

Análisis de polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP) y epidemiología de la tuberculosis

Jorge Enrique Gómez Marín,¹ Leen Rigouts,²
Luz Emilia Villegas Londoño³ y Françoise Portaels³

Con objeto de estudiar los polimorfismos del elemento de inserción 6110 (IS6110) en cepas de Mycobacterium tuberculosis aisladas de pacientes colombianos y la resistencia a medicamentos antituberculosos en el departamento del Quindío, Colombia, se efectuó un estudio prospectivo con una muestra consecutiva de 59 pacientes con tuberculosis pulmonar sintomática, confirmada por baciloscopia, con y sin historia de tratamiento. Los pacientes, que participaban en el Programa de Control de la Tuberculosis del Instituto Seccional de Salud del Quindío en Armenia, Colombia, fueron todos aquellos que consultaron a centros de salud y hospitales locales en zonas urbanas y rurales del Quindío de marzo a julio de 1993.

Se hicieron exámenes de esputo con cultivos y pruebas de sensibilidad a medicamentos. Posteriormente se analizaron los polimorfismos del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) del IS6110, según los protocolos de van Soolingen, et al. (1992). Para clasificar los casos se usó la historia de tratamiento, aplicando los criterios de la OMS (1991).

Se encontraron 44 cultivos positivos a M. tuberculosis y uno positivo a M. africanum. Se observó resistencia inicial a los medicamentos en 4 de 42 cultivos, o 9,5% (IC95%: 0,6 a 18): 4,8% mostraron resistencia a la isoniácida (INH) y 4,8% a isoniácida y estreptomycin (INH-SM). Se observó resistencia adquirida en dos de tres cultivos, o 66% (a isoniácida, rifampicina y estreptomycin [INH-RM-SM] y a isoniácida, etambutol, rifampicina y estreptomycin [INH-EMB-RM-SM]). En 27 cepas sometidas a análisis de RFLP, el número de copias del IS6110 varió de 6 a 17. Los coeficientes de similitud revelaron cinco grupos distintos.

En resumen, el análisis de los RFLP del IS6110 sirve para identificar distintas cepas de micobacterias y tiene amplia utilidad en estudios epidemiológicos y en la toma de decisiones sobre los programas de control de la tuberculosis.

Los complejos problemas que plantea la actual situación de la tuberculosis (1-7) exigen el diseño de nuevas estrategias y métodos de control. El análisis de los polimorfismos del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) que muestra el elemento de inserción 6110 (IS6110), componente exclu-

sivo de las micobacterias que producen la tuberculosis, constituye una herramienta nueva y promisoría para el estudio epidemiológico de la enfermedad (8). El IS6110 es una secuencia dentro del ADN capaz de transponerse a numerosos sitios sobre el cromosoma. Aunque se desconoce la función exacta de los elementos de inserción, estos llevan secuencias que codifican la producción de proteínas esenciales para recombinaciones genéticas. Tales elementos están presentes en números y posiciones diferentes, produciendo patrones polimórficos particulares que varían de una cepa a otra ("huellas") y que se pueden observar mediante el análisis de RFLP (9).

¹ Universidad del Quindío, Armenia, Quindío, Colombia. Dirección postal: Centro de Investigaciones Manuel Elkin Patarroyo, Universidad del Quindío A.A. 460 Armenia, Quindío, Colombia.

² Instituto de Medicina Tropical Príncipe Leopoldo, Amberes, Bélgica.

³ Instituto Seccional de Salud del Quindío, Armenia, Quindío, Colombia.

Hasta el momento este nuevo método se ha usado principalmente para determinar las fuentes de infección en brotes de tuberculosis nosocomial con resistencia a los medicamentos (10–12). Las recientes medidas tomadas en los Estados Unidos de América para controlar estos brotes pequeños se han basado en los resultados obtenidos por el método. También es posible, mediante el aislamiento de cepas procedentes de una misma zona geográfica, realizar estudios de contactos para descubrir el origen de infecciones no detectadas por los métodos tradicionales (13).

El presente trabajo tuvo como objetivo describir la naturaleza polimórfica del IS6110 de cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes con tuberculosis pulmonar en el departamento del Quindío, Colombia, y su relación con cepas procedentes de pacientes africanos y europeos. También se buscó determinar las posibilidades de aplicar el análisis de RFLP para hacer estudios epidemiológicos y evaluar la resistencia actual a los medicamentos antituberculosos en la zona.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomó una muestra consecutiva de 59 pacientes con tuberculosis pulmonar con y sin historia de tratamiento antituberculoso previo. Los pacientes fueron todos aquellos con síntomas respiratorios y baciloscopia positiva que de marzo a julio de 1993 acudieron a centros de salud y hospitales urbanos y rurales y que fueron referidos al programa de control de la tuberculosis del Instituto Seccional de Salud del Departamento del Quindío. Estos pacientes —como 80% de la población total del departamento del Quindío— estaban cubiertos por los servicios de salud pública y no estaban protegidos por la seguridad social o privada. El programa de control de la tuberculosis está descentralizado y cuenta con un esquema terapéutico uniforme, supervisado (observación directa) y corto (de 6 meses), para los casos nuevos pulmonares y extrapulmonares, según el esquema propuesto por el programa de control de la tuberculosis del Ministerio de Salud de la República de Colombia.

Los pacientes fueron clasificados de acuerdo a su historia de tratamiento, siguiendo los criterios de la OMS (14):

- a) Caso nuevo: El paciente ha recibido tratamiento antituberculoso un mes o menos.
- b) Caso de recaída: El paciente ha sido curado en el pasado y presenta una nueva tuberculosis activa.
- c) Caso crónico: El paciente sigue teniendo resultados positivos a la baciloscopia, aun después de repetirse el tratamiento.

Los siguientes medicamentos se usaron para las pruebas de sensibilidad: isoniazida (INH), estreptomycin (SM), pirazinamida (PZ), etambutol (ETB), rifampicina (RM) y ácido paraaminosalicílico (PAS).

Las muestras de esputo se transportaron al laboratorio en medio de cloruro de cetilpiridinium (15). La descontaminación del esputo, proceso necesario para evitar el crecimiento de otras bacterias, se realizó según el método de Petroff (16). Los cultivos se hicieron en dos tubos con medio de Lowenstein Jensen y dos con medio de Ogawa para el cultivo de todo tipo de micobacterias, y en un tubo con medio de Stonebrink para la búsqueda de *M. bovis*. Se usaron varios medios de cultivo para aumentar la oportunidad de aislamiento. Los tubos se dejaron en incubación a 37°C y se leyeron cada 15 días. Los cultivos se consideraron negativos después de 10 semanas sin ningún crecimiento micobacteriano. La identificación de micobacterias se hizo por el método de Jenkins, et al. (17). Para determinar la sensibilidad a los medicamentos se usó el método de proporción con medio de Lowenstein-Jensen descrito por Cannetti et al. (18). El tipo de resistencia se clasificó de acuerdo a los antecedentes de quimioterapia:

- a) Resistencia inicial: La cepa es resistente pero el paciente niega haber recibido un medicamento antituberculoso en el pasado.
- b) Resistencia adquirida: Las cepas aisladas provienen de pacientes con tratamiento antituberculoso previo.

Para el análisis de RFLP se logró cultivar 27 cepas colombianas en la cantidad necesaria para poderlas procesar. Un total de 33 cepas de *M. tuberculosis* y una de *M. africanum* que se aislaron de pacientes tuberculosos en Ruanda ($n = 20$), Burundi ($n = 4$), Guinea ($n = 4$) y Bélgica ($n = 6$), así como una cepa de *M. bovis*, fueron examinadas junto con las cepas colombianas. Se utilizaron los protocolos del Instituto Nacional de Salud Pública de Bilthoven, Holanda, que se aceptan en el ámbito internacional para efectos de estandarización y comparabilidad de resultados (19).

De cada cultivo positivo a *M. tuberculosis* se sacaron bacterias con un asa, se transfirieron a un tubo de microcentrífuga con 500 μ l de solución tampón TE (100 mM Tris HCl pH 8, 10 mM EDTA) y se destruyeron por calor. La lisis bacteriana se realizó añadiendo a cada tubo 50 μ l de lisozima (10 mg/ml), 70 μ l de sodio-dodecil-sulfato (SDS) al 10% y 6 μ l de proteinasa K (10 mg/ml). Para separar a las proteínas de los ácidos nucleicos se añadieron a cada tubo 100 μ l de NaCl 5M y después 80 μ l de cetil NNN-trimetil de bromuro de amonio (CTAB)/NaCl. La extracción proteínica se realizó con volúmenes iguales (700 μ l) de cloroformo e isomil alcohol y la solución fue precipitada con 500 μ l de isopropanol 0,6 vol. La enzima de restricción *Pvu* II (Boehringer Mannheim, Alemania), que reconoce la secuencia palindrómica CAG/CTG, se utilizó para digerir el ADN. Los fragmentos obtenidos fueron separados según su longitud por electroforesis lenta (0,8 V/cm). La transferencia desde los geles de agarosa a la membrana de nitrocelulosa se realizó por el método del vacío (Milliblot-V) y la detección de fragmentos con el IS6110 se hizo con una sonda específica preparada por amplificación de ácidos nucleicos mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. Esta sonda detecta en el IS la secuencia de los pares de bases 631 a 650 y 865 a 875 que corresponden a los segmentos ubicados a la derecha del sitio de corte de *Pvu* II.

Se realizó una prehibridación durante 15 minutos a 42°C en tampón de hibridación (NaCl 0,5M). La hibridación se llevó a cabo

toda la noche a 42°C con una concentración de sonda de 10 ng/ml en el tampón de hibridación y un incubador de hibridación giratorio (Robbious Scientific). Se realizaron dos lavados: uno con 50 ml de tampón primario (25 ml de una solución salina citratada —NaCl 3M y citrato de Na 0,3M— más 360 g de urea y 4 g de SDS más agua destilada hasta un volumen de 1L) por 20 minutos a 42 °C, y otro con 200 ml de tampón secundario (la misma solución salina citratada usada como tampón primario, sin urea ni SDS, pero diluida a la mitad: es decir, volúmenes de NaCl 3M y citrato de Na 0,3M en una proporción de 1:2) 5 minutos dos veces a temperatura ambiental. La detección de secuencias sobre la membrana se realizó por quimioluminiscencia (Amersham, Reino Unido) y la emisión de luz fue registrada por autorradiografía (Hyperfilm; Amersham, Reino Unido).

Los polimorfismos genéticos obtenidos fueron analizados para construir dendrogramas basados en los coeficientes de similitud (SAB), que se obtienen mediante la fórmula modificada de Godfrey-Fausset y Stoker (20). Esta fórmula, en que se comparan dos cepas A y B en cuanto al número de bandas reveladas por el análisis de RFLP, es la siguiente:

$$SAB = \frac{\text{[Bandas compartidas entre A y B]}}{[\text{Bandas A}] + [\text{Bandas B}] - [\text{Bandas compartidas entre A y B}]}$$

Las cepas aisladas con bandas idénticas tendrán un coeficiente SAB de 1 y las que no tienen bandas en común tendrán un coeficiente SAB de 0. Los dendrogramas se confeccionaron manualmente (21). Se escogió un coeficiente SAB mayor de 0,25 para hacer las agrupaciones. Los intervalos de confianza para las proporciones se calcularon con la fórmula $p \pm 1,96\sqrt{pq/n}$ (22).

RESULTADOS

De las 59 muestras de esputo recolectadas, 45 (76%) dieron resultados de cultivo positivos. Se identificaron 44 cepas de *M. tu-*

CUADRO 1. Resistencia inicial y adquirida a medicamentos antituberculosos en 45 cepas aisladas de *Mycobacterium* y resistencia en casos de recaída y en casos crónicos de tuberculosis. Armenia, Quindío, Colombia, 1993

	Cepas resistentes/ cepas en total	%
Resistencia inicial		
Isoniacida	2/42	4,8%
Isoniacida y estreptomina	2/42	4,8%
Total	4/42	9,5%
		(IC95%: 0,6 a 18)
Resistencia adquirida		
Caso de recaída		
Isoniacida, rifampicina y estreptomina	1/3	33,3%
Caso crónico		
Isoniacida, etambutol, rifampicina y estreptomina	1/3	33,3%
Total	2/3	66,6%
		(IC95%: 13 a 100)

berculosis y una de *M. africanum*. Esta última cepa fue sensible al tiofenol 2-carboxil hidrazida (TCH) y resistente a la niacina (23). Desafortunadamente no se pudo obtener una cantidad de micobacterias suficiente para realizar análisis de RFLP de esta cepa. Las pruebas de sensibilidad mostraron que 6 de 45 cepas aisladas (13%) eran resistentes a uno o varios medicamentos (IC95%: 3 a 23). La distribución de resistencia inicial y adquirida se indica en el cuadro 1.

Dos ejemplos de autorradiografías obtenidas por análisis de los RFLP del IS6110 se presentan en las figuras 1 y 2. Ninguna de las cepas procedentes de África y Europa mostraron perfiles similares a los de las cepas colombianas. Tanto en las unas como en las otras, el número de copias del IS6110 encontradas en los perfiles polimórficos varió de 6 a 17. No se detectaron cepas sin copias del IS6110. La distribución del número de copias se muestra en la figura 3. En las líneas 15 y 16 de la figura 2 los perfiles polimórficos, que corresponden a cepas aisladas de diferentes pacientes, son idénticos y tienen el mismo fenotipo de resistencia (a INH y SM), por lo que se deduce que se trata de la misma cepa. En la misma figura los perfiles polimórficos de las líneas 8 y 14 también son idénticos y pertenecen a cepas sensibles obtenidas de diferentes pacientes. La línea 10 de la figura 2 corresponde a una cepa multirresistente (a INH,

EM, RM y SM). Las cepas colombianas restantes fueron sensibles a todos los medicamentos.

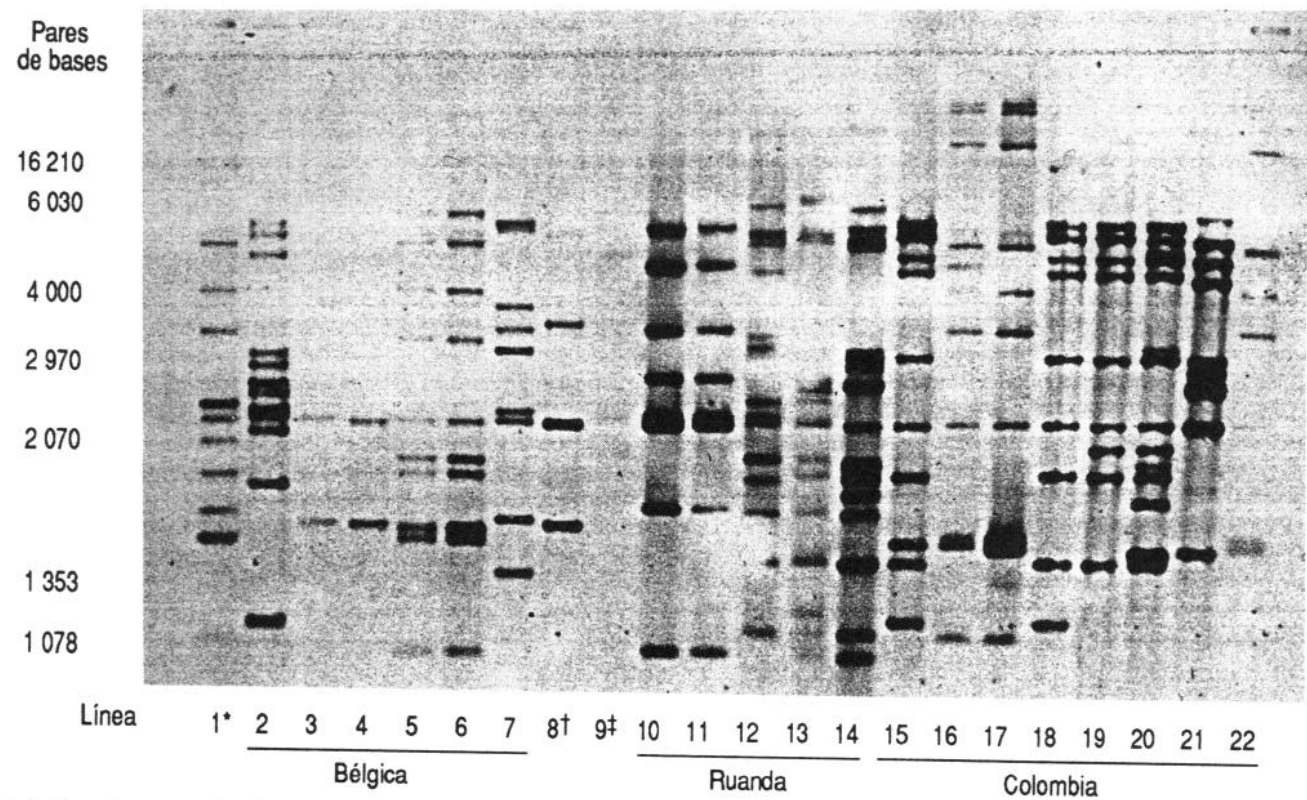
Veinte de las cepas aisladas mostraron perfiles similares pero no idénticos. El dendrograma (figura 4) construido a partir de los coeficientes SAB reveló cinco agrupamientos, de los cuales el más numeroso fue el A, seguido de C, B, D y E, respectivamente, en orden de frecuencia.

DISCUSIÓN

La muestra estudiada ilustra la situación que enfrentan actualmente los programas de control de la tuberculosis en lo que concierne a los pacientes bacilíferos. Los resultados de resistencia inicial a los antibióticos concuerdan con los obtenidos en la encuesta regional de la OPS en lo que respecta a la resistencia a INH, y a INH y SM (Kantor N, 1993, comunicación personal).

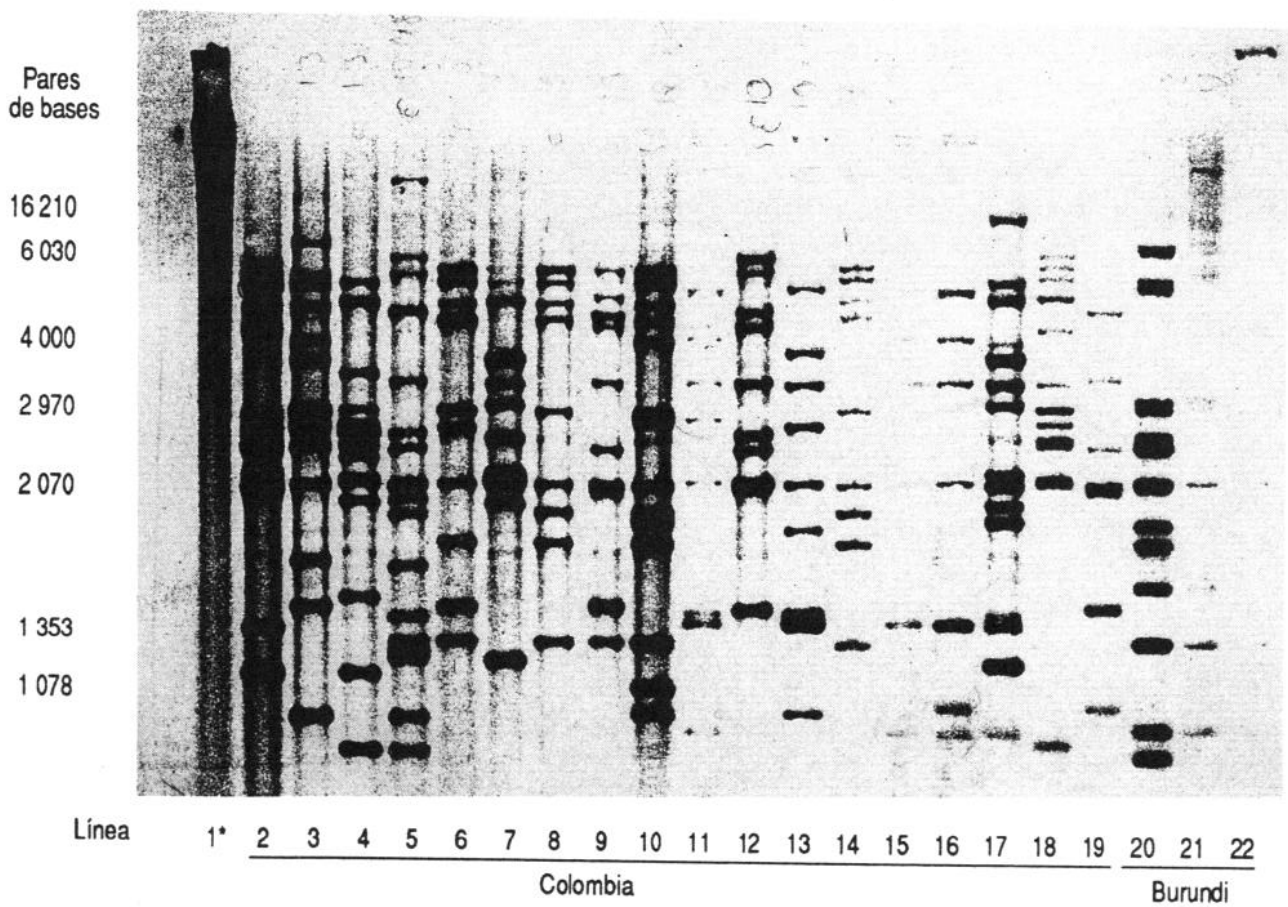
La situación en general constituye un llamado urgente a mejorar las tasas de curación y a aumentar el cumplimiento de los esquemas de tratamiento oficiales, que es el único medio eficaz para reducir los niveles de resistencia actuales. A pesar de la presencia de casos resistentes, el esquema terapéutico supervisado de 6 meses sigue siendo eficaz en casos de resistencia inicial a la SM y la INH y

FIGURA 1. Autorradiografía de los polimorfismos del tamaño (en pares de bases) del segmento de inserción 6110 en cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum* y *M. bovis* procedentes de Bélgica, Colombia y Ruanda



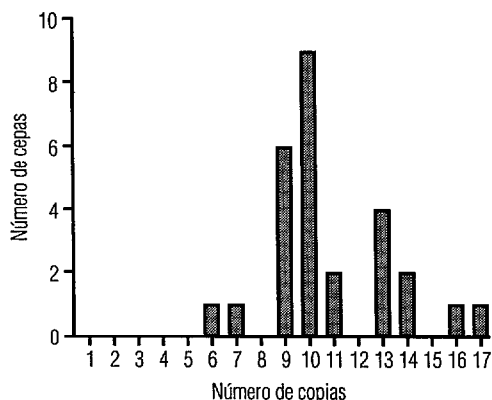
* La línea 1 corresponde a la cepa de referencia *Mt*14323, que da 10 bandas de tamaño conocido.
† La línea 8 corresponde a una cepa de *M. africanum* proveniente de un cerdo sudafricano.
‡ La línea 9 tiene dos bandas poco visibles que corresponden a una cepa de *M. bovis*.

FIGURA 2. Autorradiografía de los polimorfismos del tamaño (en pares de bases) del segmento de inserción 6110 en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* procedentes de Colombia y Burundi



* La línea 1 corresponde a la cepa de referencia *Mt*14323, que da 10 bandas de tamaño conocido.

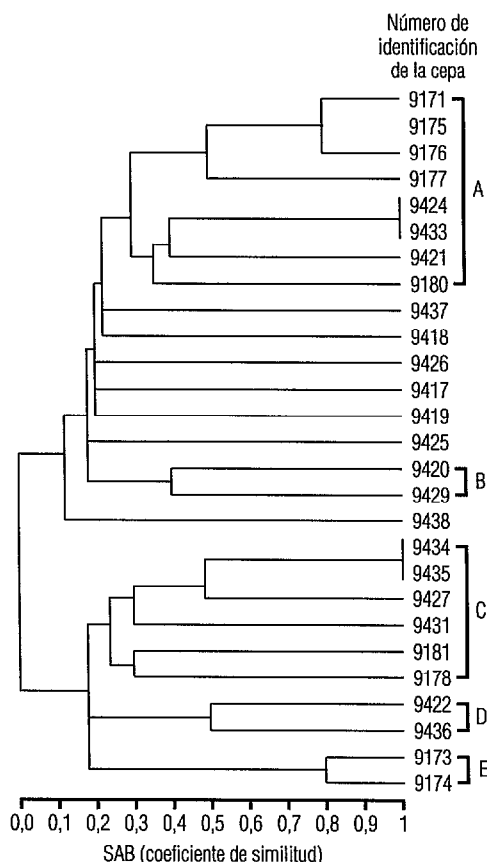
FIGURA 3. Número de cepas de *Mycobacterium* con determinado número de copias del segmento de inserción 6110. Armenia, Quindío, Colombia, 1993



por esta razón la resistencia puede ser reversible (24, 25). Pero la situación es muy diferente en los casos resistentes a RM e INH, en los cuales el mejor tratamiento disponible es casi siempre ineficaz y conlleva una alta mortalidad (26). Debe ser una prioridad de primer orden actualmente reforzar los programas de control de la tuberculosis en Colombia, pues el país aún se encuentra en una situación que puede controlarse si se aprovechan los recursos actualmente disponibles.

El presente trabajo examina por primera vez el polimorfismo del *IS6110* en cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes colombianos y es el primer informe al respecto, hasta nuestro conocimiento, en América Latina. La primera conclusión importante es que el análisis de RFLP escogido para este estudio permitió diferenciar la mayor parte de las cepas, lo cual implica que el polimorfismo es suficiente para usar la técnica como herramienta en el marco de la epidemiología molecular. Esto plantea muchos interrogantes sobre la utilidad de las nuevas técnicas de biología molecular en países en desarrollo, donde hay tasas elevadas de tuberculosis en la población en general. ¿Servirán para orientar la toma de decisiones en torno a los programas de control?

FIGURA 4. Dendrograma de cinco grupos de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, basado en sus coeficientes de similitud. Armenia, Quindío, Colombia, 1993



Resulta evidente que las prioridades actuales siguen vigentes, como se decía en el párrafo anterior, pero la tuberculosis no se comporta de manera estática en el medio latinoamericano. El número de nuevos casos de tuberculosis en el departamento del Quindío ha aumentado de forma alarmante y muestra un claro paralelo con la aparición de la epidemia de sida en esa zona. Actualmente se están llevando a cabo estudios para examinar la relación entre la seropositividad a VIH y la tuberculosis y los primeros resultados confirman la sospecha suscitada por los estudios epidemiológicos (resultados no publicados,

Programa de Tuberculosis del Instituto Seccional de Salud del Quindío). Ante la nueva situación epidemiológica el análisis de RFLP indudablemente ayudará a calcular la proporción de casos provocados por reactivación de una primoinfección o por transmisión reciente y a definir sobre esta base la duración de la quimioprofilaxis en pacientes positivos a VIH. En América Latina es de esperar que haya una distribución casi pareja de ambos mecanismos causales, dada su situación epidemiológica compleja: epidemias antiguas y nuevas y condiciones de vida modernas, por un lado, y por otro situaciones de subdesarrollo para gran parte de la población.

Pero también son importantes los datos que puede proporcionar la técnica sobre los patrones de transmisión. De 27 cepas estudiadas, 4 compartieron perfiles idénticos. Esto se puede atribuir a una transmisión reciente en estos pacientes y no a la reactivación de una infección antigua (27). Por consiguiente, el análisis de RFLP permitió descubrir dos fuentes de transmisión desconocidas y no detectadas por los métodos de búsqueda tradicionales. Como se mencionó anteriormente, el resultado más interesante es el de dos pacientes con un mismo patrón de resistencia a isoniácida y estreptomycin. Los datos epidemiológicos comúnmente utilizados para la búsqueda de contactos no habían mostrado ninguna relación entre las dos pacientes en cuestión. Estas procedían de la misma ciudad, pero no compartían la vivienda ni tenían lazos familiares, por lo que no hubo ninguna sospecha inicial. Ninguna de las dos había recibido tratamiento antituberculoso anteriormente, pero una de las pacientes vivía en contacto con un paciente en tratamiento.

El bajo porcentaje (76%) de muestras con cultivo positivo a micobacterias puede obedecer a una disminución de la viabilidad bacteriana durante el transporte y a que muchas muestras tenían un índice de bacilos copia bajo que correspondía a casos paucibacilares.

La técnica discutida en el presente estudio podría contribuir a mejorar los conocimientos actuales sobre los mecanismos

de diseminación de la tuberculosis. La identificación de cepas por medio del análisis de RFLP podrá aplicarse en futuros estudios para determinar la frecuencia con que aparecen cepas multirresistentes y explorar los factores que favorecen su propagación en la comunidad. Si la diseminación de cepas multirresistentes es frecuente, podría ser necesario cambiar radicalmente las estrategias de control, no solo a fin de detectar y tratar casos, sino también de eliminar las circunstancias que favorecen su diseminación. Recientemente los RFLP se han utilizado para hacer estudios sobre transmisión comunitaria en Estados Unidos y Suiza (28–31). En un estudio en el cantón de Berna, Suiza, un solo paciente contribuyó a 13% de los casos de tuberculosis del cantón (29) y en San Francisco, Estados Unidos, un solo paciente fue responsable de 6% de los casos en el período estudiado (31). En nuestro estudio nosotros encontramos que un solo paciente podía explicar todos los casos de resistencia inicial a la combinación de INH y SM. Esto podría ayudar a definir ciertos parámetros, como la detención forzada de pacientes que representan un peligro para la salud pública.

La estrecha relación encontrada en el presente estudio entre las diversas cepas colombianas es la esperada en países con una alta frecuencia de transmisión por contacto con personas infectadas y confirma que hay una circulación intensa del bacilo en el medio circundante (20 de las 27 cepas pertenecían a uno de los cinco agrupamientos). El fenómeno resulta más patente cuando se detectan polimorfismos idénticos en pacientes que no han entrado en contacto y que viven en ciudades diferentes (líneas 8 y 14, figura 2), lo cual significa que la cepa se ha diseminado con más rapidez que los factores que producen la transposición del *IS6110*. Sobre esta base, por lo menos 4 de 27 casos (14%) en el presente estudio se pueden atribuir a transmisión reciente. La situación se asemeja a la del África, donde 17 casos de 118 (15%) pueden atribuirse a la misma (20), pero es muy diferente a la de los Estados Unidos —191 casos de 473 (40%) en San Francisco (31) y 39 de 104 (37,5%) en Nueva York (30)— o a la de Túnez en la

zona de Menzel Bourguiba, con 53 casos de 128 (41%) (32). Es de notar que en Túnez hubo variaciones regionales importantes dentro del mismo país y que en otra zona se encontraron 67 cepas diferentes en 68 pacientes (32). Los resultados de estos estudios reflejan el impacto de la epidemia de sida en los Estados Unidos, la cual ha aumentado el número total de casos nuevos de tuberculosis y explica el gran porcentaje de casos debidos a transmisión reciente. Es posible que al hacerse más estudios en América Latina también se puedan encontrar variaciones locales y focos microepidémicos recientes.

Nuestro estudio es el primero en notificar la infección sintomática por *M. africanum* en Colombia. Al compararse los perfiles de las cepas micobacterianas colombianas con los de las cepas africanas y europeas no se encontraron similitudes, aunque todas las cepas mostraron de 6 a 17 bandas (9), independientemente de su origen geográfico. En nuestro estudio no se detectaron cepas sin copias del IS6110, como en Vietnam (33) y en la India (34), donde será por consiguiente necesario usar otros elementos de inserción para hacer análisis de RFLP.

Según los resultados preliminares de otros estudios en que se han comparado cepas de diferente procedencia geográfica, parece factible crear agrupaciones basadas en el origen geográfico de las cepas (9, 20). Con el fin de explorar esta posibilidad, actualmente se están llevando a cabo varios proyectos basados en la recolección de un gran número de cepas y en su análisis por computadora.

El análisis de RFLP puede usarse para hacer estudios epidemiológicos en los laboratorios centrales o nacionales de referencia. Su bajo costo, de aproximadamente US\$ 1,50 por muestra, pone la técnica al alcance de los países en desarrollo. Si se tienen en cuenta los posibles beneficios de su aplicación, la relación costo-beneficio es muy favorable y ampliamente justifica la inversión. Es de esperar que los estudios efectuados con la técnica redunden en medidas de control más eficaces. Entre los estudios que podrían realizarse figuran la determinación de la frecuencia de fracasos terapéuticos en casos adquiridos por

transmisión o por reactivación; el seguimiento de las fuentes de diseminación de cepas multirresistentes; el control de calidad en los laboratorios centrales o regionales especializados en micobacterias (35); y la detección y estudio de brotes de infección nosocomial. En conclusión, el análisis de RFLP, que permite distinguir en el nivel molecular entre distintas cepas de *M. tuberculosis*, es una herramienta valiosa aplicable al estudio epidemiológico de la tuberculosis y permite esclarecer dudas fundamentales que durante largo tiempo no habían logrado resolverse.

AGRADECIMIENTO

Se agradece a la Administración General de la Cooperación para el Desarrollo (AGCD) del Reino de Bélgica la concesión de la beca de estudio que contribuyó al presente trabajo. También se agradecen la valiosa colaboración del doctor Henry Arboleda, del Programa de Tuberculosis del Instituto Seccional de Salud del Quindío, la asistencia técnica de Krista Fissette y la generosa contribución del doctor J. D. A. van Embden, del Laboratorio de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud Pública y del Medio Ambiente de Bilthoven, Holanda, quien proporcionó la sonda de ADN utilizada en los análisis.

REFERENCIAS

1. Colombia, Ministerio de Salud. Número de casos de tuberculosis reportados. En: Ministerio de Salud de la República de Colombia. *Boletín interno*. Bogotá: MS, Oficina de Control de Patologías; 1991.
2. Zuluaga L, Betancur C, Abaunza C, Abaunza M, Londoño J. Prevalencia de tuberculosis y enfermedad respiratoria en personas mayores de 15 años de la comuna nororiental de Medellín, Colombia. *Bol Oficina Sanit Panam* 1991;11:406-413.
3. Sudre P, ten Dam G, Kochi A. Tuberculosis: a global overview of the situation today. *Bull WHO* 1992;70:149-159.
4. Kochi A, Varelzdis B, Styblo K. Multidrug resistant tuberculosis and its control, 9th Forum in Microbiology. *Res Microbiol* 1993;144:2-9.

5. Bloom BR, Murray CJL. Tuberculosis: Commentary on a reemerging killer. *Science* 1992;257:1055–1064.
6. Porter JDM, Mc Adam KPW. I. Tuberculosis in Africa in the AIDS era: the role of chemoprophylaxis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992;86:467–469.
7. Hernández MP. Tuberculosis: retorno mortal. *El Tiempo*, Colombia, 13 de junio de 1993, p. 7c.
8. van Embden JDA, van Soolingen D, Small P, Hermans PWM. Genetic markers for the epidemiology of tuberculosis, 8th Forum in Microbiology. *Res Microbiol* 1992;143:385–391.
9. van Soolingen D, Hermans PWM, de Haas PEW, Sol DR, van Embden A. The occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of IS dependent DNA polymorphisms as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1991;29:2578–2586.
10. Daley CL, Small PM, Scheter GF, et al. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with human immunodeficiency virus: an analysis using restriction fragment length polymorphisms. *N Engl J Med* 1992;326:231–235.
11. Fischl MA, Uttamchandani RB, Daikos CG, et al. An outbreak of tuberculosis caused by multidrug resistant tubercle bacilli among patients with HIV infection. *Ann Int Med* 1992;117:177–183.
12. Edin BR, Tokars JJ, Grieco ML, et al. An outbreak of multidrug resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1992;326:1514–1521.
13. Crawford JT. Applications of molecular methods to epidemiology of tuberculosis, 9th Forum in Microbiology. *Res Microbiol* 1993;144:111–115.
14. World Health Organization. Guidelines for tuberculosis treatment in adults and children in National Tuberculosis Programs. Geneva: WHO; 1991. (Documento WHO/TUB/91–161).
15. Smithwick RM, Stratigos CB, David HL. Use of cetylpyridinium chloride for the decontamination of sputum specimens that are transported to the laboratory for the isolation of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1975;1:411–413.
16. Petroff SA. A new and rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from the sputum and feces. *J Exp Med* 1915;21:38–42.
17. Jenkins PA, Pattyn SR, Portaels F. Diagnostic bacteriology. En: Ratledge C, Stanford JL, eds. *The biology of the mycobacteria*. London: Academic Press; 1982:441–479.
18. Cannetti G, Wallace Fox A, Komenko A, et al. Advances in technique of testing mycobacterial drug sensitivity and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programs. *Bull WHO* 1969;41:21–43.
19. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993;31:406–409.
20. Godfrey-Fausset P, Stoker NG. Aspects of tuberculosis in Africa: 3. Genetic fingerprinting for clues to the pathogenesis of tuberculosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992;86:472–475.
21. Kaneko T. Correlative similarity coefficient: new criterion for forming dendrograms. *Int J Syst Bacteriol* 1979;29:188–193.
22. Schwartz D. *Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes*. Tercera edición. Paris: Paris-Flammarion, Médecine-Sciences; 1969.
23. Levy-Frébault V, Portaels F. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *Int J Syst Bacteriol* 1992; 42:315–323.
24. Mitchinson DA. Drug resistance in Mycobacteria. *British Med Bull* 1984;40:84–90.
25. Giraldo E. Estudio mundial de resistencia inicial y adquirida a las drogas antituberculosas: muestra colombiana. *Bol Cocobatulé* 1990;1:6–7.
26. Goble M, Iseman MD, Madsen LA, et al. Treatment of 171 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampicin. *N Engl J Med* 1993;328:527–532.
27. Hamburg MA, Friden TR. Tuberculosis transmission in the 1990s. *N Engl J Med* 1994;330:1750–1751.
28. Tabet SR, Goldbaum GM, Hooton TM, Eisenach KD, Cave MD, Nolan CM. Restriction fragment length polymorphism analysis detecting a community-based tuberculosis outbreak among persons infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1994;169: 189–192.
29. Genewein A, Talenti A, Bernasconi C, et al. Molecular approach to identifying route of transmission of tuberculosis in the community. *Lancet* 1993;342:841–844.
30. Alland D, Kalkut GE, Moss AR, et al. Transmission of tuberculosis in New York City: an analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N Engl J Med* 1994;330:1710–1716.
31. Small PM, Hopewell PC, Sing SP, et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco: a population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med* 1994; 330:1703–1709.

32. 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;31:2446–2450.
33. Yuem LKW, Ross BC, Jackson KM, Dwyer B. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* from Vietnamese patients by southern-blot hybridization. *J Clin Microbiol* 1993;31:1615–1618.
34. van Soolingen D, de Haas PEW, Hermans PWM, Groenen PMA, van Embden JDA. Comparisons of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1993;31:1987–1995.
35. Small PM, McLenny NB, Singh SP, Schoolnik GK, Tomkins 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;31:1677–1682.

ABSTRACT

Restriction fragment length polymorphism analysis and the epidemiology of tuberculosis

The purpose of this study was to determine the polymorphism of insertion segment 6110 (*IS6110*) in strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from Colombian patients as well as the current status of resistance to antituberculosis drugs in the department of Quindío, Colombia. To this end, a prospective study was performed with a consecutive sample of 59 patients who sought care at local health centers and hospitals in rural and urban areas of Quindío from March to July 1993. The patients in the sample had symptomatic pulmonary tuberculosis confirmed by bacteriologic inspection of sputum, with and without a history of treatment, and were participants in the Tuberculosis Control Program of the Sectional Health Institute of Quindío in Armenia, Colombia.

Sputum cultures and drug sensitivity tests were done. Later, restriction fragment length polymorphisms (RFLP) of *IS6110* were analyzed in accordance with the protocols of van Soolingen et al. (1992). Cases were classified by treatment history, applying the criteria of WHO (1991).

The results showed 44 cultures positive for *M. tuberculosis* and one positive for *M. africanum*. Primary drug resistance was found in 4 of 42 cultures, or 9.5% (CI95%: 0.6 to 18); 4.8% were resistant to isoniazid (INH) and 4.8% to isoniazid and streptomycin (INH-SM). Acquired resistance was found in two of three cultures, or 66% (to isoniazid, rifampicin, and streptomycin [INH-RM-SM] and to isoniazid, ethambutol, rifampicin, and streptomycin [INH-EMB-RM-SM]). In 27 strains submitted to RFLP analysis, the number of copies of *IS6110* varied from 6 to 17. Similarity coefficients revealed five distinct groups.

In conclusion, RFLP analysis of *IS6110* was able to identify different strains of mycobacteria, which would make it a useful tool in epidemiologic studies and in decision-making in tuberculosis control programs.