

## Epidemiología molecular por la técnica RFLP en tuberculosis: una nueva herramienta para el control de una antigua infección

Jorge Enrique Gómez<sup>1</sup>, Françoise Portaels<sup>2</sup>

### Situación actual de la tuberculosis

La tuberculosis es una de las principales causas de morbilidad en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que un tercio de la población mundial está infectada por *Mycobacterium tuberculosis*, su agente causal. Durante la última década, en todo el mundo, entre 2'500.000 y 3'200.0000 de casos se informaron cada año. En 1990, se calculó que un total de 7'500.000 de personas adquirieron la infección y se ha pronosticado que, de continuar el número de casos informados en este mismo nivel, hacia el año 2000, un total de 30'000.000 de personas morirán a causa de esta infección (1, 2). Para la Latinoamérica, el último informe de la OMS (1994) estima para el período 1990-99 un total acumulado de 6'000.000 de nuevos casos y un total de 1'200.000 de muertes que se le podrán atribuir (3).

Con la aparición de la epidemia del SIDA, se han impuesto nuevos desafíos para los países en vías de desarrollo en su lucha contra la tuberculosis. Se estima que 90% de las personas HIV seropositivas habitarán en países tropicales en el año 2000 (4). Esto ha cambiado el panorama epidemiológico de la tuberculosis con un aumento en el número de personas susceptibles, como son los inmunosuprimidos y un aumento en el número de casos por reactivación, lo cual ocasiona un mayor número

de personas que sirven como reservorios del bacilo y difusores de la infección (5).

En los Estados Unidos, las cepas multirresistentes se han vuelto frecuentes en varios sitios geográficos (6). De 1990 a 1992, el CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) ha informado siete brotes epidémicos de tuberculosis multirresistente con un total de 200 enfermos (80% HIV seropositivos), una progresión rápida entre el diagnóstico y la muerte (4 a 16 semanas) y una mortalidad extraordinariamente elevada, de 72 a 89% (7-9, 11-14). En Nueva York, donde la situación fue la más crítica, 46% de las cepas aisladas de los pacientes hospitalizados eran resistentes a uno o más medicamentos (15).

Los problemas que se presentan en lo que concierne al resurgimiento de la tuberculosis ligada al SIDA son muy complejos. La presentación clínica y radiológica de los casos de la tuberculosis en los pacientes HIV positivos es, en muchas ocasiones, diferente a la de la tuberculosis pulmonar cavitaria crónica clásica (16). El diagnóstico de la tuberculosis en las personas HIV positivas puede ser enmascarado por la presencia de una o varias otras infecciones pulmonares (17). Existe, además, una controversia acerca de una mayor infectividad de los tuberculosos HIV positivos en comparación con los tuberculosos no-HIV positivos. Los tuberculosos HIV positivos tienen una presentación

<sup>1</sup> INSERM U-314. 45, Rue Cognacq Jay 51092, Reims, France. Beneficiario del programa de formación de investigadores de COLCIENCIAS.

<sup>2</sup> Laboratorio de Micobacterias, Instituto de Medicina Tropical Príncipe Leopoldo, 155 Nationalestraat B-2000, Antwerpen, Bélgica.



clínica más frecuentemente extrapulmonar, presentan menos enfermedad pulmonar cavitaria y, por tanto, los exámenes de esputo son más frecuentemente BK negativos. Sin embargo, otros factores pueden contribuir al mayor riesgo de transmisión en los HIV positivos; y, estos factores pueden ser falsamente interpretados como una transmisibilidad aumentada, ya que los factores comunes a los recientes brotes epidémicos nosocomiales son una tuberculosis no reconocida precozmente (retardo diagnóstico) y no tratada (o, en los casos de tuberculosis multirresistente, no tratada eficazmente) (18).

### Situación en Colombia

En Colombia, a pesar de la puesta en marcha de un programa nacional de lucha contra la tuberculosis desde hace varias décadas, la tuberculosis es aún una causa importante de morbilidad y mortalidad. Según el Ministerio de Salud, en 1993, un total de 9.761 casos fueron notificados y se calculó que se perdieron 28.095 años de vida saludable a causa de la tuberculosis entre 1989 y 1991 (19). El programa de la OMS para la vigilancia de la farmacoresistencia en la tuberculosis ha estimado en más de 23.000 el número de casos por año (Documento WHOTB 1984;84:143).

Una encuesta epi-demiológica en Medellín, en 1988, encontró una prevalencia de 2,6/1.000 habitantes lo cual mostró la falta de eficacia de los programas de lucha para disminuir la incidencia de la infección (20). Esta es una situación común a los países en los cuales la situación social subyacente a la persistencia endémica del bacilo no se ha mejorado y donde los programas de lucha enfrentan numerosas dificultades. Su principal logro ha sido, sobre todo, una disminución de la tasa de mortalidad y de los casos de tuberculosis meníngea.

En los últimos años, la epidemia del SIDA ha tenido un impacto sobre la epidemiología de la tuberculosis en el país. En el Hospital Santa Clara, en Bogotá, se informó que en 30% de los pacientes reconocidos como infectados por HIV, se diagnosticó simultáneamente una tuberculosis (21). En un estudio, en Cali, 6% de los

pacientes HIV positivos tenían tuberculosis sintomática, la mayoría con la forma extrapulmonar y miliar. En 34% de los pacientes, se logró aislar micobacterias por búsqueda activa en muestras de esputo, LCR, médula ósea y jugo gástrico, 73% de los cuales fueron *M. tuberculosis* (22). Otro estudio mostró un aumento en el número de casos de tuberculosis extrapulmonar paralelo a la aparición de la epidemia de SIDA en Colombia; el análisis de regresión lineal demostró una asociación estadísticamente significativa en el número de casos notificados de ambas patologías durante los últimos años (23).

### Polimorfismo del ADN: una nueva estrategia para la tipificación de *M. tuberculosis*

Las especies del complejo tuberculosis de las micobacterias (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum* y *M. microti*) son un grupo taxonómico difícil de diferenciar con los marcadores bioquímicos clásicos y las características de crecimiento en los cultivos. Esta proximidad taxonómica se refleja en los resultados de hibridación sobre el ADN total que muestran una homología cercana a 100% entre las especies (24). Sin embargo, el hallazgo de secuencias repetidas dentro del genoma ha demostrado la posibilidad de su utilización para la diferenciación entre especies de micobacterias y entre aislamientos individuales de una misma especie debido a que muestran un mayor polimorfismo. Dos tipos de elementos repetidos se encuentran dentro del ADN de las micobacterias (25): 1) las secuencias de inserción (IS) y 2) las secuencias repetidas mayores en tandem (MPTR).

De las MPTR, una no está limitada al complejo tuberculosis y la otra, identificada en *M. bovis* BCG, no da una buena diferenciación entre cepas. Por ello, los métodos de análisis utilizando las IS se han convertido en las más populares. Los elementos de inserción IS1081 e IS6110 son los que han revelado un mayor polimorfismo. La función exacta de los IS es desconocida, pero, llevan secuencias que codifican proteínas esenciales para rearrreglos genéticos. Su distribución en número y posición diferente produce patrones polimórficos

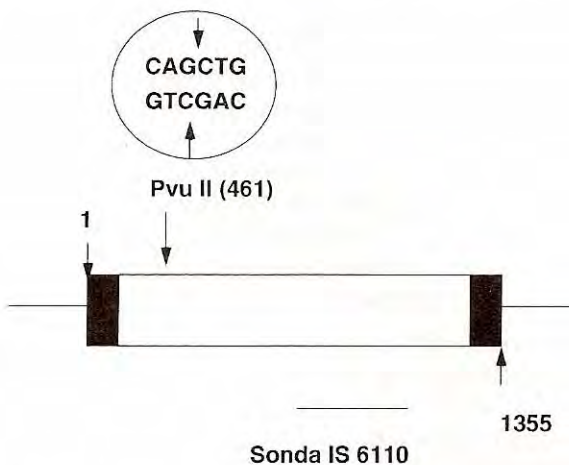


bien particulares de una cepa a otra. Esto es debido a que son transponibles, es decir, que pueden cambiar de ubicación dentro del genoma de una generación a la otra. El IS1081 está distribuido de una manera homogénea, sólo están presentes 5 a 7 copias. El IS6110 tiene una distribución más heterogénea: de 1 a 20 copias y tienen una longitud de 1.355 pares de bases (figura 1). Algunas cepas en India y Vietnam no tienen copias del IS6110 (26); sin embargo, en la gran mayoría de cepas aisladas en el resto del mundo existen más de cinco copias, lo cual permite su utilización para estudios epidemiológicos.

A manera de información es necesario mencionar que, recientemente, otros elementos genéticos han sido descubiertos y que éstos poseen una utilidad potencial para la diferenciación de cepas; entre ellos se encuentran las secuencias directas (DR) y las secuencias polimórficas ricas en enlaces guanina-citosina (PGCRS) (26).

#### Por qué es importante diferenciar entre cepas de *M. tuberculosis*

Distinguir entre aislamientos de diferentes cepas del bacilo no tiene solamente un interés



**Figura 1.** Mapa físico del IS6110 DE 3.155 pares de bases (pb). El sitio de corte de la enzima de restricción PvuII se encuentra a nivel del pb 461 (la secuencia palindrómica reconocida por la enzima se muestra encerrada en el círculo). Las barras negras indican las secuencias repetidas invexas de 28 pb que limitan al IS6110. La sonda híbrida con un segmento de 245 pb a la derecha del sitio de corte de PvuII.

teórico. Dentro del marco de la situación actual de la epidemia de la tuberculosis, algunas cuestiones que necesitan una respuesta inmediata podrían ser resueltas a través de un método de diferenciación entre muestras provenientes de diferentes grupos de pacientes. La definición de la duración de la quimioprofilaxis en los pacientes HIV positivos es una de ellas: ¿debe durar toda la vida o ser periódica? Si las reactivaciones son responsables de la mayoría de las tuberculosis, una quimioprofilaxis periódica no tendrá utilidad; al contrario, si el riesgo de infección es grande los regímenes intensos y periódicos se deben escoger.

Los brotes nosocomiales de tuberculosis han confirmado la importancia de la diferenciación de la cepa. Gracias a esta estrategia fue posible localizar las fuentes de infección y determinar los diferentes factores de riesgo asociados. Las medidas actualmente tomadas en Estados Unidos se han basado en los resultados de estos estudios. Las aplicaciones no se limitan a los brotes de tipo nosocomial sino también a estudios epidemiológicos en la comunidad. Algunos trabajos recientes han demostrado la diseminación de cepas multirresistentes utilizando las técnicas de biología molecular para la diferenciación de cepas y han demostrado patrones de transmisión que no eran evidentes por todos los métodos tradicionales de búsqueda. Estas técnicas aportan nuevos elementos a los conocimientos actuales de diseminación de la infección y han sido un llamado de atención para decidir la detección forzada de pacientes que pueden representar un peligro para la salud pública (27).

En resumen, las posibilidades prácticas de la diferenciación entre cepas de la infección tuberculosa son: la determinación de las tasas de reinfección (fuentes exógenas) o reactivación (fuente endógena) como causa de fracasos terapéuticos; el seguimiento de fuentes de diseminación de cepas multirresistentes en la comunidad; el control de calidad para los laboratorios centrales o regionales especializados en micobacterias y el estudio de brotes de infección nosocomial (26).



### Técnicas para demostrar el polimorfismo

Una técnica ideal para detectar las relaciones clonales entre cepas (comparación de perfiles genéticos o *DNA fingerprinting*) debería ser rápida, logísticamente simple y generar un patrón polimórfico estable en el tiempo. El grado de diversidad clonal revelado por esta técnica debe ser lo suficientemente estable como para que en las cepas aisladas a partir de pacientes de un mismo brote epidémico sean idénticos. Como se había mencionado anteriormente, las primeras técnicas de *DNA fingerprinting* que se aplicaron a las micobacterias intentaron descubrir polimorfismo sobre ADN total utilizando la tinción de bromuro de etidio de fragmentos de restricción separados por electroforesis.

Sin embargo, la gran mayoría de estos fragmentos de restricción se cruzan en su movilidad en el gel y, por tanto, se hacen necesarias cuatro diferentes enzimas de restricción para obtener una diferenciación razonable. El gran número de fragmentos generados hace la comparación de resultados extremadamente difícil. Además, la utilización de enzimas de restricción con secuencias de reconocimiento largas y ricas en enlaces AT, genera muy pocos fragmentos y separar estos fragmentos de gran tamaño hace necesario la utilización de la técnica-demasiado compleja de electroforesis de pulsos de campos (26).

Con el descubrimiento de las secuencias repetidas, el tamaño de los fragmentos a cortar con las enzimas de restricción, disminuyó de manera razonable para realizar su comparación. La mayoría de los investigadores utilizan actualmente la técnica de *Southern blot* y los resultados que así se obtienen se denominan polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP). Hay tres parámetros críticos que se deben tener en cuenta en esta estrategia: 1) la elección de una enzima de restricción; 2) la selección de la secuencia específica del elemento genético utilizado para detectarlo a través de una sonda (secuencia complementaria de ácidos nucleicos); y, 3) el uso de patrones de peso molecular estándar que permita la comparación entre diferentes geles. Un protocolo estandarizado en relación al IS6110 se acordó en 1991 (cuadro 1), lo cual permite la

**Cuadro 1.** Componentes de la técnica estandarizada en RFLP para el IS6110 (28)

- 
1. Aislamiento del ADN, a partir de cultivo
  2. Digestión del ADN, enzima Pvu II
  3. Separación del ADN escindido por electroforesis\*
  4. *Southern-blotting*, transferencia a membrana
  5. Hibridización más detección por autorradiografía\*\*
- 

\* En presencia de dos a tres marcadores de tamaño molecular y la inclusión del ADN de la cepa de referente Mt 14233 de *M. tuberculosis* (que presenta 10 bandas IS6110 de peso molecular conocido), como marcadores externos y de marcadores internos en cada línea, no específicos para la sonda del IS6110, y los cuales se revelarán en una segunda autorradiografía.

\*\* La detección se realiza por autorradiografía y con una sonda que detecta segmentos a la derecha del sitio de corte PvuII.

comparación de resultados de diferentes laboratorios a nivel mundial (28). Una base central de datos y un sistema computarizado de análisis para los *fingerprints* del IS6110 está disponible actualmente para toda la comunidad científica internacional en el Instituto de Salud Pública de Bilthoven, Holanda.

Debido a que la preparación del *Southern blot* es laboriosa y requiere el aislamiento de cantidades del ADN en microorganismos, están actualmente se están desarrollando nuevos métodos utilizando la técnica de amplificación *in vitro* del ADN (reacción en cadena de la polimerasa o PCR). Esto permitirá, en un solo paso, tanto la detección del bacilo como la diferenciación de la cepa. Se han podido obtener patrones polimórficos utilizando el PCR a partir de cantidades tan pequeñas de ADN como 10 picogramos, y con oligonucleótidos cebadores (*primers*) homólogos a la secuencia final del IS6110. El PCR con oligonucleótidos cebadores aleatorios (RAPD), también, ha mostrado perfiles polimórficos que han confirmado la relación entre varios casos de tuberculosis en un brote epidémico. Otros métodos también basados en PCR y que se están analizando actualmente son el *IS-amplotyping*, que utiliza cebadores homólogos a MPTR y una secuencia de amplificación adicional (*nested*) con IS6110; otra técnica es el



*mixed linked PCR*, que consiste en un primer cebador específico al IS6110 y un segundo cebador complementario a un ligador, lo cual aumenta la sensibilidad del método. Por último, existe otro PCR que utiliza los polimorfismos de la región DR. A pesar del potencial de estas técnicas rápidas para la tipificación de cepas, la técnica estandarizada de *Southern blot* tiene un interés mayor debido a que permite la comparación de resultados a nivel mundial. La ventaja que esto representa es que podrá obtenerse una mejor comprensión de algunos aspectos epidemiológicos claves tales como: el impacto del HIV, de la migración global y de la resistencia a drogas antituberculosas, lo cual permitirá proponer métodos eficaces que logren controlar la diseminación de la infección (26).

#### **Aplicaciones del RFLP en Colombia**

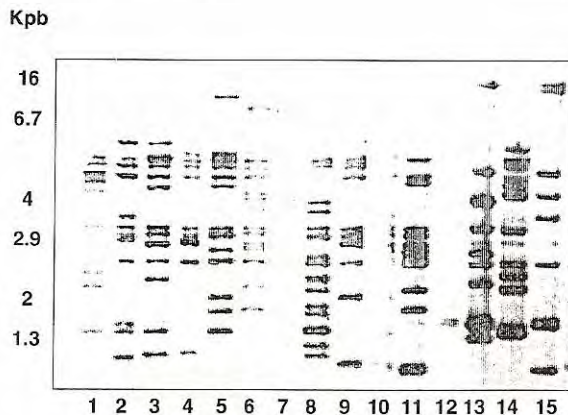
Pocos estudios se han realizado hasta el presente sobre la distribución geográfica de los diferentes patrones polimórficos existentes en *M. tuberculosis*. Esto podría dar una idea de la diseminación global de la infección y caracterizar los diferentes patrones los cuales, luego, podrían asociarse a ciertas características como virulencia y resistencia a medicamentos. A pesar de que la relación no es causal con el IS6110, tales asociaciones se pueden hacer debido al resultado de la diseminación clonal de la bacteria con características que favorecen la transmisibilidad. Los datos preliminares de Africa y Holanda han demostrado que es posible hacer la diferenciación geográfica de diferentes aislados (29-31).

En Latinoamérica se han iniciado algunos estudios por la técnica de RFLP en Venezuela, Argentina y Perú (Palomino JC, comunicación personal, 1996). En Colombia, en un estudio inicial realizado en colaboración con el Instituto Seccional de Salud del Quindío (32), se inició la recolección de muestras de esputo provenientes de pacientes con tuberculosis pulmonar con y sin historia de tratamiento anterior. Las muestras se transportaron en cloruro de cetilpiriridio y se colocaron en cultivo en el Instituto de Medicina Tropical en Antwerpen, Bélgica. En total, se obtuvieron 27 aislados para

análisis RFLP. Se utilizó la técnica estandarizada del Instituto de Salud Pública de Bilthoven, Holanda. Los resultados nos muestran un alto grado de relación entre las cepas estudiadas lo cual confirma una circulación intensa del bacilo en el medio. A través del cálculo de los coeficientes de similaridad (una ecuación en la cual se tiene en cuenta el número de bandas compartidas en la misma posición) se elaboró un dendograma y se pudieron identificar cinco grupos o *clusters*. Un hallazgo interesante fue el de patrones idénticos en dos cepas resistentes a la estreptomycin-isoniacida. Este fue un hallazgo ocasional pero bastante llamativo ya que las muestras provenían de pacientes en la comunidad y sin condiciones favorecedoras de hospitales o lugares de reclusión o habitación en común; se trata, por tanto, de la primera descripción de circulación de cepas resistentes en la comunidad en Latinoamérica. Esto revela la importancia práctica de la técnica ya que si se confirma que la diseminación de cepas multirresistentes es un evento común, se debe realizar un cambio fundamental en las estrategias de control actualmente en vigor. Los pacientes no estaban relacionados epidemiológicamente, es decir, que por los medios habituales de búsqueda de contactos no hubiera sido posible hallar una relación. Esto demuestra el valor de la técnica en revelar fuentes de transmisión no reconocidas anteriormente. Otros estudios que utilizan la estrategia de tipaje molecular han identificado rutas de transmisión en la comunidad con hallazgos similares (33-37). El estudio de Berna es el que ha tenido los hallazgos más dramáticos: un solo paciente contribuyó con 13% de los casos de la región; sólo a través del RFLP se pudo poner en evidencia la relación epidemiológica de estos casos (33).

Actualmente estamos adelantando la caracterización de los patrones polimórficos de cepas de diferentes regiones del país recolectadas durante el primer estudio nacional de resistencia inicial a medicamentos tuberculosos (figura 2). En el futuro, esperamos que la técnica sea implantada en un laboratorio central o nacional de referencia para su utilización en estudios





**Figura 2.** Ejemplo de perfiles RFLP obtenidos por la técnica estandarizada para el IS6110 en cepas de *M. tuberculosis* del primer estudio nacional de resistencia a las drogas antituberculosas. Tamaño indicado en miles de pares de bases (Kpb). Origen de las cepas: 1. Tolima; 2. Santander; 3 y 8, Bolívar; 4, 5 y 10, Norte de Santander; 6, La Guajira; 7 y 9, Atlántico; 11, Huila; 12, 13, 14 y 15, Antioquia. Cepas resistentes, 9 (estreptomicina-isoniacida) y 14 (estreptomicina).

epidemiológicos amplios y a largo plazo y que sean útiles al estudio de la diseminación de la tuberculosis en el país.

En conclusión, la técnica del *Southern blot* para el IS6110, que permite determinar el RFLP o la tipificación molecular de las cepas de *M. tuberculosis*, es una herramienta valiosa aplicable al estudio epidemiológico de la tuberculosis humana y que permite responder a cuestiones fundamentales que durante largo tiempo no habían logrado ser resueltas.

#### Agradecimientos

Jorge Enrique Gómez es beneficiario de un crédito BID-COLCIENCIAS para la formación de investigadores. A las doctoras Clara Inés León y Martha Inírida Guerrero del Laboratorio de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud quienes facilitaron muchos de los datos sobre la tuberculosis del país.

Este trabajo se realizó con el apoyo de la *Fundación Damien*, Bruselas, y fondos de la Comunidad Europea (Grant TS3-CT92-0154), *Science and Technology for Development Programme of the European Communities*.

#### Referencias

1. **Raviglione MC, Snider DE, Kochi A.** Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic, *JAMA* 1995;273:220-6.
2. **Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi A.** Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bull WHO* 1994;72:213-20.
3. **Sudre P, ten Damm G, Kochi A.** Tuberculosis: a global overview of the situation today. *Bull WHO* 1992; 70:149-59.
4. **Kochi A.** The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle* 1991;72:1-6.
5. **Barnes PF, Bloch WL.** The new tuberculosis. *N Eng J Med* 1991;324:1644-50.
6. **Snider DE, Roper WL.** The new tuberculosis. *N Eng J Med* 1992;326:703-5.
7. **CDC.** Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected persons. Florida and New York 1988-1991. *MMWR* 1991;40:585-91.
8. **Daley CL, Small PM, Schecter GF, et al.** An outbreak with accelerated progression among persons infected with de human immunodeficiency virus. An analysis using restriction fragment length polymorphisms. *N Engl J Med* 1992;326:231-5.
9. **CDC.** Transmission of multidrug resistant tuberculosis from an HIV positive in a residential substance abuse treatment facility-Michigan. *MMWR* 1991;40:129-31.
10. **CDC.** Nosocomial transmission of multidrug resistant tuberculosis to health care workers and HIV patients in a urban hospital-Florida. *MMWR* 1990;39:718-22.
11. **Fischi MA, Uttamchandani RB, Daikos GC, et al.** An outbreak of tuberculosis caused by multidrug resistant tubercle bacilli among patients with HIV-infection. *Ann Intern Med* 1992;117:177-83.
12. **Fischi MA, Daikos GL, Uttamchandani RB, et al.** Clinical presentation and outcome of patients with HIV infection and tuberculosis caused by multiple drug resistant bacilli. *Ann Intern Med* 1992;117:177-83.
13. **Pearson ML, Jereb JA, Frieden TR.** Nosocomial transmission of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Ann Intern Med* 1992;117:191-6.
14. **Edlin BR, Tokars JI, Grieco ML, et al.** An outbreak of multidrug resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Eng J Med* 1992;326:1514-21.
15. **Cuillton BJ.** Drug resistant TB may bring epidemic. *Nature* 1992;356:473.
16. **Raviglione MC, Narcuin JP, Kochi A.** HIV associated tuberculosis in developing countries: clinical fea-



- tures, diagnosis and treatment. Bull WHO 1992;70:515-26.
17. **Barnes PF, Steele MA, Young SMM, Vachon LA.** Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. How often does it mimic *Pneumocystis carinii* pneumonia? Am Rev Respir Dis 1992;102:428-32.
  18. **Castro KG, Wooley SW.** *Mycobacterium tuberculosis* transmission in healthcare settings: Is it influenced by coinfection with human immunodeficiency virus? Infect Control Hosp Epidemiol 1993;14:65-6.
  19. **Ministerio de Salud.** Dirección General de Prevención y Control. Plan Nacional de Control de la Tuberculosis como problema de salud pública en Colombia. Agosto, 1994.
  20. **Zuluaga L, Betancur C, Abaunza M, Londoño J.** Prevalencia de tuberculosis y enfermedad respiratoria en personas mayores de 15 años de la columna nororiental de Medellín, Colombia. Boletín OPS 1991;11:406-13.
  21. **Chaparro P, Torres CA.** Revisión retrospectiva de 10 años de pacientes HIV positivos en el Hospital Santa Clara. Comunicación personal, 1993.
  22. **Crespo MP, Alzate A, Corral RH, Tabres N, Sánchez N, Carrasquilla G.** Infecciones por micobacterias en individuos afectados por el VIH en Cali. Biomédica 1993;13(suppl1):82.
  23. **Guerrero MI, León CI, de la Hoz F.** The epidemiological evidence for an association between extrapulmonary tuberculosis and AIDS in Colombia. Tubercle 1994;75:160-1.
  24. **Collins DM, de Lisle GW.** DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. J Gen Microbiol 1984; 130:1019-21.
  25. **van Embden JDA, van Soolingen D, Small P, Hermans PWM.** Genetic markers for the epidemiology of tuberculosis (8th Forum in Microbiology). Res Microbiol 1992;143:385-91.
  26. **van Soolingn D, Herman PWM.** Epidemiology of tuberculosis by DNA fingerprinting. Eur Respir J 1995;8(suppl.20):649S-656S.
  27. **Hamburg MA, Frieden TR.** Tuberculosis transmission in the 1990s. N Eng J Med 1994;330:1750-1.
  28. **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;31:406-9.
  29. **Herman PWM, Messadi F, Guebrexabher 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.
  30. **Yang ZH, Mtoni I, Chonde M, et al.** DNA fingerprint for human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and HIV-seronegative patients in Tanzania. J Clin Microbiol 1995;33:1064-9.
  31. **Yang ZH, de Haas PEW, van Soolingen D, van Embden JD, Andersen AB.** Restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from Greenland during 1992: evidence of tuberculosis transmission between Greenland and Denmark. J Clin Microbiol 1994;32:3018-25.
  32. **Gómez JE, Rigouts L, Villegas LE, Portaels F.** Análisis por polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP) y su contribución al estudio epidemiológico de la tuberculosis. Bol Oficina Sanit Panam 1995;119:1-10.
  33. **Genewein A, Talenti A, Benascani C, et al.** Molecular approach to identifying route of transmission of tuberculosis in the community. Lancet 1993;342:841-4.
  34. **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; 169:189-92.
  35. **Alland D, Kalkut GE, Moss AR et al.** Transmission of tuberculosis in New York City: an analysis by DNA fingerprinting and conventional and molecular methods. N Eng J Med 1994;330:1710-6.
  36. **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 Eng J Med 1994;330:1703-9.
  37. **Chevrel-Dellagi D, Abderrahman A, Haltiti R, Korbaji H, Gicquel B, Dellagi K.** Large scale DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strain as a tool for epidemiological studies of tuberculosis. J Clin Microbiol 1993;31:2446-50.