

Epidemiología molecular de la tuberculosis: principales hallazgos y su aplicación en España

E. García-Pachón^a y J.C. Rodríguez^b

^aSección de Neumología. Hospital General Universitario. Elche. Alicante.

^bSección de Microbiología. Hospital General Universitario. Elche. Alicante. España.

Introducción

En 1991 se alcanzaron los primeros éxitos en la obtención de secuencias repetitivas en el genoma de *Mycobacterium tuberculosis*^{1,2}. Este ha sido el punto de partida que ha permitido comparar las huellas genéticas de los distintos aislamientos y, por tanto, establecer diferencias entre diversas cepas. Al diferenciar las cepas aisladas, ha sido posible obtener nueva información sobre la epidemiología de la enfermedad³ que ha cambiado de forma revolucionaria muchos conceptos sobre la transmisión de la tuberculosis que se habían aceptado durante décadas. Hoy se dispone de información sobre cómo contribuye la reactivación y la transmisión reciente en áreas con diferente prevalencia y sobre sus factores de riesgo, así como de la frecuencia de reinfección exógena y en qué zonas es más o menos frecuente. También existen nuevos datos, por ejemplo, sobre la infectividad de la tuberculosis con tinción de esputo negativa, la transmisibilidad diferente de distintas cepas y otras diferencias fenotípicas entre cepas de *M. tuberculosis*.

En esta revisión, orientada a los conocimientos de interés clínico, se describen en primer lugar los métodos más usuales de tipificación molecular de *M. tuberculosis* y se resume la información más novedosa que se ha obtenido gracias a la aplicación de la epidemiología molecular, con especial referencia a los estudios realizados en nuestro país.

Métodos de tipificación molecular de *Mycobacterium tuberculosis*

Para la identificación de cepas, durante mucho tiempo se han utilizado marcadores que se basan en las características expresadas por los microorganismos (fagotipia, resistotipia, serotipia y análisis de plásmidos). Actualmente estas técnicas fenotípicas se están sustituyendo

por técnicas moleculares que analizan la huella genética. Se han desarrollado diversos métodos de tipificación que se basan en el análisis del grado de similitud y distribución de estos elementos variables entre los aislamientos, en el estudio de la presencia o ausencia de determinados fragmentos de ADN y en la comparación del genoma completo del microorganismo^{4,5}.

Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (restriction fragment length polymorphism, RFLP)

Es el método más utilizado y el que se considera de referencia⁶. Se realiza siguiendo un protocolo estandarizado⁷ que analiza la secuencia IS6110 y es una técnica muy reproducible y útil para distinguir entre los aislamientos relacionados epidemiológicamente de los no relacionados, de modo que se ha utilizado como indicador de transmisión reciente. Se basa en estudiar el número de veces que el fragmento IS6110 se repite en el genoma de la micobacteria (generalmente entre 0 y 25 veces). Sin embargo, esta técnica presenta algunas limitaciones, ya que no puede utilizarse si la micobacteria tiene menos de 6 copias de este fragmento en su cromosoma, en cuyo caso es preciso la utilización de otras técnicas^{8,9}. Además, requiere grandes cantidades de ADN (lo que implica la realización de subcultivos que precisan varias semanas), es técnicamente complejo y caro^{6,10}.

Spoligotyping

Es un método muy utilizado por su relativa simplicidad, rapidez y bajo coste, generalmente como complemento del anterior. Este método estudia la presencia o ausencia de 43 fragmentos de ADN, llamados espaciadores. Requiere menos ADN que el RFLP y, al expresarse en forma de positivo o negativo (de cada espaciador), puede analizarse en un formato digital. Existe una base de datos internacional con más de 11.000 patrones ("espiligotipos") de aislamientos obtenidos en más de 90 países¹¹. Sin embargo, este método no reemplaza por completo al RFLP por su menor poder discriminante^{10,12}.

Este trabajo ha sido financiado en parte por la Escuela Valenciana de Estudios para la Salud.

Correspondencia: Dr. E. García-Pachón.
Sección de Neumología. Hospital General Universitario.
03203 Elche. Alicante. España.
Correo electrónico: egpachon@hotmail.com

Recibido: 9-12-2004; aceptado para su publicación: 4-1-2005.

Número variable de repeticiones en tándem (variable number tandem repeat, VNTR)

El método se basa en la detección del número de veces que se repiten de forma adyacente varias secuencias dentro del genoma de la micobacteria. El más utilizado es el *mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat analysis* (MIRU-VNTR), que determina las unidades repetitivas en 12 *loci* con un método de reacción en cadena de la polimerasa. En cada uno de los 12 *loci* hay de 2 a 8 alelos, lo que da lugar a unos 20 millones de posibles combinaciones de alelos. El MIRU-VNTR es más discriminante que el *spoligotyping* y similar al basado en RFLP-IS6110¹³. El método de MIRU-VNTR se puede automatizar y técnicamente es más simple, por lo que es previsible que se imponga como método de referencia⁶. Además, existe una base de datos internacional accesible por Internet para poder comparar los hallazgos¹⁴.

Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (amplified fragment length polymorphism, AFLP)

Se diferencia de los otros métodos en que estudia todo el genoma de la micobacteria, por lo que podría ser más específico que el RFLP para confirmar la transmisión reciente de una cepa¹⁵. Sin embargo, este método, basado en la reacción en cadena de la polimerasa, es caro, requiere mucho tiempo y personal muy especializado¹⁶ y, además, su posible aplicación en estudios de epidemiología molecular y la interpretación de sus resultados todavía deben evaluarse con más profundidad.

Proporción de transmisión reciente de tuberculosis

La transmisión reciente se asume cuando se obtienen diversos aislamientos de *M. tuberculosis* que tienen huellas de ADN idénticas o muy similares, que se denominan “aislamientos en agregaciones” o *cluster cases*. Cuando, por el contrario, se aíslan patrones únicos de ADN, se considera en general que se debe a la reactivación de una infección adquirida en un momento muy anterior^{5,10}. El ADN de *M. tuberculosis* se modifica pro-

gresivamente con el tiempo. En diversos estudios¹⁷⁻²⁰ el tiempo necesario para que se modifique la huella de ADN (semivida) estudiada mediante RFLP de IS6110 se calculó entre 2 y más de 30 años. Puede asumirse que este tiempo debe variar en función de distintos factores, como la eficacia del tratamiento, el intervalo entre el inicio de la enfermedad y el del tratamiento y, probablemente, el predominio en cada zona de cepas más o menos estables del patógeno²¹, así como la situación de latencia o de enfermedad activa del germen²⁰.

Basados en esta premisa, se han publicado numerosos estudios sobre la proporción de casos atribuibles a transmisión reciente. Es muy interesante señalar que en Estados Unidos^{22,23} y en Europa^{24,25}, incluso en áreas de muy baja incidencia de tuberculosis, la proporción de aislamientos en agregaciones puede llegar a más del 40%, lo que indica que la transmisión reciente de *M. tuberculosis* puede ser un factor más importante de lo que se suponía. Aunque cabría suponer que en países con una alta incidencia de tuberculosis y con un sistema sanitario deficiente debería existir un elevado porcentaje de tuberculosis asociadas a transmisión reciente, los estudios realizados muestran resultados muy variables, del 30 al 80% en África, del 50 al 80% en Asia y, sorprendentemente, de sólo el 20% en otros estudios²⁶⁻²⁸. Este hallazgo paradójico se explica por las características metodológicas de los estudios; así, se sabe que en áreas de elevada incidencia los estudios que incluyen pocos casos subestiman de forma muy acusada la transmisión reciente²⁹.

En nuestro país se han publicado 9 estudios de epidemiología molecular sobre la transmisión de tuberculosis³⁰⁻³⁸ que utilizan RFLP solo o en asociación con *spoligotyping* (tabla I). Los porcentajes de agregación (transmisión reciente) oscilan entre el 28% de Segovia y el 58% de Gran Canaria. Aunque estos porcentajes pueden reflejar la diferente situación de la enfermedad en las distintas áreas, algunas características de los estudios pueden influir en los resultados (como la duración o el número de casos no incluidos). También, mediante estos métodos, se ha podido demostrar la conexión epidemiológica en brotes de tuberculosis multirresistente en España³⁹.

TABLA I
Estudios de epidemiología molecular sobre la transmisión de la tuberculosis en España

Autor y año	Período del estudio (años)	Lugar	Método	N.º de pacientes	Porcentaje de agregación (cluster cases)
Safi et al ³⁰ , 1997	3	Sevilla	RFLP	175	38
Samper et al ³¹ , 1998	1	Zaragoza	RFLP	226	39
Íñigo Martínez et al ³² , 2000	2	Madrid	RFLP y <i>spoligotyping</i>	148	42
Solsona et al ³³ , 2001	2	Ciutat Vella, Barcelona	RFLP	171	46
Fernández de la Hoz et al ³⁴ , 2001	2	Población urbana del sur de Madrid y población penitenciaria	RFLP	231	48
Elizaga et al ³⁵ , 2002	5	Segovia	RFLP y <i>spoligotyping</i>	87	28
Ruiz et al ³⁶ , 2002	7	Elche	RFLP	147	52
Pena et al ³⁷ , 2003	4	Gran Canaria	RFLP	409	58
Íñigo Martínez et al ³⁸ , 2003	3	Madrid	RFLP y <i>spoligotyping</i>	233	42

RFLP: polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción.

Muchos autores prefieren utilizar la incidencia de casos agregados (por 100.000 habitantes por año), en lugar de la proporción^{26,40}. Así, por ejemplo, el descenso de la incidencia de agregaciones en San Francisco desde 1991, cuando fue de 10,4, hasta 1997 (año en que fue de 3,8 casos por 100.000 habitantes), era un claro reflejo del descenso de la transmisión reciente en este período⁴⁰.

Combinado con métodos de epidemiología clásica, estos datos permiten conocer, por ejemplo, la transmisión entre distintos grupos étnicos o sociales. De este modo, en Países Bajos se ha estimado que el 17% de los casos del país se deben a la transmisión reciente de extranjeros²⁴. En Países Bajos se prevé que en el año 2030 al menos el 60% de los casos de tuberculosis en pacientes nacidos en ese país se deberán a la transmisión por inmigrantes⁴¹.

Sin embargo, Murray y Nardell²⁶ insisten en que los casos de *cluster* deben interpretarse con precaución para estimar la verdadera carga de transmisión reciente de tuberculosis, debido a que la agrupación de casos varía dependiendo de las características del huésped y de la población⁴². Por ejemplo, en áreas rurales se pueden apreciar genotipos similares que no reflejan necesariamente una infección reciente⁴³. Además de la transmisión reciente de la enfermedad, diversos factores pueden dar lugar a patrones genotípicos similares: la reactivación simultánea de una infección con el mismo organismo que se había adquirido mucho antes (coincidencia en el tiempo), el predominio regional de una cepa bacteriana que se ha difundido a lo largo de mucho tiempo (cepas endémicas), un cambio de localización de la secuencia de inserción en el mismo lugar y, por supuesto, un error de laboratorio³. También se da la situación contraria; es posible considerar un aislamiento como reactivación endógena cuando se asocia a otros casos no detectados. La probabilidad de interpretar erróneamente un único patrón de ADN como una reactivación endógena aumenta cuanto menor es la duración del estudio (no deben ser menores de 2 años) y cuantos menos casos puedan analizarse^{3,44}.

Factores de riesgo de transmisión reciente

A partir de los datos de agregación de casos, algunos autores han intentado determinar las características que constituyen factores de riesgo para la transmisión reciente. En el estudio de Alland et al²² fueron factores de riesgo la edad más joven, ser nacido en Estados Unidos, ser hispano y la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Sin embargo, con frecuencia los resultados no coinciden entre los diversos estudios, lo que refleja tanto la diversidad de la transmisión de la enfermedad en distintas comunidades como las dificultades metodológicas^{44,45}.

La duración de los síntomas, que teóricamente podría reflejar un mayor riesgo de transmisión, no se ha asociado al tamaño de los *clusters* definidos por técnicas moleculares⁴⁶. Es importante señalar que, aunque la transmisión reciente es más frecuente en pacientes con baciloscopia positiva en el esputo, los casos con baci-

loscopia negativa pueden ser responsables de un número relativamente importante de transmisiones⁴⁷.

En un estudio realizado en Elche que analizaba los factores clínicos y socioeconómicos que se asociaban a pertenecer a una agregación de casos, se obtuvieron como variables independientes la edad menor de 25 años, la existencia de un elevado porcentaje de infección en el primer círculo de contactos, la vivienda urbana, el uso de broncoscopio para la obtención de las muestras y el trabajar en contacto con muchas personas⁴⁸. En el extenso estudio realizado en Gran Canaria sólo la menor edad se asoció al riesgo de pertenecer a una agregación de casos³⁷.

Riesgo de transmisión reciente en pacientes con infección por el VIH

En los pacientes con infección por el VIH el elevado riesgo de tuberculosis está bien establecido, aunque los actuales tratamientos antirretrovirales pueden contribuir al descenso de la enfermedad en este grupo de pacientes⁴⁹. Diversos estudios de epidemiología molecular han analizado la infección por el VIH como factor de mayor riesgo de transmisión reciente. Aunque la mayoría de estudios indican esta infección como un potente factor de riesgo^{22,23,36,40,50}, en otros estudios no se ha confirmado^{31,51}. Es posible que diferencias en las características sociales (como el uso de drogas intravenosas o, especialmente, la estancia en prisión) de estos pacientes en cada país influyan en el riesgo^{32,34,52}.

Reinfección exógena

Una de las cuestiones clásicas en la transmisión de la tuberculosis era la verdadera importancia de la reinfección exógena. Durante mucho tiempo se ha considerado que alrededor del 90% de los casos de tuberculosis en los países desarrollados se debía a la reactivación de una infección adquirida previamente⁵³. Con los métodos de epidemiología clásica y las características fenotípicas (de resistencia) de los gérmenes ya se había demostrado la existencia de reinfección exógena⁵⁴⁻⁵⁶. Aunque es, obviamente, difícil establecer si una enfermedad tuberculosa se debe a la activación de una enfermedad latente o a una nueva infección exógena, los datos de la epidemiología molecular han permitido mejorar nuestro conocimiento en esta cuestión.

En una zona de gran incidencia de tuberculosis se analizaron 16 casos con recurrencia de la enfermedad tras completar correctamente el tratamiento; en 12 de ellos se identificaron cepas diferentes de la que produjo la enfermedad inicial⁵⁷. También en países con menor incidencia de tuberculosis la reinfección es importante^{58,59}. En nuestro país, Caminero et al⁵⁹ pudieron realizar análisis genotípico en las muestras de 18 pacientes en quienes se habían obtenido cultivos positivos de *M. tuberculosis* con, al menos, 12 meses de diferencia; en el 44% de los casos los genotipos eran diferentes, lo que indica reinfección exógena. En un extenso estudio de recurrencia de casos de tuberculosis en Madrid, en 14 de los 43 pacientes analizados (33%) en un período

de 12 años se estableció que la recurrencia se debía a una reinfección exógena⁶⁰. Por el contrario, en países con baja incidencia de tuberculosis, como Estados Unidos o Canadá, la proporción de reinfecciones parece ser muy inferior⁶¹.

Programas de control de la tuberculosis

Los estudios de epidemiología molecular han permitido detectar brotes de casos relacionados de tuberculosis que se habían pasado por alto con la epidemiología clásica^{23,62-64} y de este modo se ha conseguido mejorar los estudios de contactos. En un estudio se pudo multiplicar por 3 el número de contactos identificados por cada caso de tuberculosis⁴⁰. La aplicación de un método de captura-recaptura que combina la epidemiología clásica y la molecular ha producido, en nuestro país, una excelente mejora en la detección de casos relacionados en la transmisión reciente⁶⁵.

Además de dirigir los estudios de nuevos contactos, la información de la epidemiología molecular resulta útil para evaluar los resultados de los programas de control de la enfermedad. Como se ha mencionado previamente, entre 1991 y 1997 se observó un descenso del número de casos asociados en *cluster* en San Francisco, lo que hacía pensar que las medidas de control adoptadas habían permitido disminuir la diseminación de la tuberculosis⁴⁰.

Un ejemplo evidente de la necesidad de este tipo de estudios se puede observar en los análisis epidemiológicos que se llevan a cabo en algunos países y que permiten diseñar políticas específicas contra la tuberculosis. Es importante poder distinguir si, en un área determinada, en la población afectada por tuberculosis ésta se debe a una infección reciente o a la reactivación de una tuberculosis latente. Si, en efecto, los casos por infección reciente son significativos, deben intensificarse las medidas de búsqueda de casos y su tratamiento. Si, por el contrario, es la infección latente la causa principal, deberán aplicarse las medidas para prevenir la reactivación⁶⁶.

Aunque existen todavía ciertas incertidumbres en los métodos de tipificación genómica (selección del método ideal con información reproducible y un coste razonable) y su interpretación, la aplicación de estas técnicas en las prácticas habituales de prevención y control de la tuberculosis se consideran actualmente justificadas⁶⁷, y parece especialmente útil la existencia de centros de referencia que permitan los estudios más allá de una determinada área sanitaria⁶⁸⁻⁷⁰.

Riesgo de transmisión de tuberculosis a trabajadores sanitarios

En una revisión reciente, Seidler et al⁷¹ sólo encuentran 2 estudios de epidemiología molecular que permiten cálculos separados de la proporción de casos en *cluster* para trabajadores sanitarios y no sanitarios^{72,73}. En Nueva York, en un estudio que incluía 142 casos de tuberculosis, el porcentaje de agregación fue del 65% en los trabajadores sanitarios y del 41% en el resto de los pacientes⁷²; sus autores concluyen que muchos de

los casos entre personal sanitario pueden ser casos de infección ocupacional. En otro estudio, realizado en Amsterdam, el resultado fue contrario, y los trabajadores sanitarios tenían menos probabilidades de estar implicados en un *cluster*, sin que los autores pudieran encontrar una explicación para este hallazgo⁷³.

En nuestro país, Tudó et al⁷⁴ analizaron a los pacientes hospitalizados con tuberculosis en busca de una posible transmisión intrahospitalaria no detectada de la enfermedad. Mediante RFLP pudieron comprobar que no se produjo agregación de casos secundaria a la transmisión de estos pacientes en el hospital, y tampoco se detectó ningún caso de transmisión a los pacientes que compartieron habitación con los enfermos de tuberculosis. De estos datos podría deducirse que el riesgo de contagio es muy bajo. Sin embargo, también en nuestro país se ha descrito recientemente una elevada incidencia acumulada de tuberculosis en trabajadores sanitarios⁷⁵ que induce a pensar que existe un riesgo por exposición laboral.

Todos estos datos muestran que es necesario realizar estudios prospectivos que combinen métodos de epidemiología clásica y molecular para establecer el verdadero riesgo de transmisión de tuberculosis en trabajadores sanitarios⁷¹.

Transmisión de las diferentes cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

Tradicionalmente se consideraba que las distintas cepas de *M. tuberculosis* tenían una virulencia similar⁶. Sin embargo, los estudios moleculares han permitido confirmar la existencia de cepas con características fenotípicas específicas. Varias de las cepas identificadas se han asociado en brotes epidémicos ampliamente dispersos tanto geográfica como temporalmente, lo que permite suponer que son cepas más virulentas o bien más transmisibles (*supertransmisers*).

Un ejemplo lo constituye la familia de *M. tuberculosis* denominada Beijing/W. La cepa de genotipo Beijing se ha visto implicada en grandes transmisiones en Estados Unidos, Asia, Europa del Este y la Federación Rusa⁷⁶. Esta cepa está ampliamente distribuida, sobre todo en Asia, donde es predominante, pero también en Europa, Estados Unidos, Sudamérica, países del Caribe y África⁵. Se ha comprobado por *spoligotyping* que la cepa W, detectada en la década de 1990 en EE.UU. y que causó brotes con multirresistencia, es una rama evolucionada de las cepas de genotipo Beijing, por lo que se ha establecido la existencia de la familia Beijing/W¹⁰. El predominio de las cepas Beijing en muchas regiones puede indicar que tienen una ventaja selectiva sobre otras cepas^{10,77}. En la isla de Gran Canaria se ha demostrado una rápida diseminación de esta cepa desde un único paciente hasta constituir, en 4 años, el 27,1% de los aislamientos de *M. tuberculosis*⁷⁷. Aunque no de forma constante, la cepa Beijing se ha asociado en varios estudios a resistencia a fármacos⁷⁸. Estas cepas de *M. tuberculosis* muestran una mayor capacidad para replicarse en los macrófagos humanos y éste podría ser el mecanismo para su mayor propagación⁷⁹. Sin embargo, este

tipo de hallazgos puede deberse no sólo a una mayor virulencia del germen, sino también a la distinta inmunogenicidad, a distinta transmisibilidad, a un crecimiento diferente o a características de la población expuesta^{26,80}.

Transmisión de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a fármacos

Con frecuencia se ha asumido que las cepas resistentes a fármacos se transmiten en menor proporción que el resto de cepas. En diversos estudios se ha observado una asociación negativa entre la agrupación de casos y la resistencia a fármacos antituberculosos^{51,81}. Sin embargo, no todos los resultados coinciden en este sentido. También hay estudios que describen brotes con numerosos casos de tuberculosis multirresistente^{82,83}, y en un estudio realizado en Noruega el hecho de estar infectado por una cepa resistente se asoció de forma independiente a formar parte de un *cluster* (transmisión reciente)⁴⁵. Se ha observado también un gran riesgo de diseminación de las cepas de la familia Beijing/W que presentan resistencia^{22,84}.

Murray y Nardell²⁶ proponen varias razones que explicarían por qué los *clusters* de tuberculosis con resistencia a uno o más fármacos pueden ser menores que los *clusters* de los casos sensibles: los pacientes con tuberculosis multirresistente son menos accesibles a los sistemas de salud en muchos países, pueden tener menos contactos sociales o éstos pueden haber estado expuestos al germen con mayor frecuencia.

Otras utilidades del uso de la genotipificación

Aunque en un extenso estudio en Londres sólo se halló un 0,93% de falsos positivos en cultivos de tuberculosis por contaminación cruzada en el laboratorio⁸⁵, algunos estudios señalan que hasta el 3% de los cultivos de tuberculosis son falsos positivos, especialmente cuando la tinción de las muestras es negativa y hay un único crecimiento en cultivo^{85,86}. En estos casos, y cuando la sospecha clínica no apoya el diagnóstico de tuberculosis, la tipificación de los aislamientos puede aportar información que evite tratamientos innecesarios^{6,86}. Si el genotipo de la cepa de dudosa significación clínica se corresponde con el de otra cepa manipulada simultáneamente en el laboratorio, es muy probable que se haya producido una contaminación.

Otra posible utilidad es en pacientes que reciben o han recibido tratamiento para su tuberculosis y aparecen resistencias en nuevos cultivos. La genotipificación permitiría distinguir si se trata de una reinfección exógena o si es la misma cepa que se ha hecho resistente. En este último caso habría que investigar el cumplimiento terapéutico del paciente, la posibilidad de malabsorción de los fármacos o la interacción farmacológica⁶. Se ha comprobado que el incumplimiento terapéutico es una causa de diseminación de la enfermedad⁸⁷.

También en los ensayos clínicos de fármacos antituberculosos es importante (y ahora posible) diferenciar si los fracasos terapéuticos no son, en realidad, nuevas infecciones⁶.

La genotipificación permite también la comparación de familias de *M. tuberculosis* en las bases de datos internacionales existentes o en desarrollo^{14,88}, y de este modo detectar y controlar brotes amplios que podrían no identificarse adecuadamente en estudios de ámbito local.

Conclusiones y perspectivas

La epidemiología molecular de la tuberculosis ha aportado información novedosa y muchas veces insospechada sobre la transmisión de la enfermedad. Por supuesto, este método debe interpretarse como un complemento de la epidemiología clásica, a la que no pretende sustituir. Es importante que se conozcan qué cepas son las que predominan en nuestra comunidad y cómo varían con el tiempo los casos atribuibles a transmisión reciente, así como determinar por qué se transmiten y qué colectivos precisan de un mayor cuidado. La creciente inmigración, con nuevas cepas de *M. tuberculosis*, supone un reto de vigilancia epidemiológica en la que los estudios moleculares van a resultar imprescindibles. Todo ello exige la realización de continuos estudios en nuestro país y, posiblemente, disponer de centros de referencia que permitan coordinar toda esta información.

Ya se dispone de técnicas automatizadas que permiten el tratamiento de los resultados en bases de datos internacionales con un coste económico razonable. Con toda probabilidad, en pocos años nuestra aproximación a la tuberculosis va a estar influida por esta nueva información. La aplicación de la epidemiología molecular asociada a los métodos de epidemiología clásica es un objetivo razonable para los próximos años en los países desarrollados y requerirá la coordinación de neumólogos, epidemiólogos y microbiólogos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Van Soolingen D, Hermans PW, De Haas PE, Soll DR, Van Embden JD. 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.
2. Cave MD, Eisenach KD, McDermott PF, Bates JH, Crawford JT. IS6110 conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. *Mol Cell Prob.* 1991;5:73-80.
3. Glynn JR, Bauer J, De Boer AS, Borgdorff MW, Fine PE, Godfrey-Faussett P, et al. Interpreting DNA fingerprint clusters of *Mycobacterium tuberculosis*. European Concerted Action on Molecular Epidemiology and Control of Tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1999;3:1055-60.
4. Kanduma E, McHugh TD, Gillespie SH. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. *J Appl Microbiol.* 2003;94:781-91.
5. Nguyen LN, Gilbert GL, Marks GB. Molecular epidemiology of tuberculosis and recent developments in understanding the epidemiology of tuberculosis. *Respirology.* 2004;9:313-9.
6. Barnes PF, Cave MD. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med.* 2003;349:1149-56.
7. 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 standardized methodology. *J Clin Microbiol.* 1993;31:406-9.

8. Soini H, Pan X, Teeter L, Musser JM, Graviss EA. Transmission dynamics and molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110. *J Clin Microbiol.* 2001;39:217-21.
9. Ruiz M, Rodríguez JC, Samper S, Royo G. Caracterización genómica de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* con menos de 5 copias de IS6110: utilidad de *amplified-fragment length polymorphism* (AFLP), *variable number tandem repeat* (VTNR) y *spoligotyping*. *Med Clin (Barc).* 2005;124:75-6.
10. Van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med.* 2001;249:1-26.
11. Filliol I, Driscoll JR, Van Soolingen D, Kreiswirth BN, Kremer K, Valetudie G, et al. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerg Infect Dis.* 2002;8:1347-9.
12. Dale JW, Brittain D, Cataldi AA, Cousins D, Crawford JT, Driscoll JJ, et al. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature. *Int J Lung Dis.* 2001;5:216-9.
13. Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, et al. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:1901-6.
14. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, Van Soolingen D, Locht 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.
15. Ruiz M, Rodríguez JC, Rodríguez-Valera F, Royo G. Amplified-fragment length polymorphism as a complement to IS16110 restriction fragment length polymorphism analysis for molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4820-2.
16. Fernández Cuenca F. Aplicación de técnicas de PCR en la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22:355-60.
17. Yeh RW, Ponce de León A, Agasino CB, Hahn JA, Daley CL, Hopewell CP, et al. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA genotypes. *J Infect Dis.* 1998;177:1107-11.
18. De Boer AS, Borgdorff MW, De Haas PE, Nagelkerke NJ, Van Embden JD, Van Soolingen D. Analysis of rate of change of IS6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patient isolates. *J Infect Dis.* 1999;180:1238-44.
19. Warren RM, Van der Spuy GD, Richardson M, Beyers N, Borgdorff MW, Behr MA, et al. Calculation of the stability of the IS6110 banding pattern in patients with persistent *Mycobacterium tuberculosis* disease. *J Clin Microbiol.* 2002;40:1705-8.
20. Lillebaek T, Dirksen A, Vynnycky E, Baess I, Thomsen VO, Andersen AB. Stability of DNA patterns as evidence of *Mycobacterium tuberculosis* reactivation occurring decades after the initial infection. *J Infect Dis.* 2003;188:1032-9.
21. Siedler A, Nienhaus A, Diel R. The transmission of tuberculosis in the light of new molecular biological approaches. *Occup Environ Med.* 2004;61:96-102.
22. Alland D, Kalkut GE, Moss AR, McAdam RA, Hahn JA, Bosworth W, 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.
23. 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 in the 1990s. *N Engl J Med.* 1994;330:1703-9.
24. Borgdorff MW, Nagelkerke N, Van Soolingen D, De Haas PE, Veen J, Van Embden JD. Analysis of tuberculosis transmission between nationalities in the Netherlands in the period 1993-1995 using DNA fingerprinting. *Am J Epidemiol.* 1998;147:187-95.
25. Pfyffer GE, Strassle A, Rose N, Wirth R, Brandli O, Shang H, et al. Transmission of tuberculosis in the metropolitan area of Zurich: a 3 year survey based on DNA fingerprinting. *Eur Respir J.* 1998;11:804-8.
26. Murray M, Nardell E. Molecular epidemiology of tuberculosis. Achievements and challenges to current knowledge. *Bull World Health Organ.* 2002;80:477-82.
27. Pineda-García L, Ferrera A, Hoffner SE. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains from patients with tuberculosis in Honduras. *J Clin Microbiol.* 1997;35:2393-7.
28. Doroudchi M, Kremer K, Basiri EA, Kadivar MR, Van Soolingen D, Ghaderi AA, et al. IS6110-RFLP and spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Iran. *Scan J Infect Dis.* 2000;32:663-8.
29. 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.
30. Safi H, Aznar J, Palomares JC. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated during a 3-year period (1993-1995) in Seville, Spain. *J Clin Microbiol.* 1997;35:2472-6.
31. Samper S, Iglesias MJ, Rabanaque MJ, Lezcano MA, Vitoria LA, Rubio MC, et al. The molecular epidemiology of tuberculosis in Zaragoza, Spain: a retrospective epidemiological study in 1993. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998;2:281-7.
32. Íñigo Martínez J, Chaves Sánchez F, Arce Arnáez A, Alonso Sanz M, Palenque Mataix E, Jaén Herrerros F, et al. Transmisión reciente de tuberculosis en Madrid: utilidad de las técnicas moleculares. *Med Clin (Barc).* 2000;115:241-5.
33. Solsona J, Cayla JA, Verdú E, Estrada MP, García S, Roca D, et al. Molecular and conventional epidemiology of tuberculosis in an inner city district. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2001;5:724-31.
34. Fernández de la Hoz K, Íñigo J, Fernández Martín JI, Arce A, Alonso Sanz M, Gómez Pintado P, et al. The influence of HIV infection and imprisonment on dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* in a large Spanish city. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2001;5:696-702.
35. Elizaga J, Carrero P, Íñigo J, Chaves F. Transmisión reciente de la tuberculosis en un área con baja incidencia: estudio epidemiológico y molecular. *Med Clin (Barc).* 2002;118:645-9.
36. Ruiz M, Rodríguez JC, Navarro JF, Samper S, Martín C, Royo G. Molecular epidemiology of tuberculosis in Elche, Spain: a 7-year study. *J Med Microbiol.* 2002;51:273-7.
37. Pena MJ, Caminero JA, Campos Herrero MI, Rodríguez Gallego JC, García Laorden ML, Cabrera P, et al. Epidemiology of tuberculosis on Gran Canaria: a 4-year population study using traditional and molecular approaches. *Thorax.* 2003;58:618-22.
38. Íñigo Martínez J, Arce Arnáez A, Chaves Sánchez F, Palenque Mataix E, Burgoa Arenales M. Patrones de transmisión de la tuberculosis en un área sanitaria de Madrid. *Rev Esp Salud Pública.* 2003;77:541-51.
39. Perfecto B, Sánchez JR, González AI, López I, Dorronsoro I. Brote de tuberculosis multiresistente. *An Sist Sanit Navar.* 2000;23:257-63.
40. Jasmer RM, Hahn JA, Small PM, Daley CL, Behr MA, Moss AR, et al. A molecular epidemiologic analysis of tuberculosis trends in San Francisco. *Ann Intern Med.* 1999;130:971-8.
41. Van Wolleswinkel BJ, Nagelkerke NJ, Broekmans JF, Borgdorff MW. The impact of immigration on the elimination of tuberculosis in The Netherlands: a model based approach. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2002;6:130-6.
42. Murray M. Determinants of cluster distribution in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:1538-43.
43. Braden CR, Templeton GL, Cave MD, Valway S, Onorato IM, Castro KG, et al. Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a state with a large rural population. *J Infect Dis.* 1997;175:1446-52.
44. Murray M, Alland DA. Methodological problems in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Am J Epidemiol.* 2002;155:565-71.
45. Heldal E, Dahle UR, Sandven P, Caugant DA, Brattaas N, Waaler HT, et al. Risk factors for recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Respir J.* 2003;22:637-42.
46. Giordano TP, Soini H, Teeter LD, Adams GJ, Musser JM, Graviss EA. Relating the size of molecularly defined clusters of tuberculosis to the duration of symptoms. *Clin Infect Dis.* 2004;38:10-6.
47. Hernández-Garduno E, Cook V, Kunimoto D, Elwood RK, Black WA, FitzGerald JM. Transmission of tuberculosis from smear negative patients: a molecular epidemiology study. *Thorax.* 2004;59:286-90.
48. Ruiz M, Navarro JF, Rodríguez JC, Larrosa JA, Royo G. Effect of clinical and socio-economic factors on the rate of clustering of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Elche (Spain). *Epidemiol Infect.* 2003;131:1077-83.

49. Calpe JL, Chiner E, Martínez Pardo J, Calpe A, Armero V. Impact of the human immunodeficiency virus on the epidemiology of tuberculosis in area 15 of the Valencian community in Spain. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004;8:1204-12.
50. Camarena JJ, Artero A, Nogueira JM, Navarro JC, Olmos A, Blanquer R. Tuberculosis en pacientes con sida: aportación del análisis de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica de aislados de *Mycobacterium tuberculosis*. *Med Clin (Barc).* 1998;111:721-4.
51. Van Soolingen D, Borgdorff MW, De Haas PE, Sebek MM, Veen J, Dessens M, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in The Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. *J Infect Dis.* 1999;18:726-36.
52. McLaughlin SI, Spradling P, Drociuk D, Ridzon R, Pozsik CJ, Onorato I. Extensive transmission of *Mycobacterium tuberculosis* among congregated, HIV-infected prison inmates in South Carolina, United States. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003;7:665-72.
53. Burgos MV, Pym AS. Molecular epidemiology of tuberculosis. *Eur Respir J.* 2002;20 Suppl 36:54-65.
54. Nardell E, McInnis B, Thomas B, Weidhaas S. Exogenous reinfection with tuberculosis in a shelter for the homeless. *N Engl J Med.* 1986;315:1570-4.
55. Small PM, Shafer RW, Hopewell PC, Singh SP, Murphy MJ, Desmond E, et al. Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. *N Engl J Med.* 1993;328:1137-44.
56. Shafer RW, Singh SP, Larkin C, Small PM. Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in an immunocompetent patient. *Tuberc Lung Dis.* 1995;76:575-7.
57. Van Rie A, Warren R, Richardson M, Victor TC, Gie RP, Enarson DA, et al. Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Med.* 1999;341:1174-9.
58. Bandera A, Gori A, Catozzi L, Degli Esposti A, Marchetti G, Molteni C, et al. Molecular epidemiology study of exogenous reinfection in an area with a low incidence of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2000;39:2213-8.
59. Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, Rodríguez JC, Afonso O, Martín 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.
60. García de Viedma D, Marín M, Hernangómez S, Díaz M, Ruiz Serrano MJ, Alcalá E. Tuberculosis recurrences: reinfection plays a role in a population whose clinical/epidemiological characteristics do not favor reinfection. *Arch Intern Med.* 2002;162:1873-9.
61. Jasmer RM, Bozeman L, Schwartzman K, Cave MD, Saukkonen JJ, Metchock B, et al. Recurrent tuberculosis in the United States and Canada: relapse or reinfection? *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170:1360-6.
62. Weis SE, Pogoda JM, Yang Z, Cave MD, Wallace C, Kelley M, et al. Transmission dynamics of tuberculosis in Tarrant County, Texas. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:36-42.
63. McNabb SJ, Kammerer JS, Hickey AC, Braden CR, Shang N, Rosenblum LS, et al. Added epidemiologic value to tuberculosis prevention control of the investigation of clustered genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Am J Epidemiol.* 2004;160:589-97.
64. Van Deutekom H, Hoijng SP, De Haas PE, Langendam MW, Horsman A, Van Soolingen D, et al. Clustered tuberculosis cases: do they represent recent transmission and can they be detected earlier? *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169:806-10.
65. Íñigo J, Arce A, Martín-Moreno JM, Herruzo R, Palanque E, Chaves F. Recent transmission of tuberculosis in Madrid: application of capture-recapture analysis to conventional and molecular epidemiology. *Int J Epidemiol.* 2003;32:763-9.
66. Geng E, Kreiswirth B, Driver C, Li J, Burzybski J, DellaLatta P, et al. Changes in the transmission of tuberculosis in New York City from 1990 to 1999. *N Engl J Med.* 2002;346:1453-8.
67. McNabb SJ, Braden CR, Navin TR. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: lessons learned and implications in the future. *Emerg Infect Dis.* 2002;8:1314-9.
68. Bauer J, Kok-Jensen A, Faurischou P, Thuesen J, Taurdorf E, Andersen AB. A prospective evaluation of the clinical value of nation-wide DNA fingerprinting of tuberculosis isolates in Denmark. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000;4:295-9.
69. Crawford JT, Braden CR, Schable BA, Onorato IM. National Tuberculosis Genotyping and Surveillance Network: design and methods. *Emerg Infect Dis.* 2002;8:1192-6.
70. Lambregts van Weezenbeek CS, Sebek MM, Van Gerben PJ, De Vries G, Verver S, Kalisvaart NA, et al. Tuberculosis contact investigation and DNA fingerprinting surveillance in The Netherlands: 6 years' experience with nation-wide cluster feedback and cluster monitoring. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003;12 Suppl 3:463-70.
71. Seidler A, Nienhaus A, Diel R. The transmission of tuberculosis in the light of new molecular biological approaches. *Occup Environ Med.* 2004;61:96-201.
72. Sepkowitz KA, Friedman CR, Hafner A, Kwork D, Manoach S, Floris M, et al. Tuberculosis among urban health care workers: a study using restriction fragment length polymorphism typing. *Clin Infect Dis.* 1995;21:1098-101.
73. Van Deutekom H, Gerritsen JJ, Van Soolingen D, Van Ameijden EJ, Van Embden JD, Coutinho RA. A molecular epidemiological approach to studying the transmission of tuberculosis in Amsterdam. *Clin Infect Dis.* 1997;25:1071-7.
74. Tudó G, González J, Gatell JM, Caylà JA, Martínez E, García A, et al. Detection of unsuspected cases of nosocomial transmission of tuberculosis by use of a molecular typing method. *Clin Infect Dis.* 2001;33:453-9.
75. Casas X, Ruiz-Manzano J, Casas I, Andreo F, Sanz J, Rodríguez N, et al. Tuberculosis en personal sanitario de un hospital general. *Med Clin (Barc).* 2004;122:741-3.
76. Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, Kreiswirth BN. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol.* 2002;10:45-52.
77. Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, Rodríguez JC, García I, Cabrera P, et al. Epidemiological evidence of spread of a *Mycobacterium tuberculosis* strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:1165-70.
78. 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.
79. Zhang M, Gong J, Yang Z, Samten B, Cave MD, Barnes PF. Enhanced capacity of a widespread strain of *Mycobacterium tuberculosis* to grow in human macrophages. *J Infect Dis.* 1999;179:1213-7.
80. Manca C, Tsenova L, Barry CE, Bergtold A, Freeman S, Haslett PA, et al. *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response *in vivo* and *in vitro*, but is not more virulent than other clinical isolates. *J Immunol.* 1999;162:6740-6.
81. García-García ML, Ponce de León A, Jiménez-Corona ME, Jiménez-Corona A, Palacios-Martínez M, Balandrano-Campos S, et al. Clinical consequences and transmissibility of tuberculosis in southern Mexico. *Arch Intern Med.* 2000;160:630-6.
82. 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.
83. Kruuner A, Hoffner SE, Sillastu H, Danilovits M, Levina K, Svenson SB, et al. Spread of drug-resistant pulmonary tuberculosis in Estonia. *J Clin Microbiol.* 2001;39:3339-45.
84. Bifani PJ, Mathema B, Liu Z, Moghazeh SL, 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.
85. Ruddy M, McHugh TD, Dale JW, Banerjee D, Maguire H, Wilson P, et al. Estimation of the rate of unrecognized cross-contamination with *Mycobacterium tuberculosis* in London microbiology laboratories. *J Clin Microbiol.* 2002;40:4100-4.
86. Burman WJ, Reeves RR. Review of false-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis* and recommendations for avoid unnecessary treatment. *Clin Infect Dis.* 2000;31:1390-5.
87. O'Brien JK, Sandman LA, Kreiswirth BN, Rom WN, Schluger NW. DNA fingerprintings from *Mycobacterium tuberculosis* isolates of patients confined for therapy noncompliance show frequent clustering. *Chest.* 1997;112:387-92.
88. Majeed AA, Ahmed N, Rao KR, Ghousunnissa S, Kausar F, Bose B, et al. AmpliBase MT(TM): a *Mycobacterium tuberculosis* diversity knowledgebase. *Bioinformatics.* 2004;20:989-92.