910
0.659
0.656
0.564
0.521
0.403
0.281
0.257
0.226
0.136
0.124
0.100
0.063
0.057
0.049
0.019
0.015
0.011

Esquema de RFLP-IS6110



TIPIFICACION DE *M. TUBERCULOSIS* POR SPOLIGOTYPING **(Adaptado del Protocolo de Kremer et al. Spoligotyping. 2002)**

I- Preparación de la membrana con los oligonucleótidos espaciadores.

1. Diluir los oligonucleótidos espaciadores a las concentraciones óptimas (Tabla 1) en 150 µl de NaHCO₃ 500mM, pH 8.4.
2. Poner la membrana Biodyne C (Pall Biosupport, EE.UU.) por 10 min en 10 ml de 1-etil-3(3 dimetiaminopropil) carbodiimida (EDAC) (Sigma, EE.UU.) al 16% (p/v) en agua destilada.
3. Colocar la membrana en un recipiente plástico con agua destilada, agitar por 2 min y luego colocarla sobre una almohadilla descartable en el miniblatter MN45 (Immunitics, EE.UU.).
4. Cargar los pozos del miniblatter con 150 µl de cada oligonucleótido (menos 1ro y último).
5. En el primero y último pozo cargar con tinta diluida 1:100 en tampón SSPE 2x para delimitar los bordes del área de uso.
6. Luego de llenar todas las líneas incubar 2 minutos a temperatura ambiente.
7. Retirar las soluciones de oligonucleótidos por aspiración en el mismo orden en que fueron adicionadas en los pozos.
8. Retirar la membrana del miniblatter e incubarla en 250 ml de NaOH 100 mM en un recipiente plástico con agitación durante 10 minutos (máximo) para inactivar la membrana.
9. Enjuagar la membrana con agua destilada.
10. Lavar la membrana en un recipiente plástico con agitación suave en 250 ml de SSPE 2x, SDS 1% durante 5 minutos a 60°C.
11. Lavar la membrana en un recipiente plástico (agitación suave) en 100 ml de EDTA 20 mM pH 8 por 15 minutos a temperatura ambiente.
12. Conservar la membrana a 4°C hasta su uso (sellada).

II- Amplificación in vitro del ADN de los espaciadores mediante PCR

1. Diluir la muestra de ADN a la concentración requerida. Incluir siempre ADN cromosómico de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG como controles positivos y agua como control negativo.
2. Preparar la mezcla de reacción:
 - x µl ADN templado (10 ng)
 - 4 µl cebador DRa (20pmol) (5'-GGT TTT GGG TCT GAC GAC-3', biotinilado en 5')
 - 4 µl cebador DRb (20pmol) (5'-CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3')
 - 4 µl mezcla dNTPs (2.5 mM c/u, concentración final 0.2 mM c/u)
 - 5 µl Solución tampón Super *Tth* 10x
 - 0.1 µl Super *Tth* polimerasa (5 U/µl) (SphaeroQ, EE.UU.)
 - 33-x µl agua destilada (para un volumen final de 50 µl)

3. Colocar los tubos en un aparato de PCR y someterlos a los siguientes ciclos:

3 min	96°C	} 20 ciclos
1 min	96°C	
1 min	55°C	
0.5 min	72°C	
5 min	72°C	

III- Hibridación con los productos de PCR y detección.

1. Agregar 20 µl del producto de PCR a 150 µl de SSPE 2x, 0.1% SDS.
2. Desnaturalizar el producto diluido (10 minutos a 99°C) y enfriar en hielo inmediatamente.
3. Lavar la membrana 5 minutos a 60°C en 250 ml de SSPE 2x, SDS 0.1%.
4. Colocar la membrana y una almohadilla en el miniblatter de modo tal que los canales queden ubicados en forma perpendicular a las líneas de tinta y ajustar los tornillos a mano.
5. Eliminar por aspiración el exceso de líquido de los canales.
6. Llenar los canales con el producto de PCR diluido (¡evitar burbujas de aire!) e hibridar por 60 min a 60°C horizontalmente y sin agitación.
7. Eliminar por aspiración el líquido de los canales y retirar la membrana del miniblatter.
8. Lavar la membrana dos veces con 250 ml de SSPE 2x, SDS 0.5% por 10 min a 60°C.
9. Poner la membrana en frasco de hibridación y dejar enfriar.
10. Agregar 2.5 µl de conjugado estreptavidina-peroxidasa (500 U/ml, Boehringer, Alemania) a 10 ml de SSPE 2x, SDS 0.5% e incubar la membrana por 45-60 minutos a 42°C.
11. Lavar la membrana dos veces con 250 ml de SSPE 2x, SDS 0.5% durante 10 min a 42°C.
12. Lavar la membrana (dos veces) con 250 ml de SSPE 2x por 5 minutos a temp. ambiente.
13. Incubar la membrana (detección quimioluminiscente) por 1 minuto con 20 ml de líquido de detección ECL (Amersham, Inglaterra).
14. Envolver la membrana en película plástica adherente y exponer a película fotosensible durante 20 minutos.
15. Revelar el filme con líquidos reveladores de fotografía.

IV- Reutilización de la membrana

1. Lavar la membrana dos veces en SDS 1% a 80°C por 30 min.
2. Lavar la membrana en EDTA 20mM pH 8 durante 15 min a temperatura ambiente.
3. Conservar la membrana a 4°C sellada en una bolsa plástica hasta su utilización.

SOLUCIONES

1. NaHCO₃ 500 mM pH 8.4

Pesar 10.5 g de NaHCO₃ y disolver en 250 ml agua destilada.

2. EDAC (1-etil-3(3 dimetiaminopropil) carbodiimida) al 16% (p/v)

Pesar 1.6 g de EDAC y disolver en 10 ml agua destilada.

3. NaOH 100mM

Pesar 0.8 g de NaOH y disolver en 200 ml agua destilada.

4. EDTA 0.5 M, pH 8.0

Pesar 186.12 g de EDTA y disolver en 1litro de agua destilada

5. EDTA 20 mM, pH 8.0

Tomar 10 ml de EDTA 0.5 M y completar a 250ml con agua destilada.

6. SSPE 20x

Pesar 35.6g de Na₂HPO₄*2 H₂O, 210.24 g de NaCl y 7.4 g de EDTA. Ajustar el pH a 7.4. Completar a 1 litro con agua destilada y autoclavar a 121°C por 15 min.

7. SSPE 2x

Tomar 100 ml de SSPE 20x y completar a 1 litro con agua destilada.

8. SDS 10%

Pesar 10 g de SDS y disolver en 100 ml agua destilada.

9. SSPE 2x, SDS 0.1%

Agregar 100 ml de SSSPE 20x y 10 ml de SDS 10% a 890 ml de agua destilada.

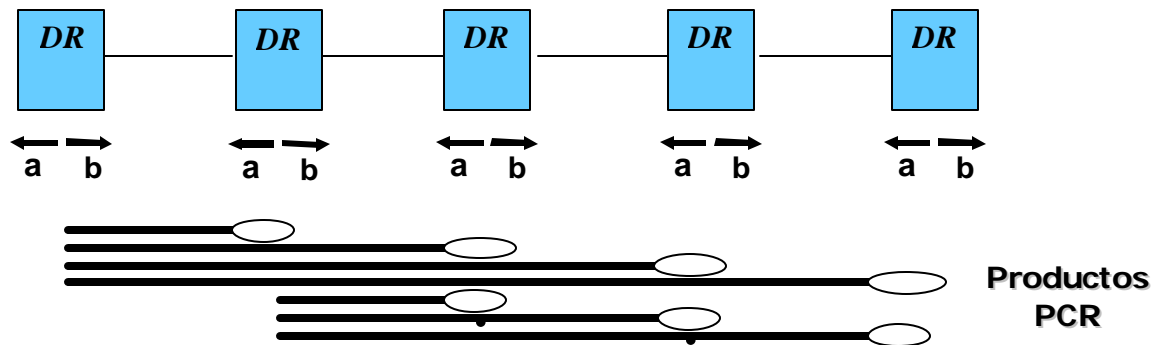
10. SSPE 2x, SDS 0.5%

Agregar 100 ml de SSSPE 20x y 50 ml de SDS 10% a 850 ml de agua destilada.

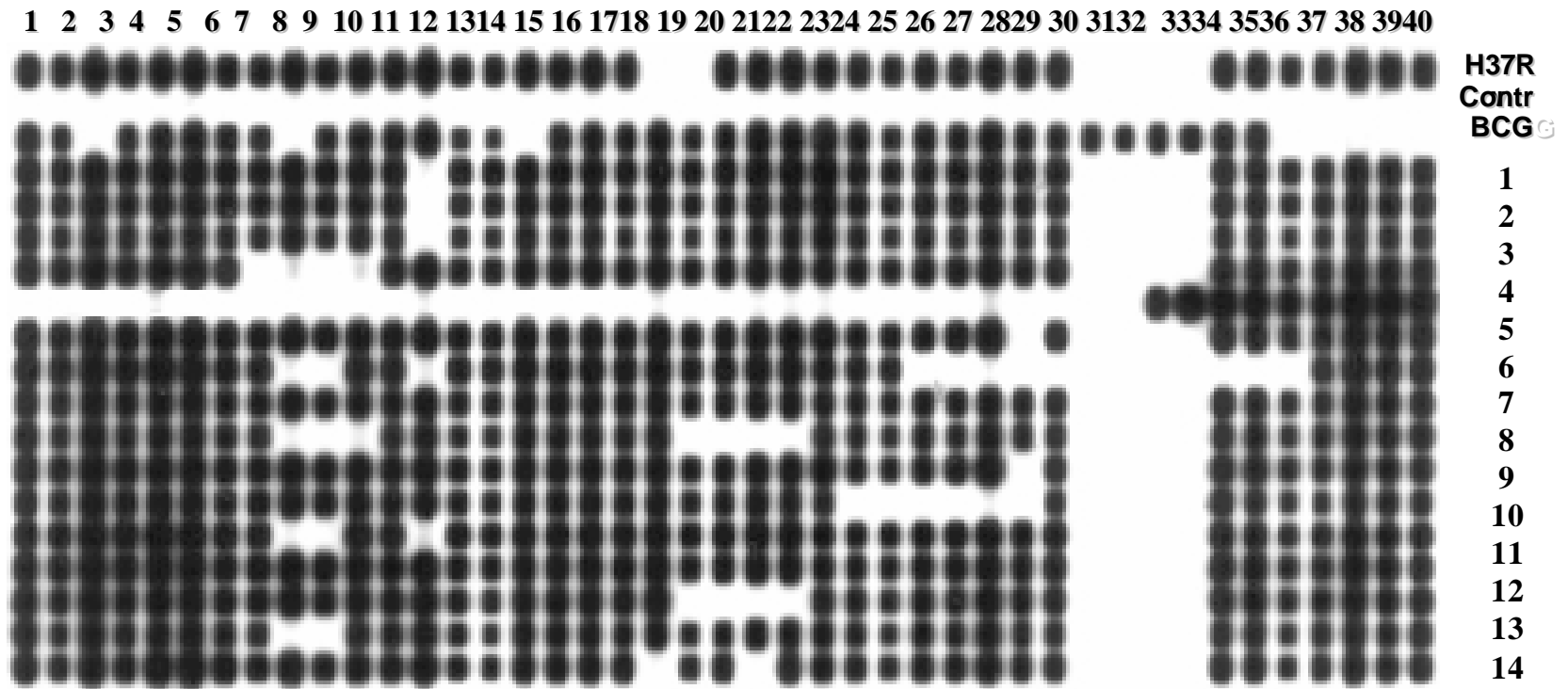
Tabla 1. Concentración de los oligonucleótidos espaciadores.

No.	Nombre	Conc. (pmol/150uL)	No.	Nombre	Conc. (pmol/150uL)
1	SP-F310A	12.5	23	SP-F510A	50.0
2	SP-F320A	30.0	24	SP-F520A	50.0
3	SP-F330A	12.5	25	SP-F530A	25.0
4	SP-F340A	12.5	26	SP-F540A	12.5
5	SP-F350A	12.5	27	SP-F550A	25.0
6	SP-F360A	12.5	28	SP-F560A	12.5
7	SP-F370A	25.0	29	SP-F570A	12.5
8	SP-F380A	50.0	30	SP-F580A	12.5
9	SP-F390A	12.5	31	SP-F590A	12.5
10	SP-F400A	15.0	32	SP-F600A	25.0
11	SP-F410A	30.0	33	SP-F610A	100
12	SP-F420A	60.0	34	SP-F620A	25.0
13	SP-F430A	12.5	35	SP-F630A	12.5
14	SP-F440A	30.0	36	SP-F640A	12.5
15	SP-F450A	30.0	37	SP-F650A	12.5
16	SP-F455A	12.5	38	SP-F660A	25.0
17	SP-F457A	100	39	SP-F670A	25.0
18	SP-F460A	12.5	40	SP-F680A	12.5
19	SP-F470A	12.5	41	SP-F690A	12.5
20	SP-F480A	12.5	42	SP-F700A	25.0
21	SP-F490A	25.0	43	SP-F710A	50.0
22	SP-F500A	12.5			

Esquema de Spoligotyping



Oligonucleótidos Espaciadores



ANEXO 2 – Datos complementarios

Tabla I- Datos Globales de la Tuberculosis. 1990-1995.

Región	Número de casos (% de todos los casos)	Tasa por 100 000 habitantes
En 1990:		
Mediterráneo Oriental	594,000 [7]	155
Las Américas	534,000 [7]	120
Europa + otros	392,000 [5]	31
China	2,127,000 [27]	191
África	1,160,000 [15]	220
Asia	2,470,000 [31]	194
Pacífico Occidental	420,000 [5]	191
Todas las regiones en 1990.	8,002,000 [100]	152
Todas las regiones, en 1995.	8,900,000	
Cambios en el número de casos nuevos 1990- 95.	878 000 [10]	
Total global de nuevos casos de TB de todos los casos de TB en 1995 (%). $878\ 000 / 8,9\ \text{millones} = 9,87\ \%$		

Fuente: OMS, 1996.

Tabla II- Número total de casos nuevos de tuberculosis, incidencia (casos por 100 000 habitantes), total de casos y % con baciloscopia positiva cases en Cuba. 1962–2002.

<i>Año</i>	<i>Total de casos</i>	<i>Incidencia</i>	<i>Baciloscopia Positiva</i>	<i>(%)*</i>
1962	2818	38.8	2516	89.3
1963	2768	36.2	2472	89.3
1964	3909	52.6	3491	89.3
1965	4958	65.0	4427	89.3
1966	2846	36.5	2541	89.2
1967	2950	37.2	2634	89.2
1968	3310	41.0	2956	89.3
1969	3607	43.9	3221	89.2
1970	2606	31.2	2327	89.2
1971	1543	17.8	1378	89.3
1972	1272	14.5	1136	89.3
1973	1396	15.7	1247	89.3
1974	1418	15.6	1266	89.2
1975	1326	14.3	1184	89.2
1976	1270	13.4	1134	89.2
1977	1257	13.1	1123	89.4
1978	1261	13.0	1154	91.5
1979	1133	11.6	1044	92.1
1980	1133	11.6	1004	88.6
1981	833	8.5	743	89.2
1982	815	8.3	711	87.2
1983	762	7.7	685	89.9
1984	705	7.1	638	90.5
1985	680	6.8	603	88.9
1986	656	6.4	561	85.5
1987	630	6.2	550	87.3
1988	628	5.9	551	87.7
1989	581	5.5	514	88.5
1990	546	5.1	491	89.9
1991	514	4.8	466	90.6
1992	633	5.8	591	93.3
1993	789	7.2	718	91.0
1994	1617	14.7	914	56.5
1995	1553	14.1	834	53.7
1996	1486	13.5	835	56.2
1997	1346	12.2	765	56.8
1998	1237	11.1	742	60.0
1999	1111	10.0	720	64.8
2000	1119	10.0	717	64.0
2001	901	8.7	627	63.9
2002	853	7.5	544	63.7

*Porcentaje de casos con baciloscopia positiva con relación al total de casos.

Fuente: Tomado de Marrero et al., 2000 y de la Dirección Nacional de Epidemiología.

Tabla III- Comparación de las principales técnicas moleculares de caracterización de *M. tuberculosis*.

Metodología	Método	Secuencia Blanco	Laboratorio de Origen	Reproducibilidad (%)	Especificidad (%)	Poder de Discriminación (%)
Tipificación por técnicas basadas en RFLP	RFLP- IS6110	IS6110	Inst Nacional Salud Pública, Holanda.	100	100	93
	RFLP- IS1081	IS1081	Inst Nacional Salud Pública, Holanda.	100	90	13
	RFLP- PGRS	PGRS	Fairfield Hospital, Australia	100	20	78
	RFLP- DR	DR	Inst Nacional Salud Pública, Holanda.	100	90	53
	RFLP- (GTG)₅	-(GTG)₅	Univ. Stellenbosch, Sudáfrica	94	0	33
Tipificación por técnicas basadas en PCR	PCR de Ligador Mezclado	IS6110	Univ. Heidelberg, Alemania	100	70	90
	VNTR typing	VNTR	Durham VA Med. Center, EEUU	97	ND	62
	MIRU/VNTR typing	MIRU/VNTR	Instituto Pasteur Lille, Francia	100	100	87
	Spoligotyping	DR	Inst Nacional Salud Pública, Holanda.	94	100	68
	PCR-Cebadores Arbitrarios	--	Univ. Mahidol, Thailandia	71	0	79
	PCR-Doble Elemento Repetitivo	IS6110 PGRS	Cornell Univ. Med. College, EEUU	58	60	70
	Ampliprinting IS6110	IS6110 MPTR	CDC, EEUU	39	50	--
	PCR inverso de IS6110	IS6110	Univ. Zaragoza, España	6	10	--

Fuente: Tomado parcialmente de Kremer et al., 1999 y Supply et al., 2001.

Tabla IV- Datos por provincias de los casos de tuberculosis con baciloscopía positiva (BK+) y las cepas recibidas de pacientes BK+ en el IPK (y las analizadas por RFLP-IS6110). Período: julio 1994-junio 1995.

Provincia*	Total de Casos BK+	Total de Cepas Recibidas (BK+)	Total de Cepas Analizadas por RFLP-IS6110	Cepas Agrupadas	Cepas No Agrupadas
PR	42	37	12	4	8
LH	32	29	11	7	4
MT	34	21	5	1	4
VC	73	59	23	18	5
CF	35	23	11	5	6
SS	18	14	4	0	4
CA	22	11	3	3	0
CM	64	43	19	10	9
LT	31	21	9	4	5
HL	72	51	12	8	4
GR	55	37	8	4	4
SC	60	53	21	6	15
GT	29	23	13	2	11
IJ	11	11	9	4	5
TOTAL	578	433	160	76	84

* No están incluidos en este estudio los casos de Ciudad de La Habana.

Caso (Origen)

- 1 (SSV)
- 2 (SSV)
- 3 (SSV)
- 4 (SSV)
- 5 (SMZ)
- 6 (SSV)
- 7 (SSV)
- 8 (SSV)
- 9 (SSV)
- 10 (SSV)
- 11 (SSV)
- 12 (SVC)
- 13 (SSV)
- 14 (SSS)
- 15 (SMZ)
- 16 (SSV)
- 17 (SSV)
- 18 (SSV)
- 19 (SSV)
- 20 (SVC)
- 21 (SSV)
- 22 (SHL)
- 23 (SNA)
- 24 (SSV)
- 25 (SSV)

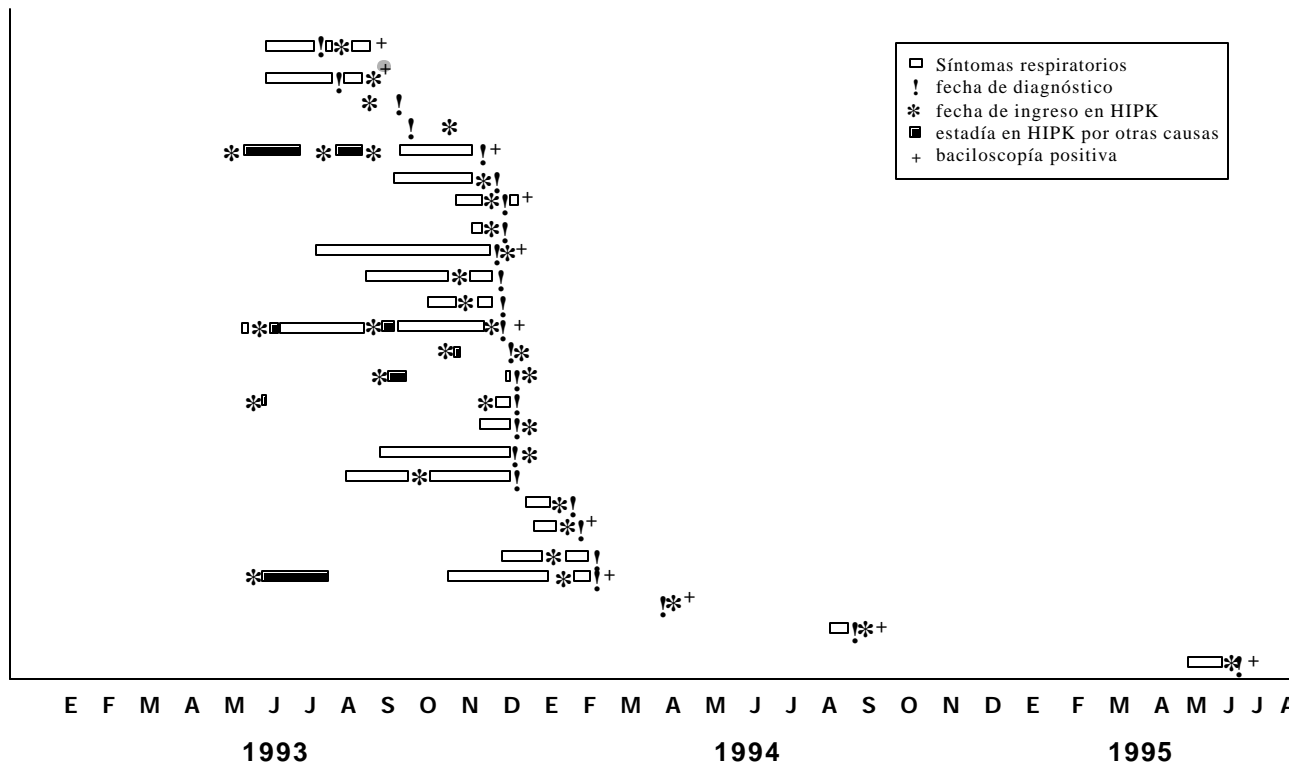


Figura I- Esquema de tiempo de los pacientes seropositivos al VIH (y trabajadores de salud) de diferentes sanatorios del país que contrajeron tuberculosis en el periodo 1993-1994.

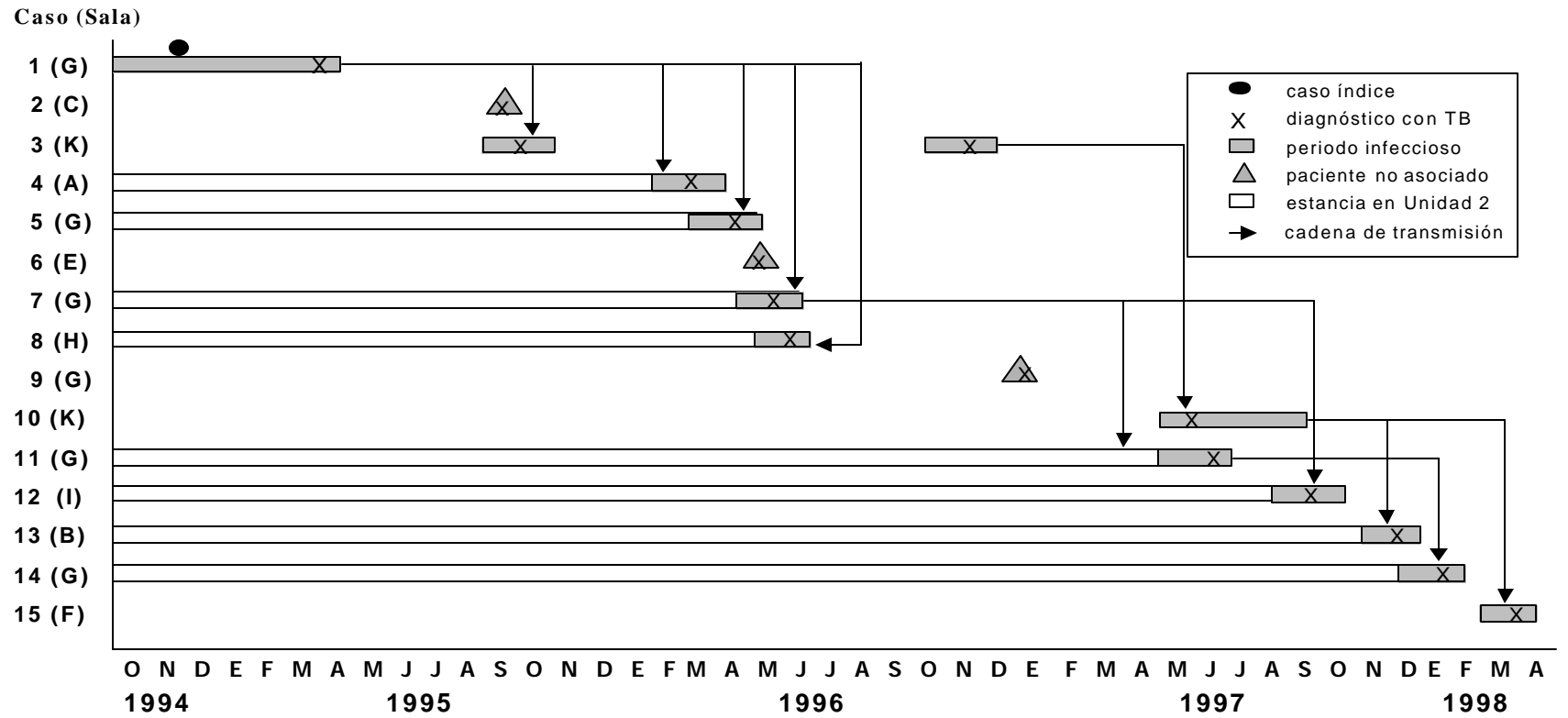


Figura II- Esquema de tiempo de los casos de tuberculosis del Hospital Psiquiátrico de la Habana (HPH).

ANEXO 3 – Autobiografía

AUTOBIBLIOGRAFIA

- 1- **Díaz R**, Montoro E, González R, Echemendía M, Valdivia JA. Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated during an outbreak of HIV-infected patients by DNA fingerprinting. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **1995**; 53 (2): S155-6.
- 2- **Díaz R**, de Haas P, Gómez RI, Marrero A, Cabanas M, Valdivia JA, van Embden JDA, Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis in Cuba, 1994-1995; Comparison of IS6110-RFLP and Spoligotyping. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease **1998**; 2(9): 43-50.
- 3- **Díaz R**, Gómez RI, Restrepo E, Rumbaut R, Valdivia JA, Soolingen D. Transmission of tuberculosis in Havana, Cuba; a molecular epidemiological study by IS6110 restriction fragment length polymorphism typing. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz **2001**; 96 (4): 437-43.
- 4- **Díaz R**, Gómez RI, García N, Valdivia JA, Soolingen D. Molecular epidemiology study on transmission of tuberculosis in a hospital for mentally handicapped patients in Havana, Cuba. Journal of Hospital Infection **2001**; 49 (1): 30-6.
- 5- **Díaz R**, González R, Rumbaut R, Joanes J, González-Ochoa E, Díaz-Jidy M, van Soolingen D, Montoro E, Mederos L, Ferrá C, Pérez J, Farmer PE, Valdivia JA. An outbreak of tuberculosis among HIV-infected patients in Havana, Cuba: a retrospective molecular epidemiology study. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease **2002**; 6(10): S155.

*ANEXO 4 – Otras publicaciones del autor
relacionadas con el tema de tesis*

OTRAS PUBLICACIONES DEL AUTOR RELACIONADAS CON EL TEMA DE TESIS.

- 1- **Díaz R**, Montoro E, Maestre JL, Echemendía M, Valdivia JA. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 1994; 89(2): 211-2.
- 2- **Díaz R**, Montoro E, Díaz C, Echemendía M, Valdivia JA. Purificación y análisis de restricción de DNA de micobacterias. Avances en Biotecnología Moderna 1994; Vol. 2, pp. 103.
- 3- **Díaz R**, Montoro E, González R, Echemendía M, Valdivia JA. Estudio por RFLP de cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes VIH positivos. Revista CENIC 1995; 26 (Especial): 13.
- 4- Montoro E, **Díaz R**, Echemendía M, Valdivia JA. Análisis de los fragmentos de restricción de ADN (RFLP) en cepas de *M. tuberculosis* resistente a las drogas antibacilares. Revista CENIC 1995; 26 (Especial): 15.
- 5- **Díaz R**, de Haas P, Gómez RI, Marrero A, Cabanas M, Valdivia JA, van Embden JDA, van Soolingen D. Estudio molecular de la transmisión de la tuberculosis en Cuba durante 1994-1995. Avances en Biotecnología Moderna 1997; Vol. IV, pp. D58.
- 6- **Díaz R**, Gómez RI, de Haas P, Valdivia JA, van Embden JDA, van Soolingen D. Caracterización de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* por análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y Spoligotyping. Avances en Biotecnología Moderna 1997; Vol. IV, pp. D56.
- 7- Gómez RI, **Díaz R**, Cabanas M, Valdivia JA. Patrones genéticos de *Mycobacterium tuberculosis* aislados en un hospital psiquiátrico. Avances en Biotecnología Moderna 1997; Vol. IV, pp. D38.
- 8- **Díaz R**, Gómez RI, Montoro E, Cabanas M, Marrero A, Echemendía M, Martínez Y, García N, González R, Valdivia JA. Contribución al control de la tuberculosis en Cuba. Bol. IPK. 1998; 8 (42): 334-335.
- 9- **Díaz R**, Gómez RI, Restrepo E, Rumbaut R, Sevy-Court J, Pelaez O, Martínez Y, Valdivia JA. Estudio genético-molecular de transmisión de la tuberculosis en Ciudad de La Habana utilizando el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción-**IS6110**. Avances en Biotecnología Moderna 1999; Vol V, pp. D8.
- 10- **Díaz R**, Alvarez Y, Rumbaut R, Gómez RI, Martínez Y, Valdivia JA. Transmisión de la tuberculosis en instituciones cerradas de Ciudad de La Habana y La Habana. Avances en Biotecnología Moderna 1999; Vol V, pp. D11.

- 11- **Díaz R**, Gómez RI, Marrero A, Cabanas M, Martínez Y, García N, González R, Valdivia JA. Empleo de la secuencia de inserción **IS6110** en la caracterización molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en Cuba. Avances en Biotecnología Moderna **1999**; Vol V, pp. D8.
- 12- **Díaz R**, Gómez RI, Marrero A., Cabanas M, Martínez Y, García N, González R, Valdivia JA. Caracterización molecular de cepas de *M. tuberculosis* utilizando la secuencia de inserción **IS6110**. Revista Latinoamericana de Microbiología **2000**; Vol. 42, Abril (Supl): 470.
- 13- Gómez RI, **Díaz R**, García N, Valdivia JA. Estudio epidemiológico-molecular de un brote de tuberculosis en el Hospital Psiquiátrico de La Habana. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología **2000**; 38 (3): 201-9.
- 14- **Díaz R**, Crespo F, Herrera S, Sevy-Court J, Farmer PE. Laboratory cross-contamination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures confirmed by **IS6110** DNA fingerprinting. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease **2001**; 5(11): S36.
- 15- **Díaz R**, González-Ochoa E, Valdivia JA, van Soolingen D. Use of **IS6110**-DNA fingerprinting in the epidemiology of tuberculosis in Cuba. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease **2003**; 7(11): S212.

ANEXO 5 – Eventos Científicos

TRABAJOS DEL AUTOR PRESENTADOS EN EVENTOS CIENTIFICOS RELACIONADOS CON EL TEMA DE TESIS.

- 1- **Díaz R**, Montoro E, Echemendía M, Valdivia JA. Elección de un método adecuado de extracción de DNA en micobacterias. *IV Jornada Científica y II Jornada Docente de Higiene y Epidemiología de Ciudad de La Habana*, Ciudad de La Habana, Cuba. Diciembre 23, 1992.
- 2- **Díaz R**, Montoro E, Echemendía M, Valdivia JA. Análisis de restricción de DNA de cepas de micobacterias (RFLP). *IV Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. I Congreso de Medicina Tropical*. Ciudad de La Habana, Cuba. Octubre 27-29, 1993.
- 3- **Díaz R**, Montoro E, Friedman C, González R, Echemendía M, Valdivia JA. Análisis por RFLP de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas durante un brote de tuberculosis en pacientes VIH positivos. *II Seminario Internacional sobre la infección por VIH y SIDA en Cuba*. Ciudad de La Habana, Cuba. Mayo 2-5, 1995.
- 4- **Díaz R**, Montoro E, González R, Echemendía M, Valdivia JA. Empleo de la técnica de RFLP en el estudio de cepas de *M. tuberculosis* aisladas durante un brote en pacientes VIH positivos. *IV Encuentro Gallego-Cubano sobre Salud Pública y Epidemiología*. Ciudad de La Habana, Cuba. Junio 20, 1995.
- 5- **Díaz R**, Montoro E, González R, Echemendía M, Valdivia JA. Estudio por RFLP de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes VIH positivos. *XII Seminario Científico del CENIC*. Ciudad de La Habana, Cuba. Junio 27-30, 1995.
- 6- Montoro E, **Díaz R**, Echemendía M, Valdivia JA. Análisis de los fragmentos de restricción de ADN (RFLP) en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistente a las drogas antibacilares. *XII Seminario Científico del CENIC*. Ciudad de La Habana, Cuba. Junio 27-30, 1995.
- 7- **Díaz R**, Montoro E, González R, Echemendía M, Valdivia JA. Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated during an outbreak of HIV-infected patients by DNA fingerprinting. *44th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene Meeting*. San Antonio, Texas, EE.UU. Noviembre 17-21, 1995.
- 8- **Díaz R**, Montoro E, González R, Gómez RI, Echemendía M, Valdivia JA. Análisis de restricción e hibridación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas durante un brote de tuberculosis entre pacientes seropositivos al VIH. *XXVI Congreso Panamericano de la ULASTER y VII Conferencia Regional Latinoamericana (UICTER /IUATLD)*. Abril 17-20, 1996.

- 9- **Díaz R**, Gómez RI, Echemendía M, Valdivia JA. Análisis de restricción e hibridación (RFLP) de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a drogas antibacilares. **IV Congreso Nacional de Epidemiología y I Congreso Nacional de Infectología**. Noviembre 18-22, 1996.
- 10- **Díaz R**, Gómez RI, Montoro E, Echemendía M, Valdivia JA. Patrones genéticos de *Mycobacterium tuberculosis* en Cuba en 1995. **V Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. II Congreso de Medicina Tropical**. Ciudad de La Habana, Cuba. Marzo 2-5, 1997.
- 11- Gómez RI, **Díaz R**, Bravo JR, Valdivia JA. Comparación de dos métodos para tipaje de *Mycobacterium tuberculosis* aplicados al estudio de un brote nosocomial. **V Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. II Congreso de Medicina Tropical**. Ciudad de La Habana, Cuba. Marzo 2-5, 1997.
- 12- **Díaz R**, de Haas P, Gómez RI, Marrero A, Cabanas M, Valdivia JA, van Embden JDA, van Soolingen D. Epidemiología molecular de la tuberculosis en Cuba, 1994-1995. **I Symposium Internacional sobre Tuberculosis**. Ciudad de La Habana, Cuba. Diciembre 3-5, 1997.
- 13- Gómez RI, **Díaz R**, Cabanas M, Valdivia JA. Patrones genéticos de *Mycobacterium tuberculosis* aislados en un hospital psiquiátrico. **I Symposium Internacional sobre Tuberculosis**. Ciudad de La Habana, Cuba. Diciembre 3-5, 1997.
- 14- **Díaz R**, de Haas P, Gómez RI, Marrero A, Cabanas M, Valdivia JA, van Embden JDA, van Soolingen D. Estudio molecular de la transmisión de la tuberculosis en Cuba durante 1994-1995. **Biotecnología Habana'97**. Ciudad de La Habana, Cuba. Diciembre 2-6, 1997.
- 15- Gómez RI, **Díaz R**, Cabanas M, Valdivia JA. Patrones genéticos de *Mycobacterium tuberculosis* aislados en un hospital psiquiátrico. **Biotecnología Habana'97**. Ciudad de La Habana, Cuba. Diciembre 2-6, 1997.
- 16- **Díaz R**, de Haas P, Gómez RI, Marrero A, Cabanas M, Valdivia JA, van Embden JDA, van Soolingen D. Caracterización de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* por análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y Spoligotyping. **Biotecnología Habana'97**. Ciudad de La Habana, Cuba. Diciembre 2-6, 1997.
- 17- **Díaz R**, Gómez RI, Cabanas M, Marrero A, Valdivia JA. Epidemiología molecular de la tuberculosis en Cuba durante 1994-1995. Comparación de las técnicas de RFLP-IS6110 y Spoligotyping. **Joven Ciencia'98**. Ciudad de La Habana, Cuba. Febrero 7, 1998.

- 18- **Díaz R**, Gómez RI, Montoro E, Cabanas M, Marrero A, Martínez Y, Echemendía M, García N, González R, Valdivia JA. Epidemiología molecular de la tuberculosis en Cuba. *1^{er} Encuentro Científico de Salubristas de la AMECA*. Ciudad de La Habana, Cuba. Diciembre 8-11, 1998.
- 19- **Díaz R**, Gómez RI, Restrepo E, Rumbaut R, Sevy-Court J, Pelaez O, Martínez Y, Valdivia JA. Transmisión de la tuberculosis en Ciudad de La Habana. Estudio molecular por RFLP. *Evaluación Interna y Externa del Programa de Tuberculosis en Etapa de Eliminación*. Ciudad de La Habana, Cuba. Abril 30, 1999.
- 20- **Díaz R**, Gómez RI, Restrepo E, Rumbaut R, Sevy-Court J, Pelaez O, Martínez Y, Valdivia JA. Estudio genético-molecular de transmisión de la tuberculosis en Ciudad de La Habana utilizando el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción-**IS6110**. *Biotecnología Habana'99*. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana, Cuba. Noviembre 28-Diciembre 3, 1999.
- 21- **Díaz R**, Alvarez Y, Rumbaut R, Gómez RI, Martínez Y, Valdivia JA. Transmisión de la tuberculosis en instituciones cerradas de Ciudad de La Habana y La Habana. *Biotecnología Habana'99*. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana, Cuba. Noviembre 28-Diciembre 3, 1999.
- 22- **Díaz R**, Gómez RI, Montoro E, Cabanas M, Marrero A, Martínez Y, Echemendía M, García N, González R, Valdivia JA. Empleo de la secuencia de inserción **IS6110** en la caracterización molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en Cuba. *Biotecnología Habana'99*. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana, Cuba. Noviembre 28-Diciembre 3, 1999.
- 23- **Díaz R**, de Haas P, Kremer K, Gómez RI, Restrepo E, Rumbaut R, Sevy-Court J, Pelaez O, Martínez Y, Valdivia JA, van Embden JDA, van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis in Cuba. *International Colloquium "Tuberculosis, the real millenium bug"*, Antwerp, Bélgica. Diciembre 14-17, 1999.
- 24- **Díaz R**, Alvarez Y, Rumbaut R, Latorre R, Martínez Y, Valdivia JA. Transmisión de la tuberculosis entre personas seropositivas y seronegativas al VIH en instituciones cerradas habaneras. *IV Conferencia VIH/SIDA. Sexualidad y SIDA en Cuba, Latinoamérica y el Caribe*. Ciudad de La Habana, Cuba. Enero 19-25, 2000.
- 25- **Díaz R**, Gómez RI, Montoro E, Cabanas M, Marrero A, Martínez Y, Echemendía M, García N, González R, Valdivia JA. Caracterización molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* utilizando la secuencia de inserción **IS6110**. *XV Congreso Latinoamericano de Microbiología*. Ciudad de México, México. Abril 13-17, 2000.

- 26- **Díaz R**, Alvarez Y, Rumbaut R, Latorre R, Martínez Y, Valdivia JA. Empleo de métodos epidemiológicos moleculares y convencionales en la transmisión de la TB en instituciones cerradas habaneras. *XIII Seminario Científico del CENIC*. Ciudad de La Habana, Cuba. Junio 27-30, 2000.
- 27- **Díaz R**, de Haas P, Kremer K, Gómez RI, Restrepo E, Rumbaut R, Sevy-Court J, Pelaez O, Martínez Y, Valdivia JA, van Embden JDA, van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis in Cuba. *SILCIBIO 2000*. Davis, California, EE.UU. Septiembre 11-14, 2000.
- 28- **Díaz R**, Crespo FM, Herrera S, Sevy-Court J, PE Farmer. Laboratory cross-contamination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures confirmed by IS6110 DNA fingerprinting. *32nd World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD)*. Paris, Francia. Noviembre 1-4, 2001.
- 29- **Díaz R**, Gómez RI, García N, Valdivia JA, van Soolingen D. Outbreak of tuberculosis in a psychiatric hospital in Havana, Cuba: analysis by conventional and molecular methods. *32nd World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD)*. Paris, Francia. Noviembre 1-4, 2001.
- 30- **Díaz R**, Gómez RI, Cabanas M, Marrero A, Martínez Y, Echemendía M, García N, González R, Valdivia JA. Caracterización molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* en Cuba. *I Simposio Internacional de Bioquímica y Biología Molecular. IV Congreso Internacional de Química*. Ciudad de La Habana, Cuba. Abril, 2001.
- 31- **Díaz R**, González R, Rumbaut R, Joanes J, González-Ochoa E, Díaz-Jidy M, van Soolingen D, Montoro E, Mederos L, Ferrá C, Pérez J, Farmer PE, Valdivia JA. Epidemiología molecular de la tuberculosis. *Convención Internacional "Salud Pública 2002"*. Ciudad de La Habana, Cuba. Mayo 1-4, 2002.
- 32- **Díaz R**, González R, Rumbaut R, Joanes J, González-Ochoa E, Díaz-Jidy M, van Soolingen D, Montoro E, Mederos L, Ferrá C, Pérez J, Farmer PE, Valdivia JA. An outbreak of tuberculosis among HIV-infected patients in Havana, Cuba: a retrospective molecular epidemiology study. *33rd World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD)*. Montreal, Canada. October 6-10, 2002.
- 33- **Díaz R**, González R, Rumbaut R, Joanes J, González-Ochoa E, Díaz-Jidy M, van Soolingen D, Montoro E, Mederos L, Ferrá C, Pérez J, Farmer PE, Valdivia JA. Análisis retrospectivo de un brote de tuberculosis entre pacientes infectados con el VIH en La Habana, Cuba. Empleo de las técnicas de RFLP-IS6110 y Spoligotyping. *XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM)*. Ciudad de La Habana, Cuba. Noviembre 11-15, 2002.

- 34- **Díaz R**, González-Ochoa E, Valdivia JA, van Soolingen D. Use of IS6110-DNA fingerprinting in the epidemiology of tuberculosis in Cuba. *34th World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD)*. París, Francia. Octubre 31-Noviembre 2, 2003.
- 35- **Díaz R**, González-Ochoa E, Valdivia JA, van Soolingen D. Use of IS6110-DNA fingerprinting in the epidemiology of tuberculosis in Cuba. *Biotecnología Habana'2003*. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana, Cuba. Noviembre 23-28, 2003.

ANEXO 6 – Trabajos de Tesis

TESIS TUTORIADAS O ASESORADAS POR EL AUTOR RELACIONADAS CON EL TEMA DE TESIS.

I- Trabajos de Diploma

- 1- Aislamiento y análisis de restricción de DNA en micobacterias. Autor: Carmen Díaz. Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Abril, 1994. (Tutor).
- 2- Estudio de un brote de tuberculosis en un hospital psiquiátrico por RFLP-IS6110". Autor: Nelaine García. Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Junio, 1998 (Tutor).
- 3- Estudio de la transmisión de la tuberculosis en instituciones cerradas de Ciudad de La Habana y La Habana. Autor: Yanieyis Alvarez. Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Junio, 1999. (Tutor).

II- Tesis de Maestría

- 1- Estudio genético-molecular de la transmisión de la tuberculosis en Ciudad de La Habana". Autor: Eliana Restrepo. Departamento de Bacteriología-Micología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Septiembre, 1998. (Tutor).

III- Trabajo de Terminación de Residencia

- 1- Caracterización genómica de *M. tuberculosis* por análisis de restricción. Autor: Rogelio González. Departamento de Bacteriología-Micología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Abril, 1995. (Asesor).

ANEXO 7 - Distinciones Científico-Técnicas

DISTINCIONES CIENTIFICO-TECNICAS RELACIONADAS CON EL TEMA DE TESIS.

I- Resultados Relevantes del Instituto de Medicina Tropical 'Pedro Kouri' (IPK).

- 1- Aplicación de la técnica de PCR en la identificación de *Mycobacterium tuberculosis*. (1991). Autor principal.
- 2- Estudio microbiológico de un brote de tuberculosis entre pacientes VIH positivos (1995). Autor.
- 3- Caracterización genética de cepas *Mycobacterium tuberculosis* circulantes en Cuba (1998). Autor principal.
- 4- Estudio molecular de la transmisión de la tuberculosis. Contribución al control de la tuberculosis en Cuba (1999). Autor principal.

II- Logros Científico-técnicos de la ACC.

- 1- Introducción de tecnología de avanzada en el diagnóstico de enfermedades infecciosas mediante PCR. (1992). Autor.

III- Premios del Forum de Ciencia y Técnica.

- 1- Diagnóstico y caracterización microbiológica de la primera epidemia de tuberculosis en pacientes seropositivos al VIH en Cuba (1995). **Mención Especial** en X Forum Nacional de Ciencia y Técnica. Autor.
- 2- Estudio molecular de la transmisión de la tuberculosis. Contribución al control de la tuberculosis en Cuba (1999). **Relevante** en XIII Forum Municipal de Ciencia y Técnica. **Autor Principal.**
- 3- Estudio molecular de la transmisión de la tuberculosis. Contribución al control de la tuberculosis en Cuba (1999). **Destacado** en XIII Forum Provincial Ramal de Ciencia y Técnica. **Autor Principal.**
- 4- Estudio molecular de la transmisión de la tuberculosis. Contribución al control de la tuberculosis en Cuba (2000). **Mención** en XIII Forum Provincial de Ciencia y Técnica. **Autor Principal.**