



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
Mycobacterium tuberculosis CAUSANTE DE
ENFERMEDAD ACTIVA EN PUEBLOS INDÍGENAS
DE COLOMBIA**

Darío Hernando Puerto Gama

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Posgrado Interfacultades de Microbiología
Bogotá D.C, Colombia
2017

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Mycobacterium tuberculosis* CAUSANTE DE ENFERMEDAD ACTIVA EN PUEBLOS INDÍGENAS DE COLOMBIA

Darío Hernando Puerto Gama

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Microbiología

Directora:

(M.Sc) Gloria Mercedes Puerto Castro

Codirectora:

(Ph.D) Martha Isabel Murcia Aranguren

Línea de Investigación:

Epidemiología Molecular de las Micobacterias

Grupo de Investigación:

Micobacterias – Instituto Nacional de Salud

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Posgrado Interfacultades de Microbiología

Bogotá D.C, Colombia

2017

A Daniel Camargo, Papá Pablo, Mamá Eloísa, Mamá Olga, Mamá Socorro, a toda mi familia y a Andrea.

Nadie muere mientras permanezca vivo en nuestro corazón.

Desconocido

Agradecimientos

Primero que todo quiero agradecer a Dios por permitirme llevar a cabo este importante logro en mi vida, porque él me brindó las fuerzas para no decaer en ningún momento.

Gracias a Colciencias y al Instituto Nacional de Salud por la financiación del proyecto de investigación número 468-2013, mediante el cual se desarrolló el presente trabajo de tesis.

Gracias a los grupos Micobacterias Investigación y Red del INS. A Claudia Castro, Lina Erazo, Marcela Ramírez, Cristina Galindo, Maira Wintaco, a la Dra. Claudia Llerena y su grupo de trabajo, a todos ellos muchas gracias por su ayuda técnica y su calidez humana durante del desarrollo de la tesis, mi enorme gratitud.

Gracias a los Laboratorios de Salud Pública Departamental que enviaron muestras para el presente proyecto.

A la Dra. Gloria Puerto por brindarme la posibilidad de desarrollar la tesis en el grupo de investigación, por su gran apoyo en el cada momento de mi crecimiento profesional y sobre todo, por creer en mí, gracias.

Gracias a la Dra. Martha Murcia por brindarme su apoyo como codirectora, al orientarme con su gran conocimiento en pro de un trabajo de calidad.

Gracias a Socorrito, quien desde su escritorio se convirtió en una gran amiga, brindándonos palabras de aliento y regalándonos una enorme sonrisa.

Gracias a mi gran amigo Andrés Leal, por su gran apoyo no solo académico, sino también por cada palabra de aliento y cada gesto de ánimo para seguir adelante.

A mi novia Andrea Buitrago, gracias por tu paciencia, por no soltar mi mano en momentos difíciles y ser mi motivación más grande para seguir luchando.

Gracias a Papá Pablo, porque a pesar que se encuentra en el cielo, siempre me brindo las fuerzas que en algunas ocasiones no encontraba en mí. Gracias por haberme dado el honor de llamarlo Padre.

Gracias a Mamá Eloísa, Mamá Olga, Mamá Socorro y a toda mi familia, porque gracias a su enseñanza y que han sido mis grandes maestros en la vida, hoy soy la persona que soy. LO LOGRAMOS!!

Resumen

Título: Caracterización molecular de *Mycobacterium tuberculosis* causante de enfermedad activa en pueblos indígenas de Colombia. **Objetivo:** Caracterizar molecularmente los aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* causantes de tuberculosis activa, circulantes en indígenas de Colombia entre los años 2009 y 2014. **Metodología:** Estudio descriptivo, retrospectivo en el que se caracterizaron molecularmente por *Spoligotyping* y MIRU-VNTR 24 loci 234 aislamientos de *M. tuberculosis* provenientes de 229 pacientes indígenas. Los aislamientos hacían parte de la colección biológica del grupo de Micobacterias del INS, obtenidos a través de vigilancia rutinaria durante el periodo 2009-2014. Variables sociodemográficas de la población, así como los patrones de sensibilidad a fármacos de primera línea fueron tenidos en cuenta para determinar posibles asociaciones significativas con los sublinajes genéticos descritos. **Resultados:** Se identificaron 41 pueblos indígenas, el pueblo Wayúu tuvo mayor número de casos de TB (13,10%). Se presentaron 12 casos de MDR en el periodo de estudio. Mediante la metodología de *Spoligotyping*, se identificaron 102 genotipos (47,06% descritos en la base de datos SpolDB4 y 52,94% genotipos huérfanos), los cuales se organizaron en 30 agrupamientos (HGDI 0,9635). Por otro lado con la metodología MIRU VNTR, se identificaron 230 genotipos de los cuales 226 fueron patrones únicos y 4 estaban agrupados (HGDI 0,99985). Al combinar *Spoligotyping* y MIRU-VNTR de 24 loci se encontraron 231 genotipos los cuales comprenden 228 patrones únicos y 3 agrupamientos (HGDI 0,99988). **Conclusiones:** Este es el primer estudio nacional que caracteriza un gran número de aislamientos de población indígena colombiana y el primer aproximación a los genotipos circulantes de *M. tuberculosis*. La presencia de un caso de transmisión de tuberculosis fue confirmado a través de dos metodologías de genotipificación en la población indígena de estudiada. Un caso de infección mixta fue confirmado y cuatro más sospechosos

Palabras claves: Indígenas, *Mycobacterium tuberculosis*, MIRU-VNTR 24 loci, *Spoligotyping*

Abstract

Title: Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* that causes active disease in indigenous people of Colombia. **Objective:** To characterize molecularly clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* that cause active tuberculosis, circulating in indigenous people of Colombia between the years 2009 and 2014. **Methodology:** This is a descriptive, retrospective study in which 234 *M. tuberculosis* isolates from 229 patients were characterized molecularly by *Spoligotyping* and 24 loci MIRU-VNTR. These isolates were part of a biologic collection of the Mycobacteria research group at the National Health Institute of Colombia (INS), obtained through routine surveillance during the period of 2009-2014. Socio-demographic variables of the population as well as first-line drugs sensibility patterns were taken into account to determine significant possible associations with the described genetic families. **Results:** 41 groups of indigenous people were identified. The Wayúu people had the greatest number of cases of tuberculosis (TB) (13.10%). Besides, 12 cases of MDR were found in the period of this study. Using *Spoligotyping*, 102 genotypes were identified (47.06% described in the database SpolDB4 and 52.94% orphan genotypes), which were organized in 30 groups (HGDI 0.9635). On the other hand, with the MIRU-VNTR methodology 230 genotypes were identified out of which 226 were unique patterns and 4 were grouped (HGDI 0.99985). After combining *Spoligotyping* and 24 loci MIRU-VNTR, 231 genotypes were found and these comprise in 228 unique patterns and 3 groups (HGDI 0.99988). **Conclusions:** This study is the first national study to characterize a large number of isolates from the Colombian indigenous populations and is the first approach to genotype circulating *M. tuberculosis*. The presence of one tuberculosis transmission cases were confirmed through the two genotyping methodologies in indigenous people studied. One case of mixed infection was confirmed and four more suspected.

Keywords: Indigenous, *Mycobacterium tuberculosis*, 24 loci MIRU-VNTR, *Spoligotyping*

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XIV
Lista de tablas	XV
Lista de gráficas	XVI
Lista de abreviaturas.....	XVII
Introducción	1
1. Planteamiento del problema.....	3
2. Justificación	5
3. Objetivos.....	7
3.1 Objetivo general.....	7
3.2 Objetivo específico	7
4. Marco teórico.....	9
4.1 Historia natural de la TB	9
4.2 Epidemiología de la TB.....	10
4.3 Diagnóstico de TB	12
4.3.1 Baciloscopia (BK).....	12
4.3.2 Cultivo.....	13
4.3.3 Identificación fenotípica.....	14
4.3.4 Identificación molecular.....	14
4.4 Epidemiología molecular de TB	15
4.4.1 <i>Spoligotyping</i>	16
4.4.2 MIRU-VNTR.....	18
4.4.3 Epidemiología molecular de TB en Colombia.....	19
4.5 TB en pueblos indígenas en Colombia	20
5. Metodología	23
5.1 Tipo de estudio	23
5.2 Población de estudio	23
5.3 Muestras.....	23
5.4 Variables de estudio	24
5.4.1 Epidemiológicas.....	24

5.4.2	Microbiológicas	24
5.4.3	Genotípicas	25
5.5	Métodos para cumplir el objetivo general y el objetivo específico 1.	25
5.5.1	Extracción ADN	25
5.5.2	Cuantificación de ADN.....	25
5.5.3	Genotipificación molecular por <i>Spoligotyping</i>	25
5.5.4	Genotipificación molecular por MIRU-VNTR 24 loci.....	26
5.5.5	Análisis de resultados	26
5.5.6	Poder discriminatorio de <i>Spoligotyping</i> , MIRU-VNTR 24 loci y <i>Spoligotyping</i> + MIRU-VNTR 24 loci	26
5.6	Métodos para cumplir el objetivo general y el objetivo específico 2.	27
5.7	Métodos para cumplir el objetivo general y el objetivo específico 3.	27
5.8	Métodos para cumplir el objetivo general y el objetivo específico 4.	27
5.8.1	Análisis de asociaciones	28
5.9	Consideraciones éticas	28
6.	Resultados	29
6.1	Características sociodemográficas de la población indígena de estudio	29
6.1.1	Pueblos indígenas	29
6.1.2	Distribución de población indígena por departamento.....	30
6.1.3	Distribución de población indígena por sexo y edad	32
6.1.4	Perfil ocupacional de la población indígena	32
6.1.5	Condiciones asociadas a padecer TB de la población indígena del estudio	33
6.2	Características de los casos de TB de la población indígena del estudio	34
6.2.1	Clasificación de la TB basada en historia previa de tratamiento y desenlace	34
6.2.2	Muestras clínicas y casos de TB bacteriológicamente confirmados	34
6.3	Características de los aislamientos de <i>M. tuberculosis</i> obtenidos de la población indígena del estudio.....	35
6.3.1	Distribución geográfica de los aislamientos	35
6.3.2	Aislamientos de <i>M. tuberculosis</i> por año.....	36
6.3.3	Perfil de sensibilidad a fármacos antituberculosis de primera y segunda línea para el tratamiento	36
6.4	Caracterización molecular de los aislamientos de <i>M. tuberculosis</i>	37
6.4.1	Identificación de miembros del <i>cMtb</i> por <i>Spoligotyping</i>	37
6.4.2	Sublinajes genéticos identificados por <i>Spoligotyping</i>	37
6.4.3	Genotipos identificados por <i>Spoligotyping</i>	37
6.4.4	Comparación por <i>Spoligotyping</i> de los aislamientos encontrados en el estudio con datos nacionales	39
6.4.5	Agrupamientos por <i>Spoligotyping</i>	40
6.4.6	Genotipos encontrados por <i>Spoligotyping</i> y sensibilidad a fármacos. ...	45
6.4.7	Genotipos y agrupamientos identificados por MIRU-VNTR.....	47
6.4.8	Caracterización de los aislamientos identificados por la combinación de <i>Spoligotyping</i> y MIRU-VNTR 24 loci.....	51
6.4.9	Análisis de los aislamientos de <i>M. tuberculosis</i> provenientes de pacientes que aportaron dos muestras en tiempos diferentes.....	56
6.5	Poder discriminatorio de <i>Spoligotyping</i> , MIRU-VNTR 24 loci y <i>Spoligotyping</i> + MIRU-VNTR 24 loci	60

6.6	Análisis de asociación de variables.....	60
6.6.1	Asociación de sublinajes identificados por <i>Spoligotyping</i> y sensibilidad a fármacos de primera línea.....	60
6.6.2	Asociación de variables sociodemográficas, sublinajes genéticos y agrupamientos por <i>Spoligotyping</i>	61
6.6.3	Asociación de variables sociodemográficas y sublinajes genéticos por <i>Spoligotyping</i> , con sensibilidad a fármacos de primera línea.....	62
6.6.4	Asociación entre poblaciones indígenas con sublinajes genéticos por <i>Spoligotyping</i>	63
7.	Discusión.....	65
8.	Conclusiones y recomendaciones.....	77
8.1	Conclusiones.....	77
8.2	Recomendaciones.....	78
A.	Anexo 1: Cebadores utilizados para metodología MIRU-VNTR 24 loci.....	79
B.	Anexo 2: Tabla de lectura utilizada para MIRU-VNTR 24 loci.....	81
C.	Anexo 3: Genotipos huérfanos identificados en el estudio.....	83
	Anexo 3: Continuación.....	84
D.	Anexo 4: Análisis bivariado de pueblos indígenas con sublinajes genéticos identificados mediante <i>Spoligotyping</i>.....	85
E.	Glosario.....	88
	Bibliografía.....	91

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Incidencia estimada de TB para el mundo, 2014 (WHO, 2015).	11
Figura 2-1: Blancos genéticos para genotipificación de <i>M. tuberculosis</i> – H37Rv. (Barnes y Cave, 2003)	16
Figura 3-1: Esquema del Locus DR presente en cepas del <i>cMtb</i> (Barnes y Cave, 2003) 17	17
Figura 4-1: Posición de los 24 MIRUs utilizados actualmente para genotipificación molecular. (Morand <i>et al.</i> , 2010)	18
Figura 5-1: Distribución geográfica de los aislamientos analizados.	35
Figura 6-1: Distribución de los sublinajes genéticos identificadas en el estudio por departamento.	39

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Factores previamente descritos para desarrollar	10
Tabla 2. Número de personas por pueblos indígenas colombianos identificados en el estudio.	29
Tabla 3. Distribución de los pueblos indígenas colombianos identificados en el estudio por departamento	31
Tabla 4. Distribución de los pueblos indígenas colombianos identificados en el estudio por departamento	33
Tabla 5. Distribución de los genotipos encontrados en los aislamientos del estudio, caracterizados por <i>Spoligotyping</i>	38
Tabla 6. Estudios nacionales de genotipificación. <i>spoligotyping</i>	40
Tabla 7. Genotipos y patrones de sensibilidad a fármacos de primera línea	45
Tabla 8. Índice de discriminación HGDI para las técnicas de genotipificación utilizadas en el estudio.....	60
Tabla 9. Análisis bivariado de sublinajes genéticos identificados por <i>Spoligotyping</i> con resistencia a fármacos de primera línea	61
Tabla 10. Análisis bivariados de variables sociodemográficas y sublinajes genéticos, con condición de agrupamiento por metodología <i>spoligotyping</i>	62
Tabla 11. Análisis bivariados de variables sociodemográficas, sublinajes genéticos identificadas por <i>Spoligotyping</i> , con presentar MDR.	63

Lista de gráficas

	Pág.
Gráfica 1. Número de casos de TB distribuidos por sexo y edad.....	32
Gráfica 2. Perfil ocupacional de la población indígena del estudio.	33
Gráfica 3. Número de aislamientos de <i>M. tuberculosis</i> recibidos en el INS por año.	36
Gráfica 4. Perfil de sensibilidad de los aislamientos del estudio a fármacos antituberculosis.	37
Gráfica 5. Dendrograma generado del estudio de similitud mediante la metodología de <i>Spoligotyping</i>	41
Gráfica 6. Dendrograma generado del estudio de similitud mediante la metodología de MIRU-VNTR 24 loci.....	47
Gráfica 7. Dendrograma generado del estudio de similitud mediante la metodología de <i>Spoligotyping</i> y MIRU-VNTR 24 loci.....	52
Gráfica 8. Dendrograma generado del estudio de similitud mediante las metodologías de <i>Spoligotyping</i> y MIRU-VNTR 24 loci para 10 aislamientos provenientes de 5 pacientes.	56

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>ACDI</i>	Agencia Canadiense para el Desarrollo Internacional
<i>ADN</i>	Ácido Desoxiribonucleico
<i>Am</i>	Amikacina
<i>BAAR</i>	Bacilo Ácido Alcohol Resistente
<i>BK</i>	Baciloscopia
<i>CDC</i>	Centers for Disease Control and Prevention
<i>Cm</i>	Capreomicina
<i>cMtb</i>	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>CS</i>	Cicloserina
<i>CRISPR</i>	Clustered, regularly interspaced short palindromic repeats
<i>CSB</i>	Cabina Seguridad Biológica
<i>DR</i>	Direct Repeats
<i>DANE</i>	Departamento Administrativo Nacional de Estadística.
<i>E</i>	Etambutol
<i>Eto</i>	Etionamida
<i>H</i>	Isoniazida
<i>INS</i>	Instituto Nacional de Salud
<i>INF-γ</i>	Interferón Gamma
<i>IPS</i>	Instituto Prestador de Salud
<i>Km</i>	Kanamicina
<i>LJ</i>	Lôwentein Jensen
<i>MIRU-VNTR</i>	Mycobacterial Interspaced Repetitive Units-Variable Number Tandem Repeats
<i>Ofx</i>	Ofloxacin.
<i>Ok</i>	Ogawa Kudoh
<i>OMS</i>	Organización Mundial de la Salud
<i>OPS</i>	Organización Panamericana de la Salud
<i>PAS</i>	Ácido Paraaminosalicílico
<i>Pb</i>	Pares de bases
<i>PCR</i>	Polimerase Chain Reaction
<i>R</i>	Rifampicina
<i>PNUD</i>	Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo
<i>RFLP</i>	Restriction Fragment Length Polymorphis
<i>S</i>	Streptomycin
<i>SDP</i>	Secretaría Departamental de Planeación
<i>SIT</i>	Spoligotype International Type.
<i>SIVIGILA</i>	Sistema Nacional de Vigilancia

Abreviatura Término

<i>TACO</i>	Tryptophane aspartate coating protein
<i>TAES</i>	Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
<i>TB</i>	Tuberculosis
<i>MDR</i>	Multidrug-resistant
<i>XDR</i>	Extensively drug resistant
<i>UNICEF</i>	Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia
<i>VIH</i>	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
<i>WHO</i>	World Health Organization
<i>Z</i>	Pirazinamida

Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por un bacilo ácido alcohol resistente (BAAR) perteneciente al complejo *Mycobacterium tuberculosis (cMtb)*. En la actualidad, la TB constituye un serio problema de salud pública y según la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el año 2014 ésta enfermedad fue la segunda causa de mortalidad por un agente infeccioso en el mundo después del VIH (WHO, 2015).

Se estima que aproximadamente la tercera parte de la población mundial está infectada con el bacilo; sin embargo, solamente entre el 5 y 10% presentan síntomas típicos de la enfermedad como tos expectorante por más de 15 días (Herrera *et al.*, 2005).

En 2014 la OMS estimó 9,6 millones de casos nuevos de los cuales 1,5 millones fallecieron como consecuencia de la enfermedad. Para Colombia, la incidencia estimada por la OMS fue de 16.000 casos (WHO, 2015), mientras que la notificación realizada por parte del Sistema Nacional de Vigilancia (Sivigila) fue de 11.875 casos nuevos para éste mismo año (INS, 2014); ésta diferencia pone de manifiesto una brecha entre lo estimado y lo notificado ($\approx 25\%$) y evidencia la necesidad de diseñar actividades interdisciplinarias y colaborativas que contribuyan a reducir la brecha y permitan lograr la captación del total de los casos de TB.

En el año 2015, la OMS implementó la estrategia Fin de la TB (WHO, 2015b), la cual busca reducir la morbi-mortalidad de la TB y mitigar el impacto de la enfermedad; entre los pilares definidos para sustentar esta nueva estrategia, se encuentra el fortalecimiento de la investigación e innovación y es allí donde los denominados grupos vulnerables, entre los que se encuentra la población indígena, cobran particular interés.

Según el último censo realizado por el DANE en el 2005, en Colombia existen registrados 87 pueblos indígenas distribuidos a lo largo del territorio nacional en áreas rurales e incluso existen zonas urbanas con presencia de población indígena, como es el caso de

Bogotá donde residen 15.032 indígenas (DANE, 2007; SDP, 2005). Entre las pueblos indígenas más representativos de Colombia se encuentran los Emberá, U'wa, Inga, Muisca, Arhuaco, Kurripaco, Piapoco, Puinave, Sikuani, Cubeo, Desano, Guayabero, Karijona, Kurripako, Nukak Makú, Piaroa, Piratapuyo, Tucano, Bara, Barasana, Carapana, Macuna, Pisamira, Siriano, Tariano, Taiwano, Tatuyo, Tuyuka, y Wanano localizadas principalmente en la zona Sur-Oriente del país.

Colombia cuenta con una amplia diversidad cultural de pueblos indígenas y pese a que la política nacional establece la necesidad de consolidar una línea de acción de trabajo interprogramático en población indígena, son pocos los reportes documentados a la fecha y la información sobre la carga de la enfermedad así como los estudios de la dinámica de transmisión son limitados.

1. Planteamiento del problema

Factores socioeconómicos y la predisposición genética del hospedero, juegan un papel importante en la sensibilidad a la TB (Herrera *et al.*, 2005). Según Stephens *et al.*, 2006, la población indígena posee mayor probabilidad de padecer TB debido en parte a las características inherentes de algunos pueblos indígenas como su condición nómada, dificultad en el acceso a un diagnóstico oportuno y poca adherencia al tratamiento. Adicionalmente, el desconocimiento de la enfermedad sumado a las diversas tradiciones religiosas y culturales de ésta población, impiden a las entidades territoriales la posibilidad de realizar intervenciones asertivas para su control (Cardona *et al.*, 2013).

En Colombia los reportes de TB en población indígena varían anualmente por regiones, aun en departamentos donde es sabido que existe un alto número de personas indígenas, por ejemplo para Amazonas en el año 2005 se reportaron 83 casos nuevos de TB por cada 100.000 habitantes, mientras que para Cesar y Guaviare en el mismo año se registraron 13 y 35 casos nuevos de TB por cada 100.000 habitantes respectivamente (OPS 2007).

Otros estudios nacionales registran altas tasas de TB particularmente en comunidades como los Kogui y Guayabero, quienes aportan un gran número de casos con 2.646 y 3.500 por cada 100.000 habitantes respectivamente; mientras que algunos asentamientos del Amazonas (172 casos/100.000 habitantes) junto con las etnias Sikuni (548 casos/100.000 habitantes) y Curripacos (556/100.000 habitantes) han tenido las menores prevalencias reportadas (OPS, 2007).

Este comportamiento muestra una amplia heterogeneidad en la carga de la enfermedad que podría estar relacionado con condiciones específicas de cada pueblo indígena;

motivo por el cual se hace necesario realizar investigaciones que permitan tener conocimiento sobre la situación actual de la TB en los pueblos indígenas de Colombia.

Por otra parte, en algunas partes de Colombia se han hecho estudios para conocer la estructura genética del *M. tuberculosis* circulante en el país (Puerto *et al.*, 2015; Realpe *et al.*, 2014; Cerezo *et al.*, 2012), lo que permite junto con la genotipificación conocer la dinámica de transmisión de la enfermedad para proponer estrategias de control; sin embargo no hay evidencia que permita conocer éstas características en los aislamientos de *M. tuberculosis* obtenidos de poblaciones indígenas, lo que permitiría obtener conocimiento para ser utilizado en intervenciones de política pública encaminadas a este grupo poblacional vulnerable.

2. Justificación

La población indígena se encuentran entre los grupos vulnerables definidos por la OMS y según datos oficiales de OPS, es una de las poblaciones en Colombia con mayores tasas de morbi-mortalidad asociada a TB (OPS, 2007); por otra parte la estrategia mundial fin de la TB propone un enfoque de atención diferencial para población vulnerable que permita cerrar las brechas de acceso y equidad, lo que indica la prioridad y el direccionamiento del trabajo en pueblos indígenas para el país.

Los pueblos indígenas en Colombia, han sido intervenidos en los últimos años principalmente en temas relacionados con costumbres, entorno ecológico y factores socio culturales y en menor proporción en lo relacionado a los temas de salud; esto unido al número de casos de TB en población indígena que se reportan al Sivigila y al subregistro al que se enfrenta el país, hace que esta población deba ser objeto de estudios particulares que provean información actualizada sobre el estado de la TB encaminados a la reducción de la carga de la enfermedad.

Tradicionalmente, la epidemiología clásica ha permitido importantes avances en la comprensión de los determinantes asociados al desarrollo de la TB; sin embargo, durante las últimas décadas el uso de herramientas moleculares aplicadas a la epidemiología molecular han aportado al entendimiento sobre de la dinámica de transmisión de la TB y al esclarecimiento de casos de reinfecciones, recaídas e infecciones mixtas, por lo tanto esta investigación propone a través del uso de las metodologías moleculares de *Spoligotyping* y MIRU-VNTR así como el conocimiento de los patrones de sensibilidad a fármacos, realizar la caracterización molecular de aislamientos de *M. tuberculosis* provenientes de población indígena captados por el Instituto Nacional de Salud (INS), a través de la vigilancia rutinaria durante el periodo 2009 a 2014, para aportar conocimiento al país y así crear estrategias de control que permitan alinearse con el objetivo mundial

para el control de la enfermedad que es poner fin a la epidemia de TB en el mundo para el año 2035.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Caracterizar molecularmente los aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* causantes de tuberculosis activa, circulantes en indígenas de Colombia entre los años 2009 y 2014.

3.2 Objetivo específico

1. Establecer los genotipos de *M. tuberculosis* por *Spoligotyping* y MIRU-VNTR de los aislamientos clínicos de población indígena, captados a través de la vigilancia rutinaria en el INS.
2. Determinar la posible circulación de otros miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en los aislamientos clínicos de la población indígena de estudio.
3. Comparar los patrones genéticos circulantes en las poblaciones indígenas, con los patrones registrados en las bases de datos nacionales e internacionales.
4. Describir el comportamiento epidemiológico de la tuberculosis en la población indígena captada en el estudio.

4. Marco teórico

4.1 Historia natural de la TB

La TB es una enfermedad infecto-contagiosa crónica causada por un bacilo ácido alcohol resistente perteneciente al *cMtb*, dentro del cual se encuentran diferentes especies como: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. capre*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, “*M. mungi*”, “*M. suricattae*”, “*M. origys*”, *M. pinnipedii* (Tortoli, 2014) y “*M. chimpanzee*”. Aunque la presentación clínica principal de la TB es la pulmonar, puede presentarse en zonas distales constituyendo la TB extrapulmonar (WHO, 2015).

La sintomatología clásica de un sintomático respiratorio (SR) incluye la presencia de tos expectorante por un periodo superior a 15 días, pérdida de peso, fiebre y sudoración nocturna (Lawn y Zumla, 2011). La forma de transmisión está dada por la inhalación del bacilo proveniente de aerosoles emitidos desde un individuo enfermo al toser o estornudar. A pesar que la OMS estima que la tercera parte de la población mundial se encuentra infectada, solamente entre 5 y 10% desarrollan la enfermedad y manifiestan síntomas clínicos como consecuencia de diversos factores tales como la predisposición genética, hábitos del individuo o patologías de base que contribuyen al deterioro del sistema inmune, el cual naturalmente confina la infección en una estructura denominada granuloma que constituye la infección latente (Herrera *et al.*, 2005; Ramakrishnan, 2012; WHO, 2015). En la tabla 1 se listan algunos de los principales factores asociados al desarrollo de TB activa.

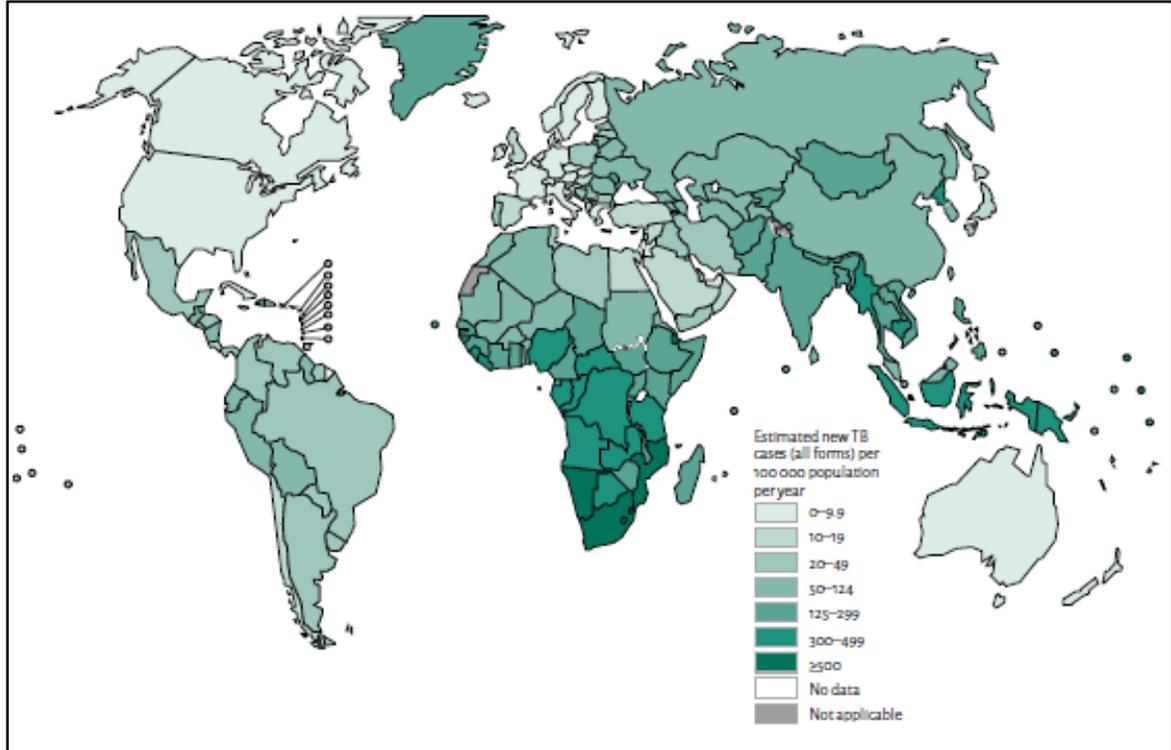
Tabla 1. Factores previamente descritos para desarrollar

Factor	Mecanismo
VIH	Bajos niveles de CD4 ⁺ disminuyen la cantidad de INF- γ evitando así la activación de macrófagos y la consecuente producción de intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno.
Diabetes	Defectos en la inmunidad celular debida a hiperglicemia. Se han descrito alteraciones en la adherencia, quimiotaxis y fagocitosis de leucocitos en individuos insulino-dependientes.
Susceptibilidad genética	Polimorfismos genéticos han sido descritos para INF- γ , óxido nítrico sintasa y receptores tipo Toll sugiriendo una inadecuada respuesta inmune innata contra el bacilo.
Condiciones de hacinamiento	Contribuye a la diseminación del bacilo.
Fumar	Promueve la afección pulmonar y supone un descontrol en la estabilidad del granuloma, aumentando dos veces el riesgo de padecer la enfermedad.
Edad	Implica los extremos de la vida. Niños y ancianos presentan deficiencia inmune incapaz de controlar la infección por el bacilo.
Medicamentos	La administración prolongada de corticoides inhibe la migración leucocitaria así como el metabolismo linfocitario.
Deficiencias Nutricionales	La deficiencia en vitamina D evita la síntesis de péptidos micobactericidas como catelicidina, β -defensina 4 y la expresión de proteínas reguladoras de la maduración fagosomal como TACO.

Modificado de Lawn y Zumla, 2011. INF- γ : Interferón Gamma. TACO: Tryptophane aspartate coating protein.

4.2 Epidemiología de la TB

Para 2014, según el reporte de la OMS se estimó una incidencia de 9,6 millones de casos nuevos para TB en el mundo, de los cuales 1,5 millones fallecieron como consecuencia de la enfermedad, dentro de ellos 0,4 millones fueron positivos para VIH, mientras que 1,1 millones fueron seronegativos (Figura 1); para el mismo año, 5,4 millones de los casos nuevos se presentaron en hombres, 3,2 millones en mujeres y 1 millón en niños.

Figura 1-1: Incidencia estimada de TB para el mundo, 2014 (WHO, 2015).

Según la OMS, 58% de los casos estimados para 2014 se presentaron en Asia, 28% en África, 8% el Mediterráneo Oriental, mientras que Europa y la región de las Américas aportaron el 3% cada uno. Para el mismo periodo, la región de las Américas, el Sureste Asiático y el Pacífico alcanzaron los objetivos de milenio encaminados a la reducción de la carga de la TB, logrando reducir la prevalencia y mortalidad en casi un 50% con relación a los reportes de 1990. A pesar de estos alcances, la incidencia global de la enfermedad no ha tenido un comportamiento similar; en este sentido, mientras que en 1990 se tenían incidencias cercanas a 150 casos/100.000 habitantes, a 2014 la media mundial se encontró en 133 casos/100.000 habitantes, fenómeno que dilucida un bajo impacto en acciones encaminadas a frenar la transmisibilidad del bacilo y soporta la necesidad de continuar fortaleciendo las acciones de manera interdisciplinaria con diferentes actores para lograr el control definitivo de la enfermedad (WHO, 2015).

Para Colombia, la incidencia ha tenido un comportamiento estable de ≈ 25 casos/100.000 habitantes (WHO, 2015). Según el informe de la semana epidemiológica 52 emitido por Sivigila, en 2015 se notificaron 12.918 casos de TB de los cuales 10.519 (81,4%)

correspondieron a TB-pulmonar, 2.385 (18,4%) a formas extra-pulmonares y 14 (0,2%) carecieron de información de datos complementarios que permitieran su categorización. En cuanto a la clasificación de los casos, 9.548 (73,9%) fueron confirmados por laboratorio, 3.122 (24,2%) por clínica y 248 (1,9%) por nexo epidemiológico (INS, 2015).

4.3 Diagnóstico de TB

Según la OMS, durante el periodo 2000-2014 cerca de 43 millones de personas (VIH+ y VIH-) han sido curadas de TB gracias al tratamiento oportuno (WHO, 2015). Estos importantes avances se encuentran estrechamente ligados al esfuerzo realizado en temas como el desarrollo de nuevas alternativas diagnósticas y su implementación en diferentes países; sin embargo, debido al creciente número de individuos infectados con VIH y la aparición de cepas farmacorresistentes, es fundamental el desarrollo de nuevas investigaciones que permitan captar mayor número de casos en estadios tempranos de la enfermedad, a la vez que favorezcan conocer el estado de sensibilidad a los fármacos dispuestos para el tratamiento (Dye & Williams, 2010).

El diagnóstico actual para TB comprende generalmente criterios clínicos y bacteriológicos. Los criterios clínicos se encuentran enfocados en evaluación médica, donde el clínico realiza un examen en búsqueda de síntomas característicos de la TB (tos por tres o más semanas, con o sin producción de esputo; tos con sangre (hemoptisis), dolor en el pecho, pérdida de apetito, pérdida inexplicable de peso, sudoración nocturna, fiebre y fatiga); adicionalmente, se realiza entrevista para indagar el tiempo de duración de los síntomas o si ha existido algún contacto conocido con personas que tengan o hayan tenido TB (CDC, 2013).

En cuanto al diagnóstico bacteriológico, comprende ensayos fenotípicos y genotípicos tales como:

4.3.1 Baciloscopia (BK)

Dada su relativa facilidad, la BK de esputo constituye la metodología más utilizada en el mundo para el diagnóstico de la TB. Se ha descrito una sensibilidad que varía entre el 20 y el 60% y se considera que son necesarios entre 5.000 y 10.000 BAAR/mL para tener una BK positiva, por lo que es particularmente útil en individuos con TB-pulmonar,

mientras que dificulta el diagnóstico en formas extrapulmonares o durante la co-infección con VIH donde usualmente las muestras son paucibacilares (Morán *et al.*, 2000; OPS, 2008 (a); WHO, 2015).

4.3.2 Cultivo

A pesar que el cultivo en medio sólido requiere entre 4 y 8 semanas para el crecimiento de miembros del *cMtb* a partir de diversas muestras biológicas como el esputo; en la actualidad es considerado el estándar de oro por la OMS y después de la BK, es el segundo método más utilizado para el diagnóstico de la enfermedad. En contraste con la BK, el cultivo sólo requiere entre 10 y 100 BAAR/mL lo que contribuye al aumento en la sensibilidad de la BK hasta en un 60%. Aunque el cultivo proporciona un medio adecuado para el crecimiento de cepas del *cMtb*, la identificación final requiere la realización de pruebas fenotípicas basadas en algunas características bioquímicas que poseen este grupo de microorganismos, retardando aún más el diagnóstico definitivo (OPS, 2008 (b); Dorronsoro y Torroba, 2007).

A la fecha, han sido avalados dos medios de cultivo sólidos para la identificación de *M. tuberculosis*; el primero de ellos el medio Ogawa Kudoh (OK) en el que las muestras a sembrar requieren una breve descontaminación con hidróxido de sodio al 4% (NaOH 4%) durante dos minutos, por lo que suele ser usado en laboratorios de baja complejidad. El segundo medio de cultivo es Lôwenstein Jensen (LJ), para el uso de éste medio los especímenes deben ser previamente tratados con un agente mucolítico como el N-acetil L-cisteína y descontaminados con hidróxido de sodio al 2% de manera simultánea para posteriormente recolectar los bacilos mediante centrifugación; procedimiento que sólo puede ser llevado a cabo en laboratorios de segundo nivel con una infraestructura capaz de prevenir la propagación de aerosoles (Warren *et al.*, 2004; OPS, 2008 (b); WHO, 2015).

En los últimos años la implementación de medios de cultivo líquidos, ha mejorado notablemente la sensibilidad de los sistemas tradicionales y ha contribuido a reducir el tiempo de crecimiento bacilar de 8 a 2 semanas en promedio (Dorronsoro y Torroba, 2007). Algunos de los medios de cultivo líquido son utilizados en sofisticados equipos que permiten no solo incubar el microorganismo, sino que al mismo tiempo monitorean

continuamente la actividad metabólica que hay al interior del medio para determinar la presencia de crecimiento bacteriano en un sistema automatizado. Dentro de los más utilizados se encuentran el ESP Culture System II (Trek Diagnostic Systems), el MB/BacT ALERT 3D (BioMerieux) y el MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube, BD) (Dorronsoro y Torroba, 2007)

4.3.3 Identificación fenotípica

La identificación de *M. tuberculosis* a partir de cultivos positivos es realizada mediante la determinación de características bioquímicas particulares como acumulación de niacina, reducción de nitratos a nitritos y la presencia de una catalasa termolábil a 68°C. A pesar de que éstas son características distintivas de *M. tuberculosis*, se han descrito otros miembros del *cMtb* con igual comportamiento como en el caso de *M. bovis* e incluso otras micobacterias como *M. gastrí*; motivo por el cual se hace necesario implementar un amplio panel de pruebas que permitan confirmar la identidad de la cepa, lo que supone un inconveniente para múltiples laboratorios debido a los costos altos inherentes a estas determinaciones y las limitaciones propias de la técnica de identificación bioquímica estándar como la complejidad, demora y falta de reproducibilidad (Dorronsoro y Torroba, 2007; OPS, 2008 (b); Cortés, 2009; Caminero *et al.*, 2014).

4.3.4 Identificación molecular

La identificación molecular ofrece múltiples ventajas sobre los métodos tradicionales debido a la baja carga bacilar que requieren, el menor tiempo en la emisión de resultados, así como una alta sensibilidad y especificidad. El genoma de las micobacterias cuenta con secuencias de ADN altamente conservadas que permiten su clasificación por género, así como regiones hipervariables que favorecen la identificación de especies. Estas características genéticas han permitido la creación de diversas metodologías moleculares y han contribuido al desarrollo de la epidemiología molecular como una herramienta importante para el estudio de la dinámica de transmisión de las enfermedades ocasionadas por éste grupo de microorganismos (Dorronsoro y Torroba, 2007; Cortés, 2009).

Distintos blancos genéticos han sido evaluados para tipificar molecularmente a las micobacterias; algunos de esos blancos incluyen el gen *hsp65*, el cual codifica para una

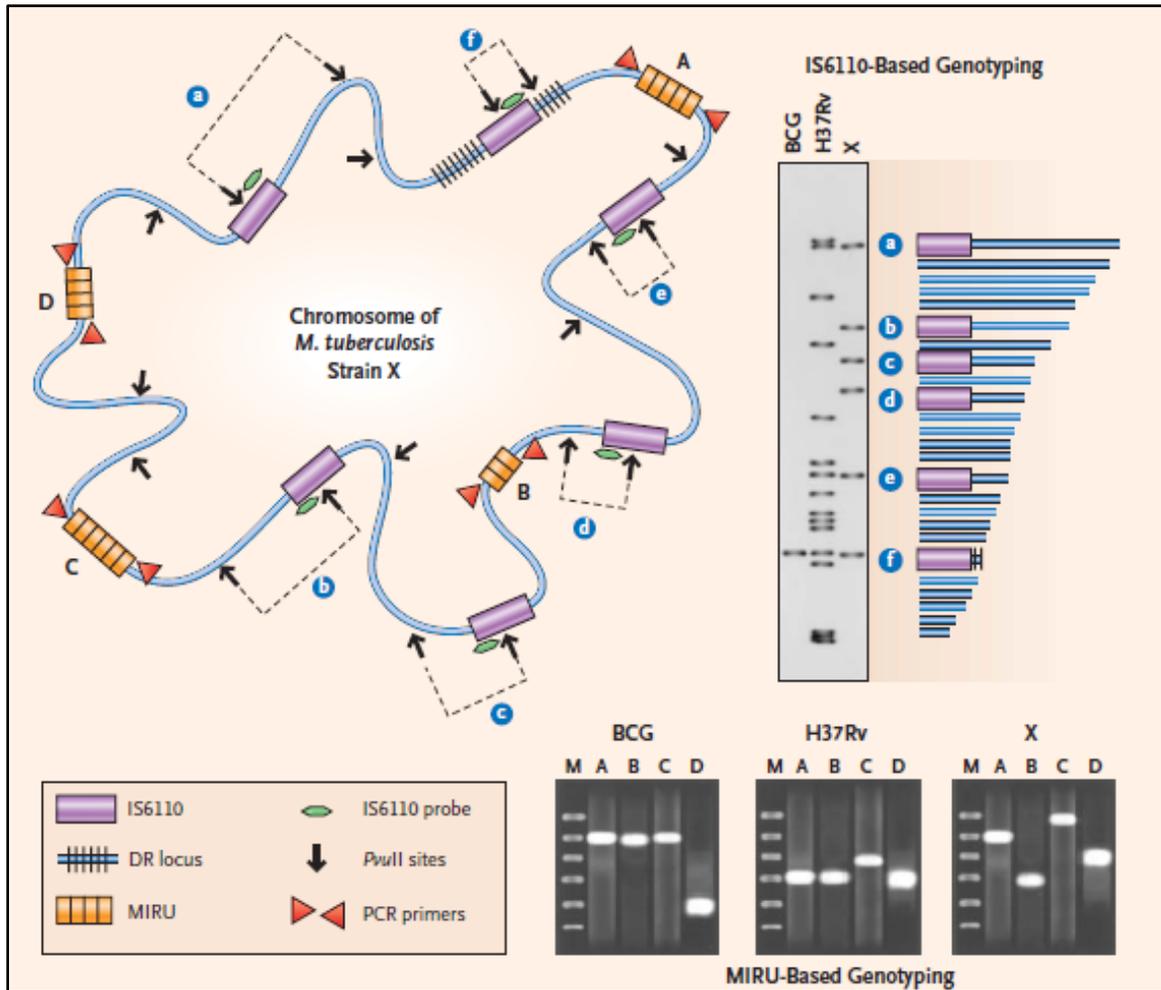
proteína de choque térmico de 65 kDa; elementos de inserción (IS; por sus siglas en inglés); la región intergénica 16S-23S y algunas secuencias codificantes para la subunidad ribosomal 16S (Puerto *et al.*, 2007; Palomino *et al.*, 2007). Estas dianas han permitido el desarrollo de metodologías moleculares como el *Spoligotyping*, los MIRU-VNTR y el RFLP IS6110, las cuales han permitido entender la dinámica de transmisión de la enfermedad, identificar el patrón genético de cepas de *M. tuberculosis* y generar asociaciones de genotipos con patrones de farmacorresistencia (Van Embden *et al.*, 1993; Warren *et al.*, 2004; Garzón *et al.*, 2008).

4.4 Epidemiología molecular de TB

“La habilidad de discernir la huella genética (genotipo) de aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* ha revolucionado nuestro entendimiento de la transmisión de la tuberculosis” (Barnes y Cave, 2003). Como lo mencionan Barnes y Cave, la implementación de metodologías genéticas y el desarrollo de la epidemiología molecular ha permitido ampliar el conocimiento actual de la TB y algunos de los principales avances han estado relacionados con la descripción de las bases moleculares asociadas a la resistencia a fármacos. Dentro de las utilidades que brinda la epidemiología molecular se encuentran, la confirmación de brotes epidemiológicos, la identificación de contaminación cruzada en laboratorio, permite entender mejor la dinámica de transmisión de la TB, ayuda a identificar la distribución geográfica de los linajes genéticos de *M. tuberculosis*, la identificación de casos de reinfección (exógena o endógena), infección mixta, a su vez, sirve de apoyo en la evaluación y seguimiento a programas de TB (Van Embden *et al.*, 1993; Barnes y Cave, 2003; Mathena *et al.*, 2006.).

Como se mencionó previamente, diversos blancos genéticos han sido evaluados para la caracterización molecular de los diferentes miembros del *cMtb*. Estos importantes avances vienen dados gracias a la secuenciación del genoma completo de *M. tuberculosis* y han favorecido el desarrollo de metodologías tales como: *Spoligotyping*, MIRU-VNTR y RFLP-IS6110, sobre las cuales se soporta la epidemiología molecular contemporánea (Figura 2) (Kamerbeek *et al.*, 1997; Supply *et al.*, 1997; Supply *et al.*, 2000, Barnes y Cave, 2003, Shabbeer *et al.*, 2012).

Figura 4-2: Blancos genéticos para genotipificación de *M. tuberculosis* – H37Rv. (Barnes y Cave, 2003)

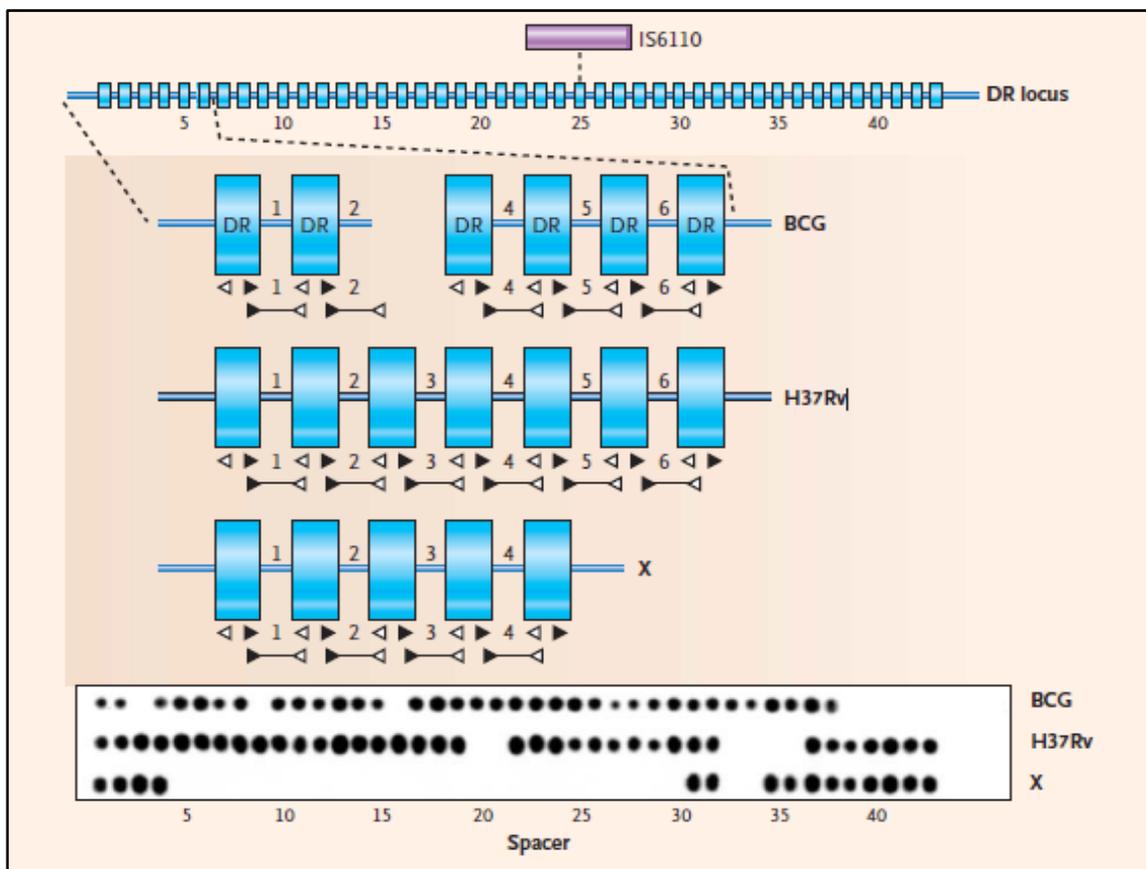


4.4.1 Spoligotyping

Esta técnica molecular se fundamenta en el polimorfismo del locus DR (repeticiones directas o DRs) presente en los miembros del *cMtb*, debido al reordenamiento mediado probablemente por el elemento de inserción IS6110. En éste locus, se han descrito regiones conservadas de 36 pb (espaciadores conservados) y regiones intercaladas o interespaciadoras que varían entre 34 y 41 pb de longitud. La presencia o ausencia de estas regiones interespaciadoras brinda un patrón de comparación que permite caracterizar los miembros del *cMtb* a través de la amplificación por PCR del locus DR, en ésta metodología se emplean un par de cebadores, uno de ellos marcado con biotina,

dando como resultado un amplicón biotinilado que será posteriormente hibridado con una serie de secuencias complementarias que corresponden a cada uno de los 43 espaciadores evaluados y que se encuentran covalentemente unidos a una membrana; finalmente una reacción de quimioluminiscencia es llevada a cabo para visualizar la hibridación y los resultados son expresados como un código binario donde 1 indica presencia del espaciador y 0 su ausencia (Kamerbeek *et al.*, 1997). En la figura 3 se muestra la estructura del locus DR y se evidencia el patrón de la hibridación para BCG, H37RV y un aislamiento X.

Figura 3-3: Esquema del Locus DR presente en cepas del *cMtb* (Barnes y Cave, 2003)



El origen del locus DR se encuentra estrechamente relacionado al sistema CRISPR (Clustered, regularly, interspaced short palindromic repeats); éste sistema consiste en la incorporación de material genético foráneo, específicamente de bacteriófagos, al genoma de la bacterias. La región del genoma en la cual se integra el ADN foráneo además de servir como blanco en técnicas de genotipificación (en el caso del *spoligotyping*), brinda a

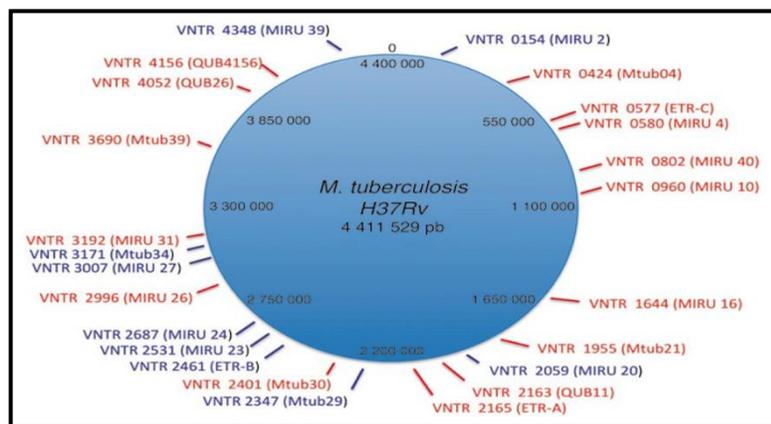
la bacteria una respuesta inmune adaptativa contra el ataque de bacteriófagos (Marraffini y Sontheimer 2010, Sola 2015)

4.4.2 MIRU-VNTR

Los MIRU-VNTR o Unidades Repetitivas Micobacterianas Interespaciadas – Número Variable de Repeticiones en Tándem, son repeticiones en tándem que han sido observadas en el genoma bacteriano de especies del *cMtb* con homología a los minisatélites descritos en eucariotas. En el cromosoma de la cepa de referencia para TB, H37Rv se han descrito secuencias repetitivas de 40 a 100 pb en 41 localizaciones, de las cuales 24 han mostrado polimorfismos que permiten una mayor resolución en la genotipificación de los aislamientos, comparada con otras metodologías como el *Spoligotyping* y que en conjunto con éste, igualan el poder de discriminación del RLP-IS6110, el cual fue considerado como el estándar de oro durante muchos años (Figura 4) (Supply *et al.*, 1997).

La genotipificación de los aislamientos de *M. tuberculosis* a través de MIRU-VNTR, se basa en la amplificación de 24 loci (Figura 4) distribuidos a lo largo del cromosoma bacteriano que son visualizados mediante un corrido de electroforesis en gel de agarosa. Los resultados obtenidos indican el número de alelos presentes en cada locus y el análisis se lleva a cabo mediante la comparación de las bandas obtenidas y un marcador de peso molecular.

Figura 4-4: Posición de los 24 MIRUs utilizados actualmente para genotipificación molecular. (Morand *et al.*, 2010)



4.4.3 Epidemiología molecular de TB en Colombia

Aunque la epidemiología tradicional ha permitido avances importantes en el entendimiento de los factores que favorecen la aparición y persistencia de la TB en el país, el advenimiento de la biología molecular y su utilización a través de metodologías moleculares como el *Spoligotyping* y los MIRU-VNTR, han fortalecido el actual conocimiento sobre la enfermedad (Burgos *et al.*, 2004).

En Colombia, estudios nacionales han descrito una amplia variedad de sublinajes genéticos circulantes. En este sentido, los principales sublinajes encontrados a lo largo del territorio nacional han sido LAM (39,9%), Haarlem (19%), patrones huérfanos (17%) y T (9%); mientras que MANU (0,5%), S (1,1%), y X (1,8%) constituyen los genotipos con menor representación (Puerto *et al.*, 2015). Cerezo *et al.*, 2012 demostraron que luego de genotipificar 152 aislamientos obtenidos de pacientes con TB en la ciudad de Bogotá, el sublinaje más representativo fue LAM (49,3%), seguida por Haarlem (25%), T (13,8%), Huérfanos (6,6%), S (3,3%), X (1,3%) y Beijing (0,7%); sugiriendo que LAM se transmitía más activamente en la población; adicional a esto, la tipificación por MIRU-VNTR permitió determinar la presencia de una infección policlonal en un individuo co-infectado con VIH; confirmando la utilidad de ésta metodología como una herramienta de epidemiología molecular para un mejor entendimiento de la enfermedad.

Por otro lado, la tipificación molecular e identificación de sublinajes genéticos de cepas de *M. tuberculosis*, cobra interés particular en aquellas cepas que dadas a sus particularidades genéticas, han sido ampliamente asociadas con casos de TB multirresistente (MDR TB, por sus siglas en inglés), transmisión y patogenicidad, como es el caso del sublinaje Beijing (Zhang *et al.*, 2016). Estudios nacionales han mostrado que éste genotipo ha constituido el 3,2% de los sublinajes genéticos reportados, y su circulación ha estado restringida al municipio de Buenaventura (Puerto *et al.*, 2015). Murcia *et al.*, 2010 documentaron el caso de una niña de 15 años hospitalizada en la ciudad de Bogotá que provenía de Buenaventura con una sospecha clínica de TB-MDR, luego de un análisis de tejidos post-mortem, se determinó la presencia de una rara cepa denominada Beijing-like. Para el momento de la publicación, la cepa no había sido descrita en Sur América, aunque existían reportes en países como Estados Unidos, Tailandia, Rusia, Japón, Taiwán, Georgia y Vietnam; lo que hizo suponer la posibilidad de que haya sido una variante emergente de un bacilo virulento del linaje Beijing

característico de esta zona del país. Por otra parte, un estudio retrospectivo llevado a cabo en el Valle del Cauca por Ferro *et al.*, 2011, demostraron mediante *Spoligotyping* la circulación de genotipos LAM9 (20%), H1 (20%) y Beijing (16%); esto últimos asociados a casos de MDR y dos casos de XDR (SIT190).

Finalmente, el uso de herramientas moleculares como *Spoligotyping* y MIRU-VNTR han aportado información valiosa para comprender dinámica de transmisión de la TB (Roetzer *et al.*, 2011; Zamani *et al.*, 2013)

4.5 TB en pueblos indígenas en Colombia

En Colombia según el último censo nacional, hay 87 pueblos indígenas registrados con un total de 1'392.623 personas, equivalentes al 3,4% de la población nacional. Aunque los departamentos de La Guajira, Cauca, Nariño y Córdoba contribuyen con cerca del 60% de la población indígena, según el DANE hay presencia de éstos pueblos indígenas en 27 departamentos, distribuidos en 710 resguardos legalmente constituidos, en 228 municipios del país (DANE, 2007).

El perfil epidemiológico en los pueblos indígenas está estrechamente ligado a condiciones socioeconómicas propias de ésta población como los altos índices de pobreza, desempleo, analfabetismo, migración, destrucción del ecosistema, alteración de la dinámica de vida, aislamiento geográfico, acceso limitado a los servicios básicos de salud, agua, vivienda y problemas nutricionales que favorecen la presencia de diversas enfermedades entre las que se incluye la TB. (IIDH, 2006).

En Colombia, durante los años 2002 a 2006 se desarrolló el proyecto de fortalecimiento de la estrategia DOTS/TAES en pueblos indígenas, financiado por la Agencia Canadiense para el Desarrollo Internacional (ACDI/CIDA) y apoyado por la Organización Panamericana de Salud (OPS/OMS), el Ministerio de la Protección Social y el INS; del cual se lograron importantes avances en el conocimiento de la enfermedad, presentados en 2007 para los departamentos de Amazonas, Cesar, Guainía, Guaviare, La Guajira, Nariño y Vichada.

Para el departamento del Amazonas, el número de casos nuevos de TB pulmonar por 100.000 habitantes tuvo un incremento importante de 62 a 83 casos de 2001 a 2005, con mayor presentación en niños menores de quince años y adultos mayores (OPS, 2007).

Los pueblos indígenas con mayor incidencia de TB fueron Ticuna (74,1%), Huitoto (12,1%), Filillay (5,2%) y Macuna (3,4%); mientras que los Yucuna, Yaci y Tanimuca constituyeron los pueblos con menor número de casos (OPS, 2007).

En el Cesar, gracias a la búsqueda activa de SR llevada a cabo por la IPS indígena Dusakawi, fueron notificados 231 casos de TB pulmonar en el año 2000; cifra que se redujo sustancialmente para el 2005 donde se presentaron 13 casos/100.000 habitantes.

Por otro lado, durante el periodo 2000 a 2005 el departamento de Guainía tuvo una incidencia para TB pulmonar de 24,4 casos/100.000 habitantes y mortalidad para el año 2002 de 5,1 casos/100.000 habitantes. En esta región cerca del 80% de la población es indígena y como consecuencia, el mayor número de casos de TB es registrado para estos grupos poblaciones (OPS, 2007).

En el caso del Guaviare, la incidencia de TB presentó valores oscilantes de 23,06; 36,13 y 25,48 casos/100.000 habitantes para los años 2002, 2004 y 2005 respectivamente. El 32,7% de los casos se notificaron en población indígena y el 94% fueron presentaciones clínicas de TB pulmonar en individuos menores de quince años (OPS, 2007).

En Nariño durante el año 2005, se registró una incidencia de 85,5 casos/100.000 habitantes, cifra que superó notablemente la incidencia nacional. En éste sentido, los municipios con mayor carga de TB fueron Taminango (44,3 casos/100.000 habitantes), Barbacoas (40,9 casos/100.000 habitantes), Santa Cruz (40,4 casos/100.000 habitantes) y Tumaco (33,7 casos/100.000 habitantes); los cuales estaban habitados principalmente por indígenas Awá. Diferente al comportamiento evidenciado para los departamentos de Guaviare y Amazonas, en Nariño el grupo etario donde más casos de TB se presentaron estuvo conformado por individuos con edades entre los 35 y 50 años (OPS, 2007).

Para La Guajira, la tasa de mortalidad por TB en 2003 fue de 4,3 casos/100.000 habitantes, sin embargo para el año siguiente se logró una reducción y se notificaron 2 casos/100.000 habitantes. En este departamento, la mayor carga de TB se presentó en indígenas de los pueblos indígenas Wayuú, Kogui, Arzarios y Wiwa. (OPS, 2007).

Finamente, en el Vichada donde el 70% de la población es indígena, la incidencia de TB se mantuvo estable entre los años 1998 a 2004 con 26 casos/100.000 habitantes;

mientras que las tasas de mortalidad alcanzaron cifras del 22% como sucedió en 2004 (OPS, 2007).

Como se observa, los datos de incidencia y mortalidad para la población indígena son muy variables y parecen estar estrechamente ligados a las condiciones particulares de cada pueblo. Adicionalmente, como se observó en el Cesar, la búsqueda activa de sintomáticos respiratorios influencia positivamente la incidencia de la TB y muestra un panorama más asertivo de la carga real de la enfermedad, sugiriendo la necesidad de implementar acciones que contribuyan no sólo a mejorar la captación de nuevos pacientes, sino a la conformación de redes con personal capacitado al interior de cada pueblo indígena y así abordar la TB desde una percepción más social y étnica.

5. Metodología

5.1 Tipo de estudio

Estudio observacional, descriptivo en el que se caracterizaron molecularmente aislamientos de *M. tuberculosis* causantes de TB activa en pueblos indígenas de Colombia.

5.2 Población de estudio

Aislamientos de *M. tuberculosis* obtenidos de población indígena a partir de cultivos positivos remitidos al INS durante los años 2009 a 2014 y que hacen parte de la colección biológica del grupo de Micobacterias del INS.

5.3 Muestras

Se analizaron 234 fichas de notificación de TB, remitidas al grupo de Micobacterias del INS durante el periodo 2009 a 2014, estas fichas correspondían a 229 personas que pertenecían a población indígena; 5 personas presentaron doble registro, al aportar aislamientos de *M. tuberculosis* en diferentes tiempos.

Los aislamientos se encontraban almacenados en la colección biológica del grupo de Micobacterias del INS y tenían identificación previa como *cMtb* a través de pruebas bioquímicas o a través de la metodología de TB-ID, basada en la identificación por inmunocromatografía del antígeno MPT64. Las pruebas de sensibilidad a fármacos fueron desarrolladas en medio líquido Middlebrook 7H9 con el sistema semi automatizado BACTEC MGIT 960, por el grupo de Micobacterias de la dirección de Redes en Salud Pública.

Para evitar la contaminación cruzada en el laboratorio, se trabajó con un número limitado de aislamientos al mismo tiempo, los cultivos fueron procesados en una CSB clase II tipo A2, de igual forma, las mezclas para PCR se elaboraron en una CSB exclusiva para éste fin con las mismas características que la nombrada anteriormente. Ésta CSB ofrece protección personal, del entorno y del producto; en los modelos de tipo A2 todos los conductos contaminados se encuentran a presión negativa. (WHO, 2012).

5.4 Variables de estudio

5.4.1 Epidemiológicas

Los datos relacionados con el nombre, sexo, edad, estado VIH, departamento, municipio, resguardo indígena, pueblo indígena, contacto previo con un paciente diagnosticado con TB, tipo de muestra, BK, factores adicionales de alto riesgo y vulnerabilidad para TB; fueron obtenidos a partir de la ficha de notificación de cada caso de TB del grupo Micobacterias del INS y tabulados en una base de datos Excel 2013. La información faltante fue complementada por las bases de datos nacionales de TB y VIH del Sivigila correspondientes al periodo de estudio.

Para identificar el pueblo indígena de aquellos individuos en los cuales no se registró ésta variable en la ficha de notificación, se solicitó una base de datos al Ministerio del Interior con información de los pueblos y los resguardos indígenas que se encuentran legalmente constituidos en el país. Con la información anterior, los datos del resguardo indígena y la cedula de ciudadanía de cada individuo consignados en la ficha notificación para TB, se identificó el pueblo indígena de pertenencia.

5.4.2 Microbiológicas

Se tuvieron en cuenta la sensibilidad a fármacos de primera (S, E, H, R, Z) y segunda línea (Am, Cm, PAS, Cs, Eto, Ofx, Km) de los aislamientos de *M. tuberculosis* vinculados al estudio.

5.4.3 Genotípicas

Se analizaron las variables cualitativas de genotipificación por *Spoligotyping* y MIRU-VNTR 24 loci.

5.5 Métodos para cumplir el objetivo general y el objetivo específico 1.

5.5.1 Extracción ADN

Los aislamientos fueron obtenidos de criopreservados almacenados en el biobanco del grupo de Micobacterias del INS y sembrados para la recuperación de la biomasa por cuadruplicado en medio de cultivo Lôwenstein Jensen (LJ), según lo descrito por Kent *et al.*, 1985. Dos de los cuatro medios de cultivo fueron usados para extracción de ADN según el método descrito por Van Soolingen *et al.*, 2001. Los dos cultivos adicionales, se criopreservaron en glicerol para ser regresados a la colección biológica del biobanco del grupo de Micobacterias INS.

5.5.2 Cuantificación de ADN

La concentración de ADN fue determinada por medio de espectrofotometría haciendo uso del equipo NanoDrop de BioRad® con mediciones a 260/280 nm y una equivalencia de 50µg/mL por unidad de absorbancia. Se consideró 1,8 como la relación ideal 260/280 para ADN puro.

5.5.3 Genotipificación molecular por *Spoligotyping*

Se utilizó la metodología descrita por Kamerbeek *et al.*, 1997, cuyo fundamento se basa en la caracterización del locus DR mediante la utilización de los iniciadores DRa (5'GGTTTTGGGTCTGACGAC) y DRb (5'-CCGAGAGGGGACGGAAAC). La amplificación por PCR comprendió un ciclo a 96°C por 3 minutos, 20 ciclos a 96°C por 1 minuto, un ciclo a 55°C por 1 minuto, un ciclo a 72°C por 30 segundos y un paso final de extensión a 72°C por 5 minutos. El producto de PCR fue hibridado en una membrana comercial (Isogen-LifeScience). El resultado de la hibridación se evidenció mediante quimioluminiscencia, empleando el estuche comercial ECL Direct (Amersham, UK) y

revelado mediante exposición a una película fotosensible. Como control positivo se utilizaron las cepas de referencia H37Rv y BCG P3, los controles negativos fueron buffer.

5.5.4 Genotipificación molecular por MIRU-VNTR 24 loci

La tipificación se realizó según la metodología descrita por Supply *et al.*, 2001, la cual se fundamenta en la amplificación de 24 elementos genéticos denominados VNTRs (Anexo 1), que sirven como patrón de caracterización según el número de repeticiones de cada locus. Las condiciones de PCR fueron una denaturación inicial de 15 minutos a 95°C, seguida por 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 59°C y 1 minuto 30 segundos a 72°C, finalmente extensión de 10 minutos a 72°C. Los productos de PCR obtenidos se sometieron a un corrido electroforético en gel de agarosa al 2% durante 3 horas a 120V. El peso molecular de cada VNTR fue determinado a partir de un marcador de peso molecular BioLabs® de 100 pb y 50 pb; el resultado fue expresado como un patrón que representa el alelo para cada locus (Anexo 2). Como control positivo se utilizó la cepa de referencia H37Rv.

5.5.5 Análisis de resultados

Los patrones obtenidos por *Spoligotyping* fueron traducidos a código binario y código octal para la determinación del sublinaje genético y código SIT correspondiente, mediante el uso de la base de datos internacional SpolDB4 del Instituto Pasteur de la Guadalupe (Brudey *et al.*, 2006). Las imágenes de los geles obtenidas de la metodología MIRU-VNTR 24 loci, se analizaron mediante el software Quantity One (Bio-Rad Laboratories, UK), para determinar el peso molecular correspondiente a cada alelo y asignar el correspondiente código. Los resultados de las metodologías combinadas se analizaron a través del software Bionumerics 7.0.

5.5.6 Poder discriminatorio de *Spoligotyping*, MIRU-VNTR 24 loci y *Spoligotyping* + MIRU-VNTR 24 loci

Se determinó el poder discriminatorio de cada uno de las técnicas de genotipificación por separado y combinadas, mediante el índice discriminatorio de Hunter-Ganston (HGDI; por sus siglas en inglés) (Hunter y Gaston, 1988). Para éste cálculo se empleó la siguiente fórmula:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)$$

Dónde:

N: Número total de aislamientos en el estudio.

S: Número de grupos obtenidos.

n_j: Número de aislamientos por grupo.

5.6 Métodos para cumplir el objetivo general y el objetivo específico 2.

Gracias a que el *Spoligotyping* permite diferenciar los miembros del *cMtb* con base en la presencia o ausencia de determinados espaciadores, se realizó un análisis de los datos obtenidos por ésta metodología para determinar la circulación de otros miembros del *cMtb* causantes de TB activa en población indígena (Kamerbeek *et al.*, 1997; Gori *et al.*, 2005).

5.7 Métodos para cumplir el objetivo general y el objetivo específico 3.

Los resultados obtenidos por *Spoligotyping* fueron comparados con los patrones reportados en la base internacional SpolDB4 del Instituto Pasteur de la Guadalupe (Brudey *et al.*, 2006), la base de datos nacional del INS y estudios previos de genotipificación realizados en el país, a fin de determinar la distribución de los genotipos caracterizados.

5.8 Métodos para cumplir el objetivo general y el objetivo específico 4.

A partir de las fichas de notificación de TB que reposan en el INS, se obtuvieron los datos de las variables de interés para el estudio. La información fue tabulada en una base de

datos creada en Excel 2013 y a partir de ésta, se llevó a cabo un análisis descriptivo de las variables epidemiológicas y se calcularon medidas de tendencia central.

5.8.1 Análisis de asociaciones

Se realizó un análisis bivariado y se determinaron las asociaciones entre las variables sociodemográficas y los fenotipos de sensibilidad a fármacos de primera línea, junto con los genotipos obtenidos a partir de la tipificación molecular del locus DR, utilizando la prueba de Chi cuadrado o exacta de Fisher según correspondiera, con un nivel de confianza del 95%, y significancia de 0.05, usando el paquete estadístico Epi Info™ 7.0.

5.9 Consideraciones éticas

Esta investigación se clasificó como investigación sin riesgo, según el artículo 11 de la Resolución 8430 de 1993 emitida por el Ministerio de Salud de Colombia.

De igual forma, se consideró la normatividad para estudios de investigación en salud establecida en la Declaración de Helsinki en 1964, revisada en Tokio en 1975, Venecia 1983, Hong- Kong 1989 y otras revisiones en la 48ª Asamblea General Somerset West, Sudáfrica, en Octubre 1996; y en la 52ª Asamblea General Edimburgo, Escocia, en Octubre del año 2000.

Dado que el INS en ejercicio de sus funciones relacionadas con vigilancia epidemiológica de rutina puede utilizar material de sus biobancos con el fin de obtener información útil para la salud pública de los colombianos, en éste estudio no fue necesario la implementación de consentimientos informados

6. Resultados

6.1 Características sociodemográficas de la población indígena de estudio

En éste estudio fueron analizadas 234 fichas de notificación, remitidas al Grupo de Micobacterias del INS por vigilancia epidemiológica entre los años 2009 a 2014; estas fichas correspondían a 229 personas, categorizadas como población indígena colombiana (5 personas aportaron dos aislamientos de *M. tuberculosis* en tiempos diferentes).

6.1.1 Pueblos indígenas

Se identificaron 41 pueblos indígenas a partir de la información consignada en las fichas de notificación. Los pueblos con mayor representación fueron: Wayúu 13,1% (n=30), Emberá Chamí 11,4% (n=26), Awá 7,9% (n=18), Nasa Páez 6,6 (n=15) y U wa 5,2% (n=12) (Tabla 2).

Tabla 2. Número de personas por pueblos indígenas colombianos identificados en el estudio.

Pueblo Indígena	N° de personas	%	Pueblo Indígena	N° de personas	%
Wayúu	30	13,1	Yukpa	3	1,3
Emberá chamí	26	11,4	Zenú	3	1,3
Awá	18	7,9	Amorúa	2	0,9
Nasa Páez	15	6,7	Hitnu	2	0,9
U wa	12	5,2	Kogui-Malayo-Arhuaco	2	0,9
Arhuaco	8	3,5	Pastos	2	0,9
Motilon Barí	8	3,5	Siona	2	0,9

Tabla 2. (continuación)

Pueblo Indígena	N° de personas	%	Pueblo Indígena	N° de personas	%
Wounaan	8	3,5	Cocama	1	0,4
Emberá Katío	7	3,1	Desano	1	0,4
Tikuna	6	2,6	Ennaka	1	0,4
Guahibo	5	2,2	Guambiano	1	0,4
Nukak Makú	4	1,8	Guanano	1	0,4
Emberá	4	1,8	Kankuamo	1	0,4
Inga	4	1,8	Misak	1	0,4
Sikuani	4	1,8	Mokana	1	0,4
Tucano	4	1,8	Piapoco	1	0,4
Camëntsó	3	1,3	Puinave	1	0,4
Cubeo	3	1,3	Quillacinga	1	0,4
Guayabero	3	1,3	Yagua	1	0,4
Kogui	3	1,3	Yuco	1	0,4
Panare	3	1,3	SD	22	9,6
			Total	229	100

6.1.2 Distribución de población indígena por departamento

La Guajira fue el departamento que presentó mayor número de personas indígenas, según el análisis de las fichas de notificación con un 12,2% (n=28), todos pertenecientes al pueblo indígena Wayúu. Por su parte, regiones como Nariño 10% (n= 23) y Risaralda 8,3% (n=19), estuvieron principalmente representados por los Awá y Emberá Chamí, respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución de los pueblos indígenas colombianos identificados en el estudio por departamento

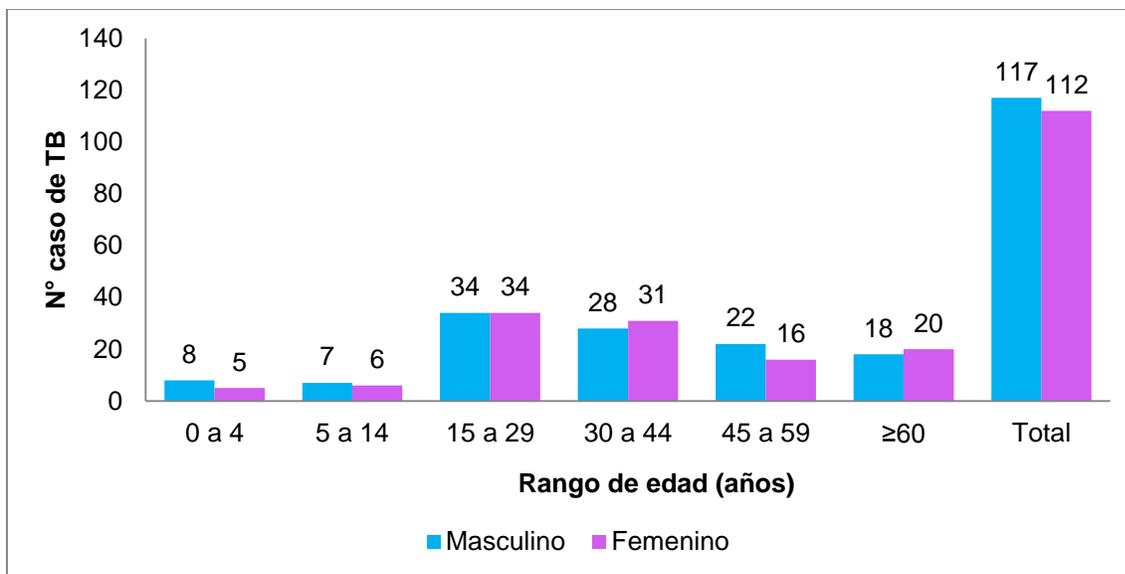
Departamento	Pueblo Indígena	N° de personas	Total	%	Departamento	Pueblo Indígena	N° de personas	Total	%	
Amazonas	SD	5	12	5,2	Huila	Nasa Páez	2	2	0,9	
	Tikuna	5			La Guajira	Wayúu	28	28	12,2	
	Cocama	1			Magdalena	Kogui	3	7	3,1	
	Yagua	1				Kogui-Malayo-Arhuaco	2			
Antioquia	Emberá Katío	1	1	0,4	Arhuaco	1	Meta	9	3,9	
Arauca	Guahibo	2	9	3,9	Ennaka	1				
	Hitnu	2			SD	5				
	SD	2			Sikuani	3				
	Sikuani	1			Nasa Páez	1				
	U wa	1			Nariño	Awá	18	23	10	
Piapoco	1	Pastos	2							
Atlántico	Mokana	1	1	0,4		Inga	1			
Boyacá	U wa	7	7	3,1	Quillacinga	1	Norte de Santander	8	3,5	
Caldas	Emberá chamí	2	3	1,3	SD	1				
	Tikuna	1			Motilon Barí	5				
Casanare	Amorúa	2	2	0,9	U wa	3	Putumayo	8	3,5	
Cauca	Nasa Páez	11	13	5,7	Camëntśá	3				
	Guambiano	1			Inga	2				
	Misak	1			SD	1				
Cesar	Arhuaco	7	16	7	Siona	2	Quindío	5	2,2	
	Wayúu	2			Emberá chamí	5				
	Kankuamo	1			Risaralda	Emberá chamí	17	19	8,3	
	SD	2			SD	2				
	Yuco	1			Santander	Motilon Barí	3	5	2,2	
	Yukpa	3				U wa	1			
Chocó	Emberá	3	6	2,6	Inga	1	Valle del Cauca	12	5,2	
	Emberá chamí	2			Wounaan	8				
	Emberá Katío	1			SD	2				
Córdoba	Emberá Katío	3	6	2,6	Emberá chamí	1	Norte de Santander	8	3,5	
	Zenú	3			Nasa Páez	1				
Cundinamarca	Emberá	1	1	0,4	Vaupés	Cubeo	3	7	3,1	
Guainía	SD	3	4	1,7		Tucano	2			
	Puinave	1				Desano	1			
Guaviare	Nukak Makú	4	12	5,2		Guanano	1			Vichada
	Guayabero	3			Guahibo	3				
	Panare	3			Total	229	229	100		
	Tucano	2								

SD: Sin Dato

6.1.3 Distribución de población indígena por sexo y edad

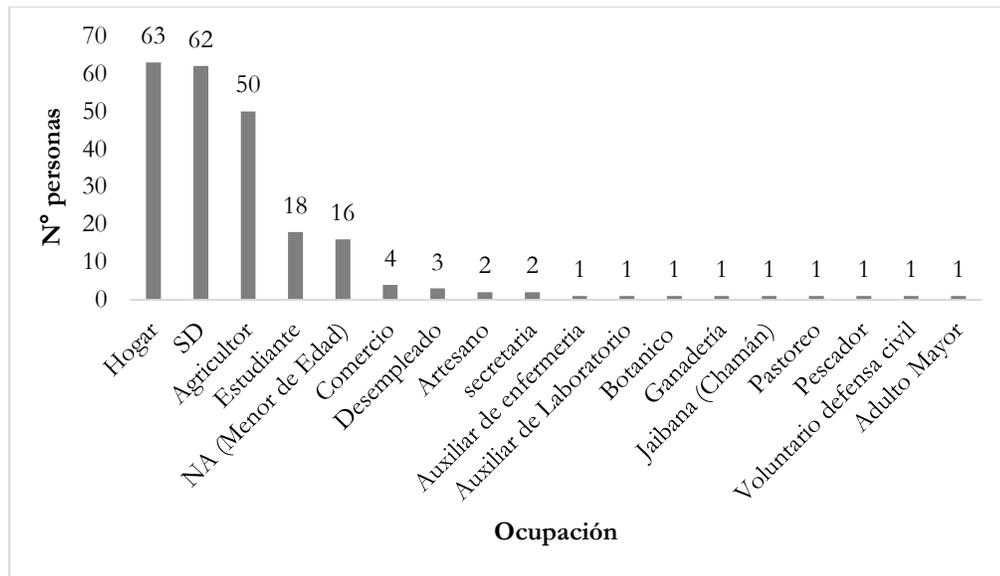
La distribución por sexo reveló que el 51,1% (n=117) de la población indígena identificada en este estudio correspondió al sexo masculino y el 48,9% (n=112) al sexo femenino. El rango de edad estuvo comprendido entre 3 meses a 100 años. De 0 a 4 años se registró el 5,7% (n=13) de los casos, de 5 a 14 años el 5,7% (n=13), de 15 a 29 el 29,7 % (n=68), de 30 a 44 años el 25,8% (n=59), de 45 a 59 años se registró el 16,6% (n=38) y ≥ 60 años 16,6% (n=38).

Gráfica 1. Número de casos de TB distribuidos por sexo y edad.



6.1.4 Perfil ocupacional de la población indígena

El perfil ocupacional de los pueblos indígenas fue identificado a partir de las fichas de notificación, las ocupaciones más frecuentes fueron hogar 27,5% (n=63) y agricultor 21,8% (n=50), otras ocupaciones como artesano, chaman, botánico y ganadero se presentaron en menor frecuencia (Gráfica 2)

Gráfica 2. Perfil ocupacional de la población indígena del estudio.

6.1.5 Condiciones asociadas a padecer TB de la población indígena del estudio

En la tabla 4 se muestran los posibles factores de riesgo y condiciones de vulnerabilidad asociados al desarrollo de TB presentes en la población indígena del estudio

Tabla 4. Distribución de los pueblos indígenas colombianos identificados en el estudio por departamento

Factor de Riesgo	Frecuencia	%	Condición de Vulnerabilidad	Frecuencia	%
Desnutrición*	28	12,2	Escolares	18	7,9
Embarazo	6	2,6	Desplazados	13	5,7
Diabetes	1	0,4	Habitante de calle	1	0,4
VIH positivo**	6	2,6	Población fronteriza	14	6,1
Farmacodependencia	1	0,4			

*2 adicionalmente en embarazo y 1 con EPOC. ** 96 (41,7%) fueron VIH negativo y 127 (55,5%) SD de VIH.

6.2 Características de los casos de TB de la población indígena del estudio

Las 229 personas categorizadas como población indígena colombiana en este estudio fueron casos positivos de TB; la principal forma de presentación clínica fue TB pulmonar 96,9% (n=222), mientras que la TB extrapulmonar tuvo lugar en el 3,1% (n=7) de los casos.

6.2.1 Clasificación de la TB basada en historia previa de tratamiento y desenlace

El 81,7% (n=187) de las personas fueron clasificados como casos nuevos; 6,6% (n=15) correspondió a individuos previamente tratados, 3,5% (n=8) correspondió a recaídas, 0,9% (n=2) a fracasos, 6,1% (n=14) sin dato. Como desenlace del resultado del tratamiento 1,3% (n=3) personas fallecieron.

6.2.2 Muestras clínicas y casos de TB bacteriológicamente confirmados

Las 229 personas de población indígena, aportaron 234 cultivos positivos que fueron recuperados de las siguientes muestras clínicas: esputo 82,1% (n=192), aspirado gástrico 7,7% (n=18), secreción 3% (n=7), biopsia 2,1% (n=5), lavado broncoalveolar 1,7% (n=4), líquido cefalorraquídeo 0,9% (n=2), líquido ascítico, líquido peritoneal y líquido pleural 1,3% (n=3) y 1,3% (n=3) muestras sin dato.

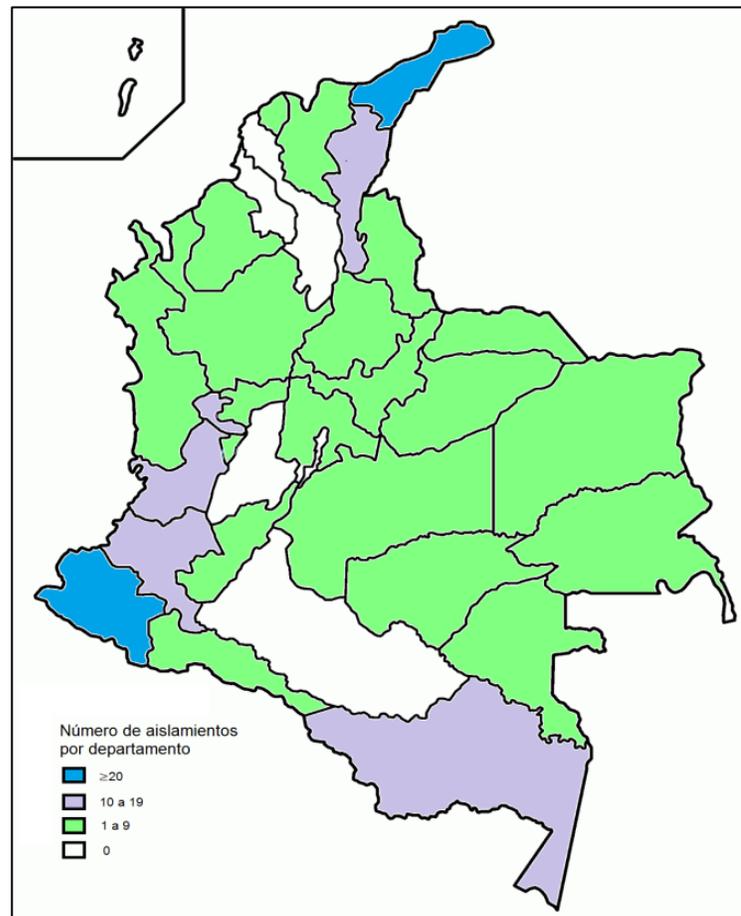
- **BK:** El resultado de la BK fue el siguiente: 26,5% (n=62) BK+, 23,5% (n=55) BK++, 19,2% (n=46) BK+++, dentro del cual el 10,9% (n=5) correspondió a niños escolares (3 a 17 años). Las muestras BK negativo correspondieron a 19,2% (n=45). El 11,1% (n=26) no registraron dato de BK.
- **Cultivo:** Todas las muestras fueron positivas para el cultivo en medio líquido Middlebrook 7H9 en el sistema semi automatizado Bactec MGIT 960 y medio sólido Löwenstein-Jensen. La identificación de *cMtb* fue positiva en todos los casos.

6.3 Características de los aislamientos de *M.tuberculosis* obtenidos de la población indígena del estudio

6.3.1 Distribución geográfica de los aislamientos

27 de los 32 departamentos del territorio nacional aportaron 234 aislamientos de *M. tuberculosis* provenientes de población indígena entre el 2009-2014. Los departamentos con mayor aporte de aislamientos fueron: La Guajira 12,0% (n=28), Nariño 9,8% (n=23) y Risaralda 9% (n=21); los departamentos de Bolívar, Caquetá, San Andrés y Providencia, Sucre y Tolima, no remitieron aislamientos al INS provenientes de población indígena en el periodo analizado (Figura 5).

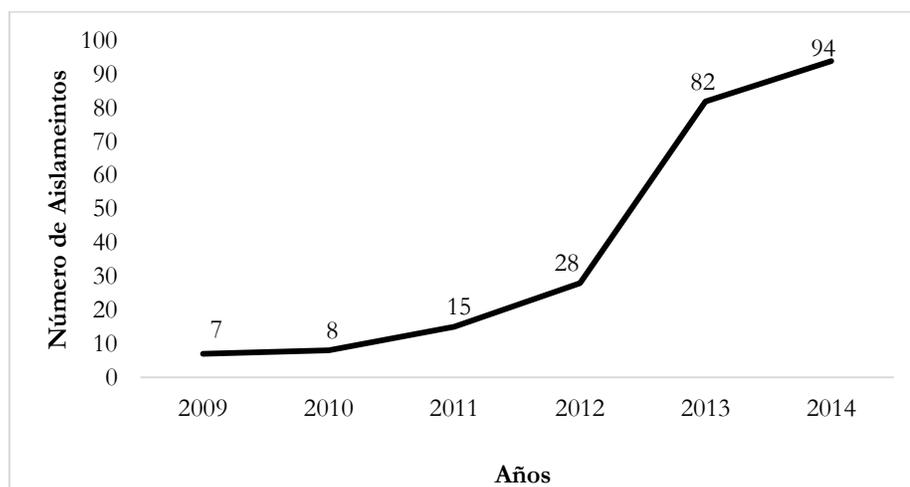
Figura 5-1: Distribución geográfica de los aislamientos analizados.



6.3.2 Aislamientos de *M. tuberculosis* por año

En la gráfica 3 se presenta el número de aislamientos recibidos por año en el INS para el periodo 2009-2014., a través de la vigilancia de las micobacterias.

Gráfica 3. Número de aislamientos de *M. tuberculosis* recibidos en el INS por año.

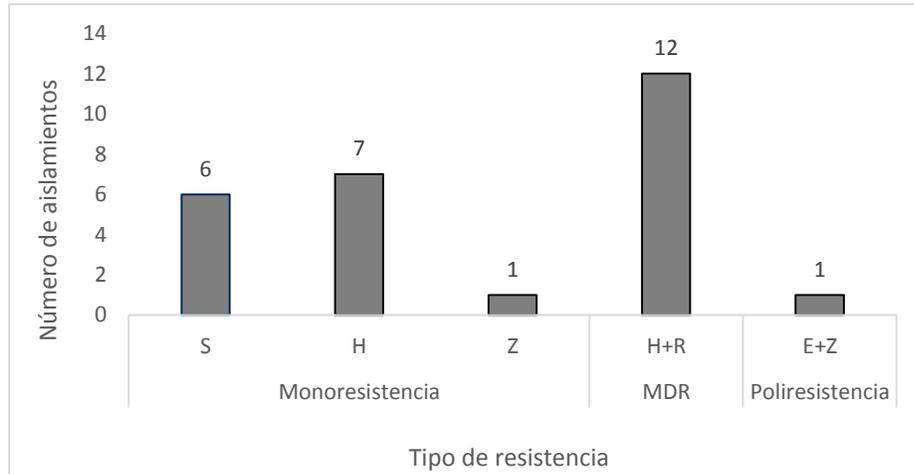


6.3.3 Perfil de sensibilidad a fármacos antituberculosis de primera y segunda línea para el tratamiento

El perfil de farmacoresistencia para los aislamientos recuperados mostró que el 11,5% (n=27) presentó algún tipo de resistencia a fármacos utilizados en el esquema de tratamiento para TB. Los perfiles de resistencia fueron los siguientes: las monoresistencias se presentaron en el 6% (n=14) de los aislamientos discriminadas así: S: 2,6 % (n=6), H: 3% (n=7) y Z: 0,4% (n=1); la poliresistencia a E+Z se presentó en el 0,4% (n=1).

Para el caso de la multiresistencia el 5,1% (n=12) de los aislamientos se clasificaron como MDR. Dentro de éstos aislamientos se presentaron las siguientes resistencias adicionales: Z: 0,4% (n=1), S+Z: 1,71% (n=4) y S+E+Z: 0,4% (n=1). Ningún aislamiento presentó resistencia a fármacos de segunda línea. Los aislamientos que presentaron MDR, provenían de los pueblos indígenas: Emberá Chamí 58,3% (n=7), Emberá 16,7% (n=2), Camëntšá, Awá y Wounaan 8,3% (n=1), cada uno (Gráfica 4).

Gráfica 4. Perfil de sensibilidad de los aislamientos del estudio a fármacos antituberculosis.



MDR: Multirresistente. R: Rifampicina. S: Estreptomicina. E: Etambutol. H: Isoniazida. Z: Pirazinamida.

6.4 Caracterización molecular de los aislamientos de *M. tuberculosis*

6.4.1 Identificación de miembros del *cMtb* por *Spoligotyping*

El 100% (n=234) de los aislamientos incluidos en el estudio fueron identificados como *M. tuberculosis* luego de la tipificación molecular por *Spoligotyping*. No se registró la circulación de otros miembros del *cMtb*.

6.4.2 Sublinajes genéticos identificados por *Spoligotyping*

Fueron identificados 7 sublinajes genéticos. El sublinaje con mayor frecuencia fue Latinoamericana-Mediterránea LAM con 37,2% (n=87), seguida de Harlem H: 15,8% (n=37), T: 8,1% (n=19), U: 3,4% (n=8), S: 2,6% (n=6), X: 2,1% (n=5) y Beijing: 0,9% (n=2); el 29,9% de los aislamientos presentaron patrones huérfanos (n=70).

6.4.3 Genotipos identificados por *Spoligotyping*

Se encontraron 102 genotipos, 47,1% (n=48) previamente descritos en la base de datos SpolDB4 y 52,9%(n=54) genotipos huérfanos. En la tabla 5 se observa la frecuencia de distribución de los genotipos y en el anexo 3 la distribución de patrones huérfanos.

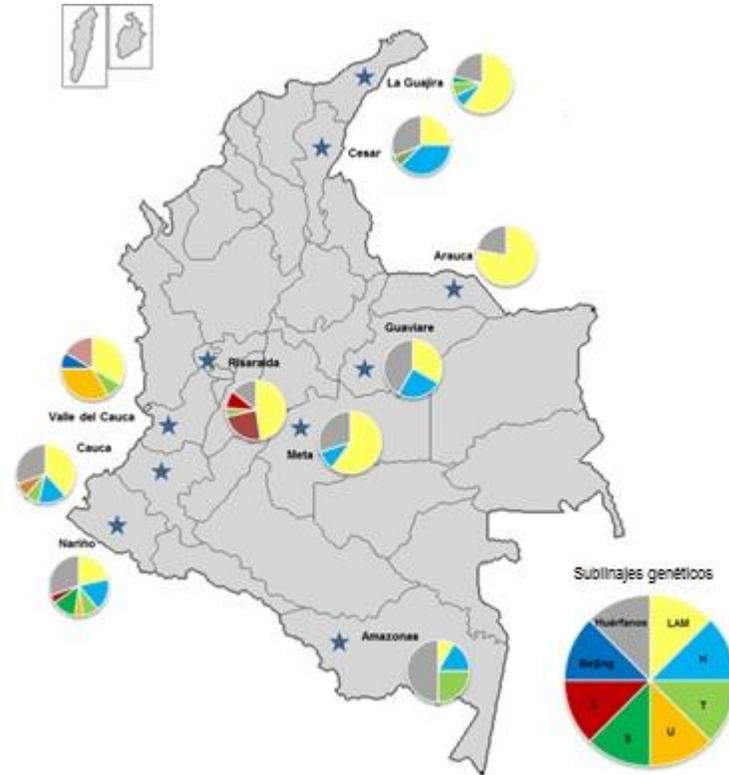
Tabla 5. Distribución de los genotipos encontrados en los aislamientos del estudio, caracterizados por *Spoligotyping*.

Familia	SIT	Frecuencia	%	Familia	SIT	Frecuencia	%
Huérfanos*	NA	70	29,9	Beijing-like	406	1	0,4
LAM9	42	33	14,1	H1	610	1	0,4
LAM2	17	18	7,7	H3	75	1	0,4
Harleem1	62	14	6	H3**	418	1	0,4
Harleem3	50	13	5,6	H3**	615	1	0,4
T1	53	8	3,4	LAM2	172	1	0,4
LAM5	93	7	3	LAM2	1661	1	0,4
U (LAM3?)	106	6	2,6	LAM3	33	1	0,4
LAM4	60	4	1,7	LAM3	130	1	0,4
S	34	4	1,7	LAM6**	1768	1	0,4
T2	118	4	1,7	LAM9	388	1	0,4
LAM2**	1691	3	1,3	LAM9	509	1	0,4
LAM9	162	3	1,28	LAM9**	1074	1	0,4
Harleem1	47	2	0,9	LAM9**	1530	1	0,4
Harleem1	727	2	0,9	S**	1253	1	0,4
Harleem2	2	2	0,9	S**	1938	1	0,4
LAM1	20	2	0,9	T1**	278	1	0,4
LAM2-				T1**	628	1	0,4
LAM4	194	2	0,9	T1 (Tv)**	159	1	0,4
LAM9	150	2	0,9	T2	848	1	0,4
LAM9	1535	2	0,9	T2	1355	1	0,4
LAM9	1933	2	0,9	U	160	1	0,4
T2**	52	2	0,9	U**	1451	1	0,4
X1	217	2	0,9	X2	137	1	0,4
X3	91	2	0,9				
Beijing-like	190	1	0,4	Total		234	100

TV: Tuscany Variant. * Los genotipos huérfanos se describen en el Anexo 3. ** Genotipos que se reportan por primera vez en el país.

En la Figura 6, se observa la distribución de los sublinajes genéticos para los departamentos que aportaron más de 10 aislamientos al estudio.

Figura 6-2: Distribución de los sublinajes genéticos identificadas en el estudio por departamento.



6.4.4 Comparación por *Spoligotyping* de los aislamientos encontrados en el estudio con datos nacionales

Al comparar los genotipos encontrados en presente estudio con la base de datos del Grupo de Micobacterias del INS y con la información descrita en estudios previos de genotipificación realizados en Colombia (tabla 6), se estableció que los genotipos de mayor circulación en la población indígenas de estudio (LAM 9 SIT42, H1 SIT62, H3 SIT50, T1 SIT53, H1 SIT727), son similares a los que se han reportado para diferentes partes del territorio nacional, sin embargo se registra un número importante de patrones huérfanos (tabla 6).

Adicionalmente, el 61,8% de los genotipos descritos en éste estudio (12,8% genotipos reportados por SpolDB4 y 49% genotipos huérfanos) no habían sido reportados en el país, uno de ellos de particular interés es el genotipo Beijing-like SIT 406.

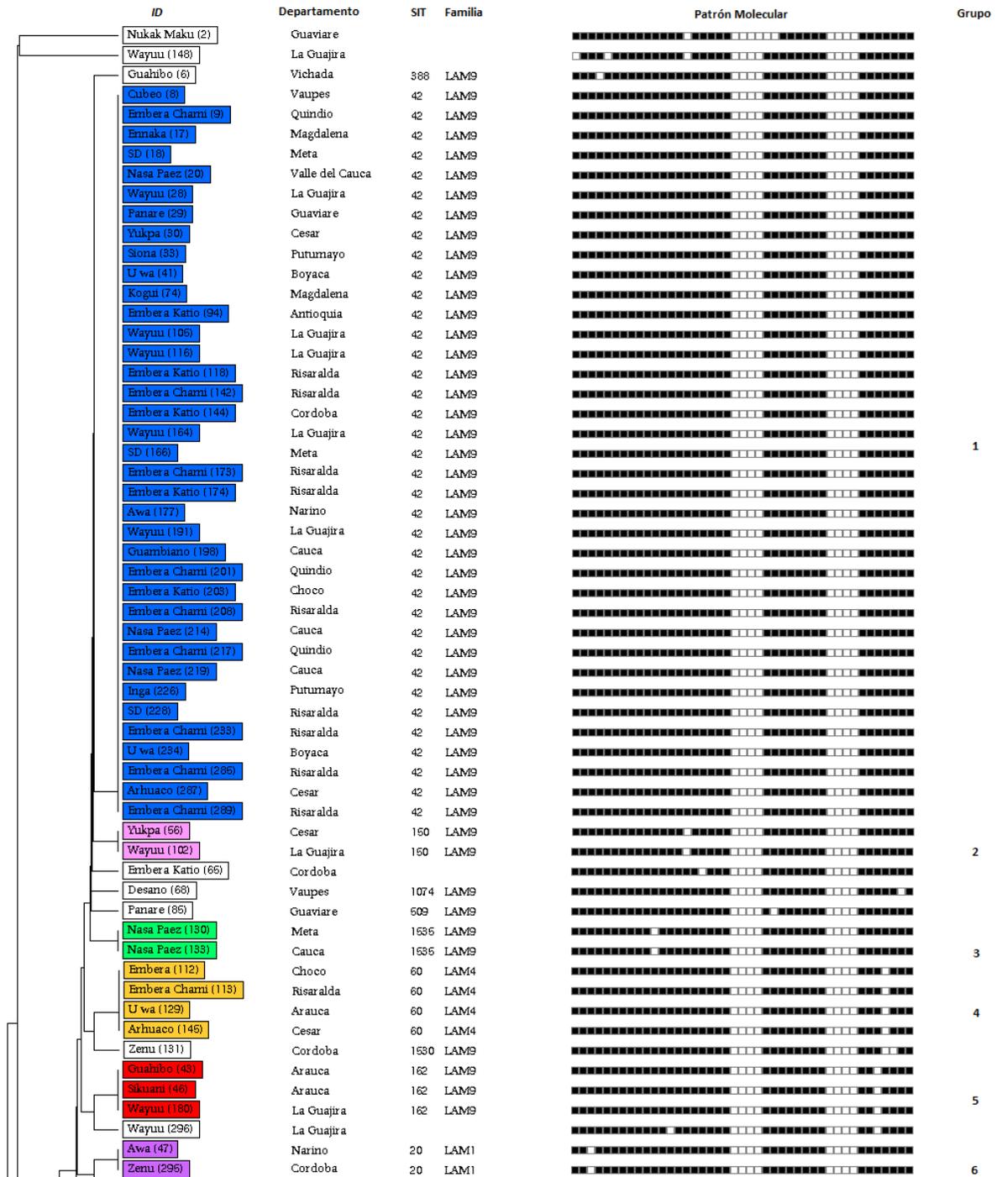
Tabla 6. Estudios nacionales de genotipificación, *Spoligotyping*.

Estudios	Lugar	Años	# aislamientos	Familia	n	%
Rozo 2009	Cali y Cauca	2005 a 2008	117	LAM9	35	29,9
				H1	21	17,9
				TI	16	13,7
Ferro <i>et al.</i> , 2011	Valle del Cauca	2007 a 2008	160	Huérfano	11	9,4
				LAM9	32	20
				H1	32	20
Cerezo <i>et al.</i> , 2012	Bogotá D.C	1995 a 2007	152	Huérfanos	25	15,6
				Beijing	25	15,6
				LAM9 SIT 42	42	27,6
Nieto <i>et al.</i> , 2012	Valle del Cauca	2001 a 2009	10	T1 SIT 53	17	11,2
				H1 SIT 62	13	8,6
				Huérfanos	10	6,6
Realpe <i>et al.</i> , 2014	Medellin, Cali y Popayan	2005 a 2008	414	Beijing SIT 190	1	0,7
				LAM9 SIT 42	124	30
				H1 SIT 62	97	23,4
Puerto <i>et al.</i> , 2015	31 Departamentos	1999 a 2012	741	H3 SIT 50	34	8,2
				Huérfanos	20	4,8
				LAM9 SIT 42	183	29,7
Castro <i>et al.</i> , 2017	9 Departamentos	2012	63	Huérfanos	126	17
				H1 SIT 62	68	9,2
				Beijing SIT 190	23	3,1
				LAM9	20	31,8
				Huérfanos	19	30,6
				H1	8	12,7
				T1	7	11,11

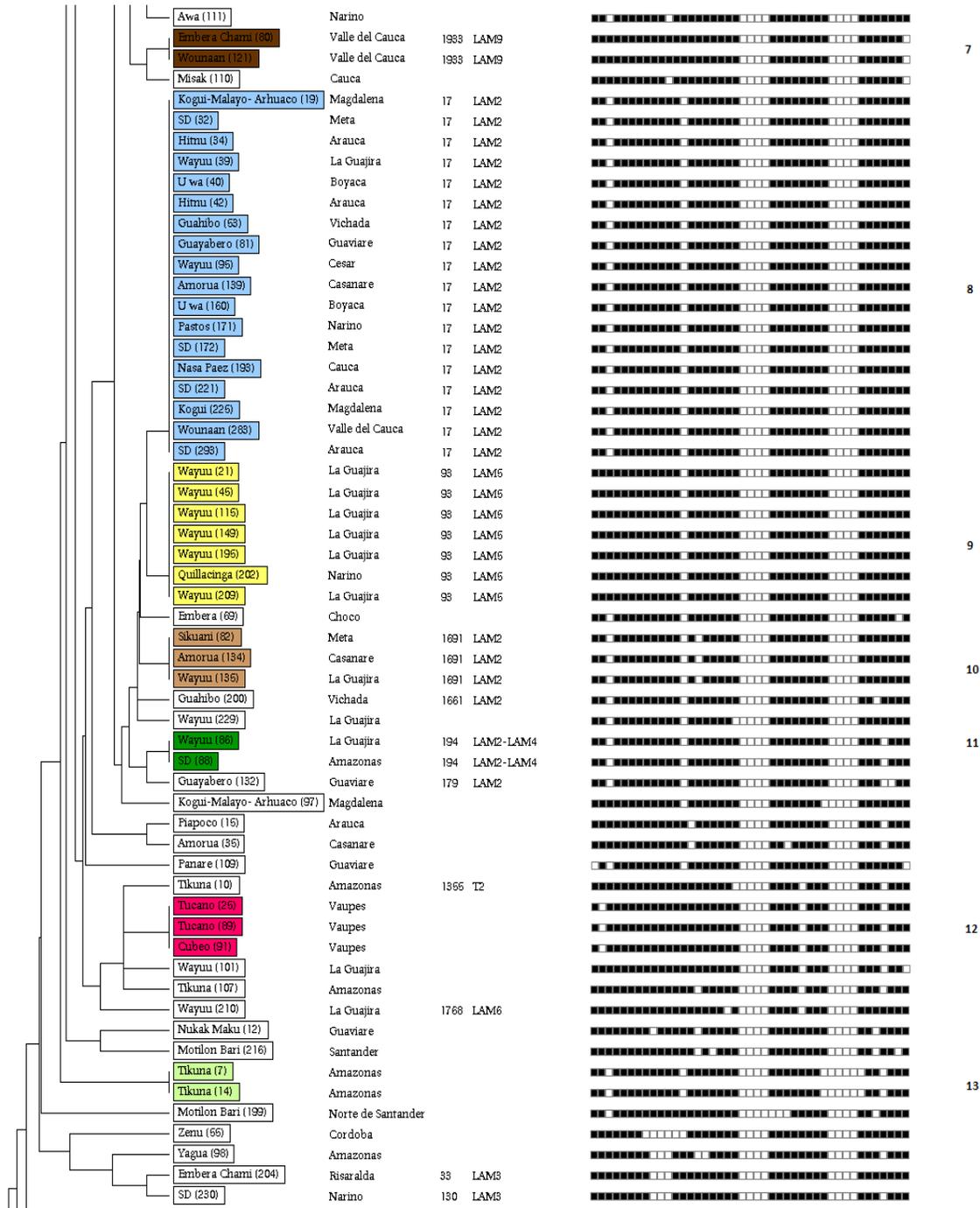
6.4.5 Agrupamientos por *Spoligotyping*

El dendrograma de similitud de la metodología evidenció la presencia de 30 grupos que incluyeron 162 aislamientos. Los grupos estuvieron conformados por 2 - 37 aislamientos; 72 aislamientos no estuvieron agrupados (Gráfica 5).

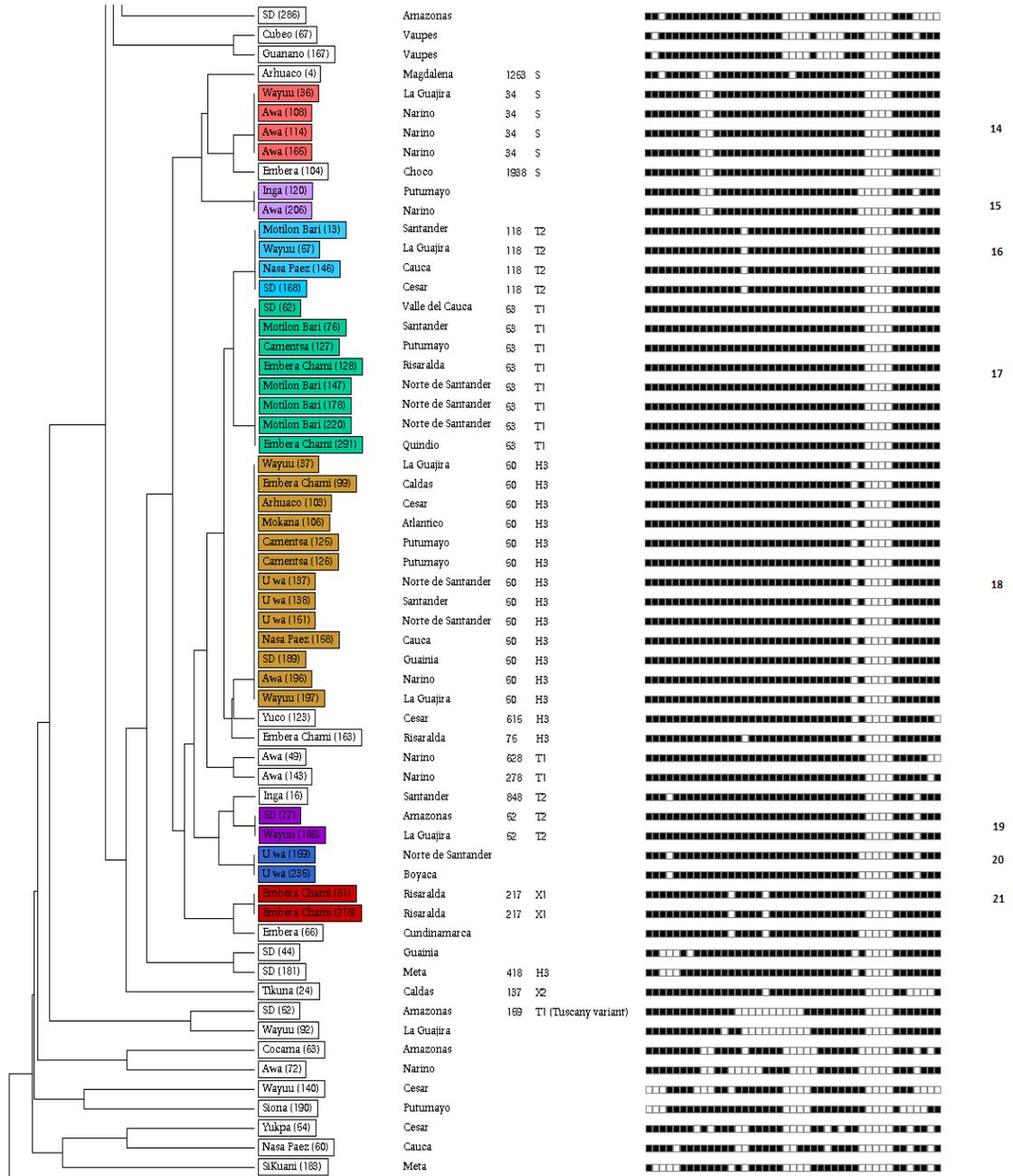
Gráfica 5. Dendrograma generado del estudio de similitud mediante la metodología de *Spoligotyping*.



Gráfica 5. (Continuación).



Gráfica 5. (Continuación).



Los grupos con más de 10 aislamientos fueron:

- **Grupo 1.** Constituido por 37 aislamientos del genotipo LAM9 SIT 42; este grupo incluyó aislados de 13 pueblos indígenas, siendo los que aportaron más de un aislamiento los Wayúu, Emberá Chamí, Emberá katío, Nasa Páez, y U'wa.
- **Grupo 8.** Constituido por 18 aislamientos del genotipo LAM2 SIT 17, este grupo incluyó aislados de 11 pueblos indígenas, siendo los que aportaron más de un aislamiento los Wayúu, Hitnu y U'wa.
- **Grupo 18.** Constituido por 12 aislamientos del genotipo H3 SIT50, obtenidos de los pueblos indígenas U'wa, Camëntšá y Wayúu, que aportaron más de un aislamiento.
- **Grupo 23.** Constituido por 10 aislamientos del genotipo H1 SIT 62, provenientes de los pueblos indígenas Emberá Chamí, Awa y Tucano que aportaron más de un aislamiento

6.4.6 Genotipos encontrados por *Spoligotyping* y sensibilidad a fármacos.

En la tabla 7 se muestran los genotipos descritos en el estudio con el perfil de sensibilidad a fármacos de primera línea.

Tabla 7. Genotipos y patrones de sensibilidad a fármacos de primera línea.

Genotipo	SIT	Total N	MDR		Otra resistencia		Sensible	
			n	%	n	%	n	%
Huérfanos	NA	70	2	0,9	5	2,1	63	26,9
LAM9	42	33	0	0	3	1,3	30	12,8
LAM2	17	18	0	0	0	0	18	7,7
H1	62	14	1	0,4	1	0,4	12	5,1
H3	50	13	0	0	0	0	13	5,6
T1	53	8	1	0,4	0	0	7	3
LAM5	93	7	0	0	0	0	7	3
U (LAM3?)	106	6	0	0	0	0	6	2,6
LAM4	60	4	0	0	0	0	4	1,7
S	34	4	0	0	0	0	4	1,7
T2	118	4	0	0	1	0,4	3	1,3
LAM2	1691	3	0	0	0	0	3	1,3
LAM9	162	3	0	0	0	0	3	1,3
H1	47	2	0	0	0	0	2	0,9

Tabla 7. (Continuación)

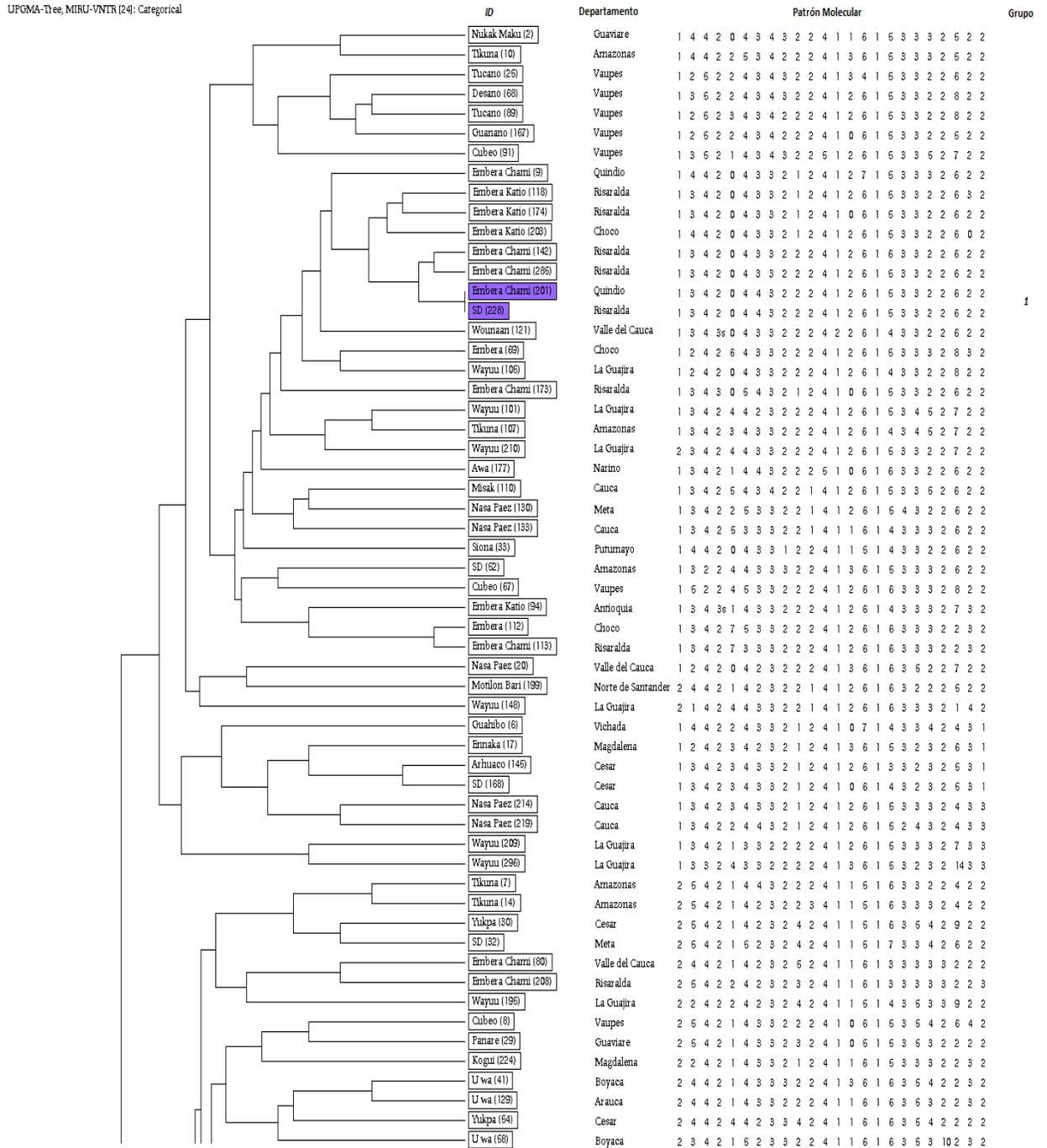
Genotipo	SIT	Total N	MDR		Otra resistencia		Sensible	
			n	%	n	%	n	%
H1	727	2	0	0	0	0	2	0,9
H2	2	2	0	0	0	0	2	0,9
LAM1	20	2	0	0	0	0	2	0,9
LAM2- LAM4	194	2	0	0	0	0	2	0,9
LAM9	150	2	0	0	0	0	2	0,9
LAM9	1535	2	0	0	0	0	2	0,9
LAM9	1933	2	0	0	0	0	2	0,9
T2	52	2	0	0	1	0,4	1	0,4
X1	217	2	2	0,9	0	0	0	0
X3	91	2	0	0	0	0	2	0,9
Beijing- like	190	1	1	0,4	0	0	0	0
Beijing- like	406	1	0	0	0	0	1	0,4
H1	610	1	0	0	0	0	1	0,4
H3	75	1	0	0	0	0	1	0,4
H3	418	1	0	0	0	0	1	0,4
H3	615	1	0	0	0	0	1	0,4
LAM2	172	1	0	0	0	0	1	0,4
LAM2	1661	1	0	0	0	0	1	0,4
LAM3	33	1	0	0	0	0	1	0,4
LAM3	130	1	0	0	0	0	1	0,4
LAM6	1768	1	0	0	0	0	1	0,4
LAM9	388	1	0	0	0	0	1	0,4
LAM9	509	1	0	0	0	0	1	0,4
LAM9	1074	1	0	0	0	0	1	0,4
LAM9	1530	1	0	0	0	0	1	0,4
S	1253	1	0	0	0	0	1	0,4
S	1938	1	0	0	0	0	1	0,4
T1	278	1	0	0	0	0	1	0,4
T1	628	1	0	0	1	0,4	0	0
T1 (Tv)	159	1	0	0	1	0,4	0	0
T2	848	1	0	0	1	0,4	0	0
T2	1355	1	0	0	0	0	1	0,4
U	160	1	1	0,4	0	0	0	0
U	1451	1	0	0	0	0	1	0,4
X2	137	1	0	0	0	0	1	0,4

TV: Tuscany Variant. NA: No Aplica

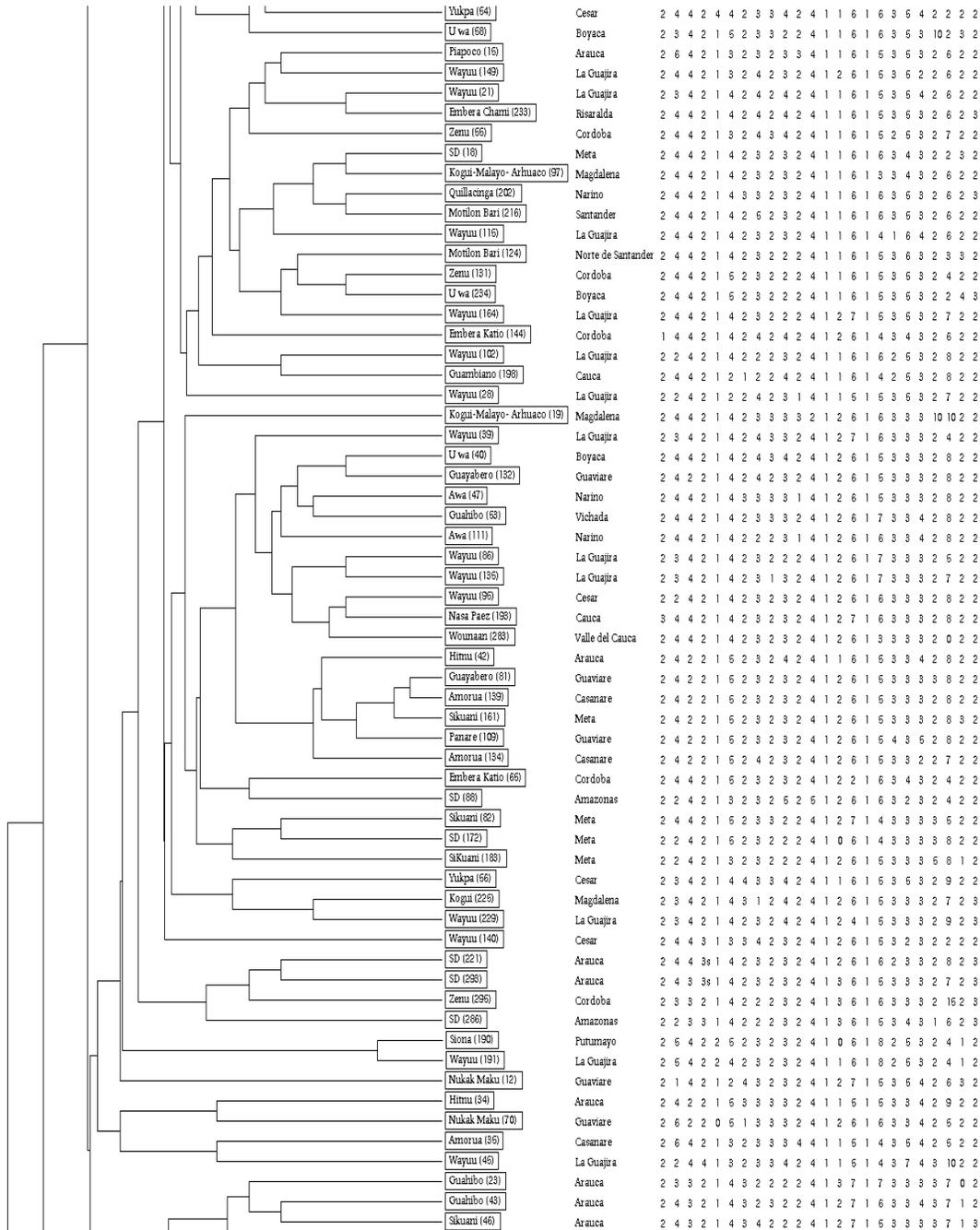
6.4.7 Genotipos y agrupamientos identificados por MIRU-VNTR

Se encontraron 230 genotipos los cuales se distribuyeron en 226 patrones únicos y 4 agrupamientos (cada uno con 2 aislamientos) (Gráfica 6).

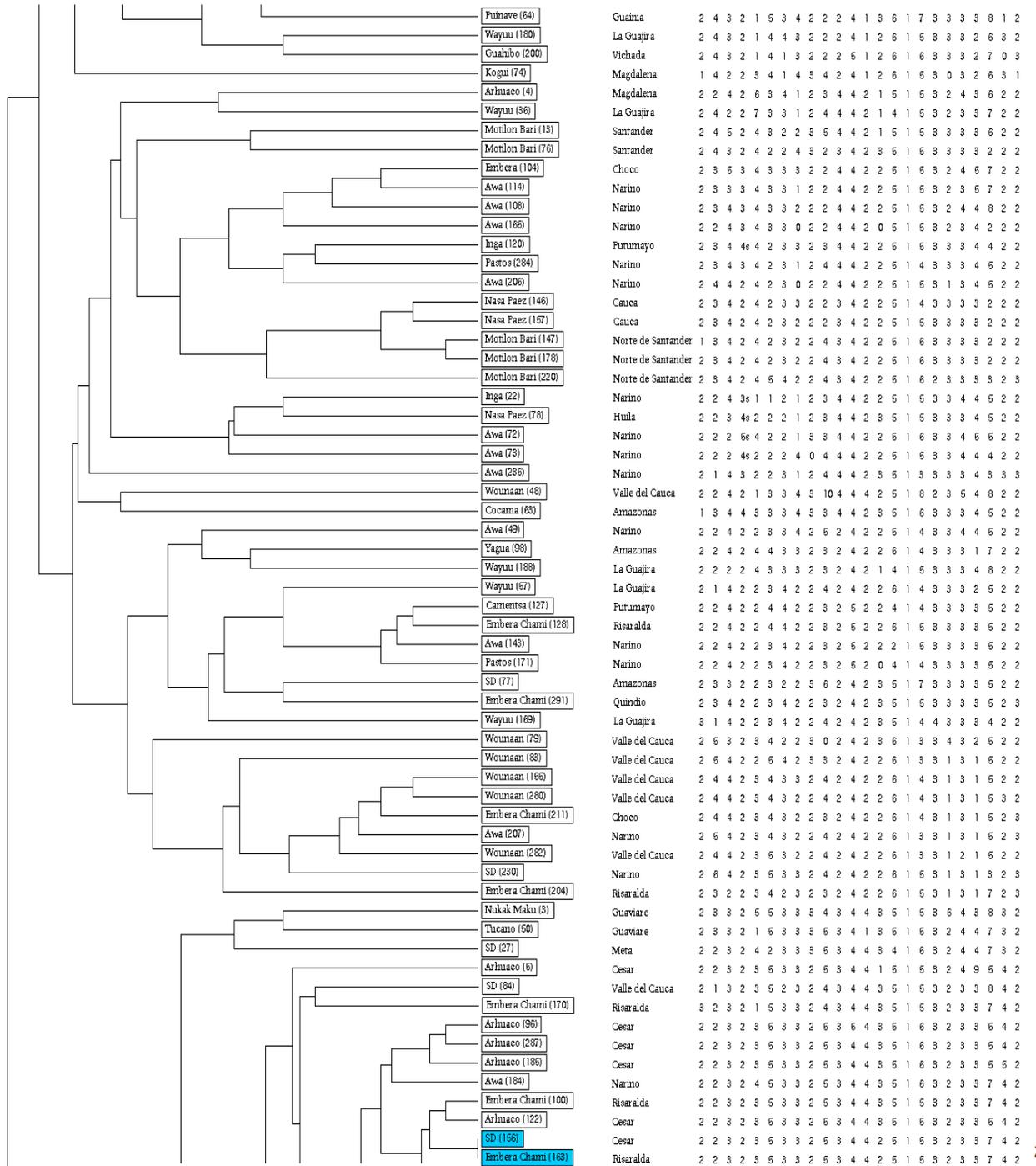
Gráfica 6. Dendrograma generado del estudio de similitud mediante la metodología de MIRU-VNTR 24 loci.



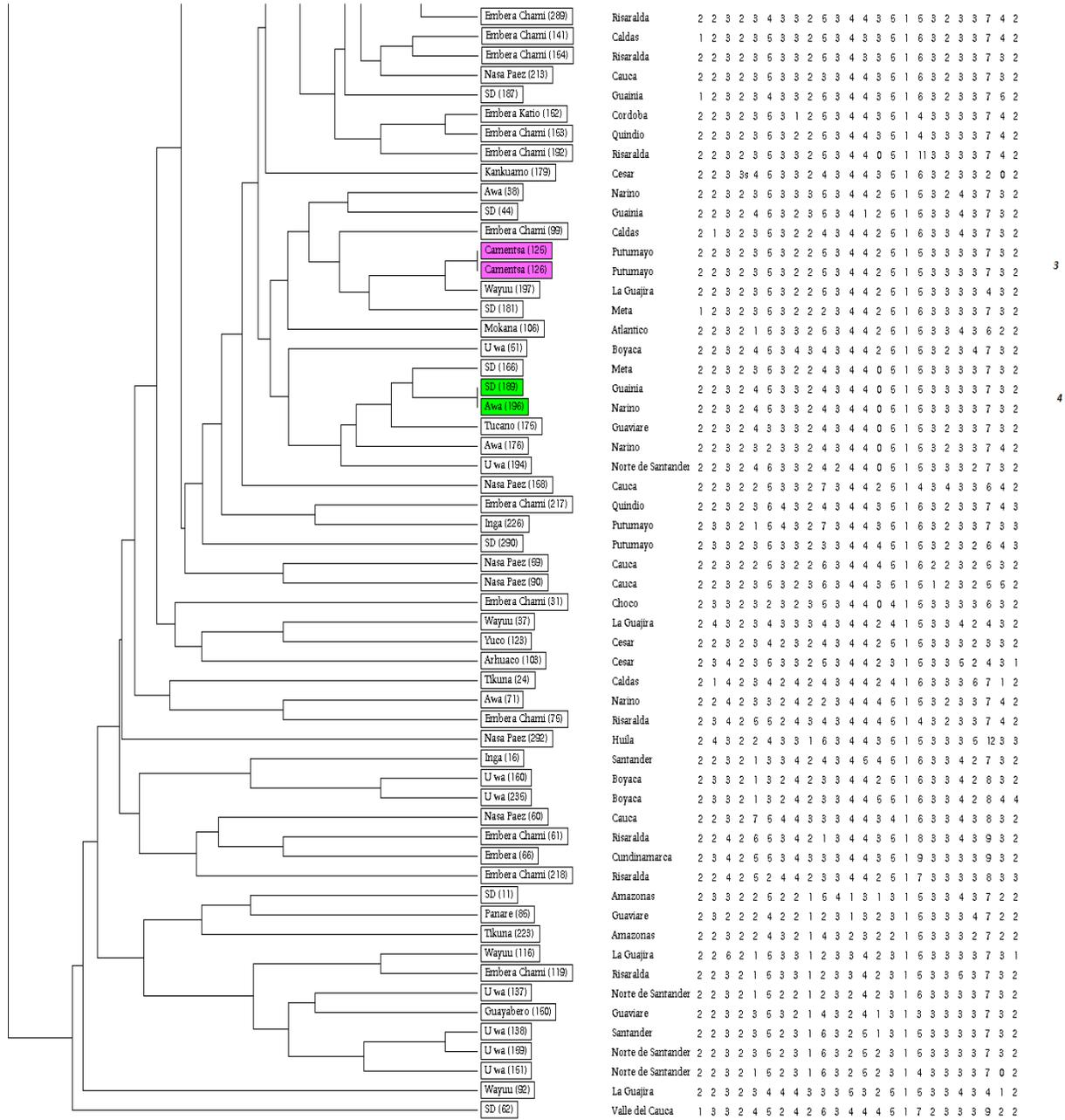
Gráfica 6. (Continuación).



Gráfica 6. (Continuación).



Gráfica 6. (Continuación).



0.1

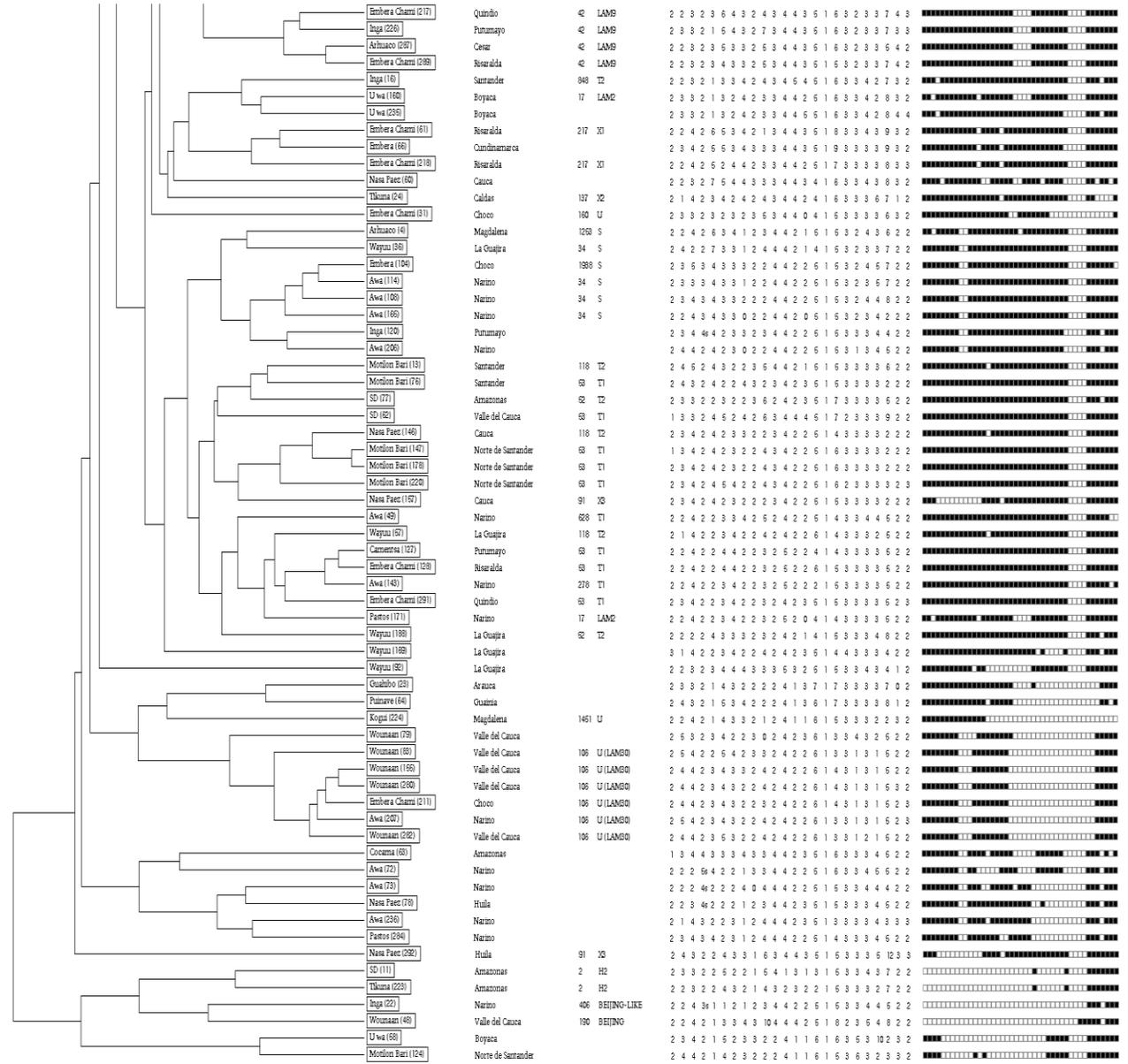
Los grupos obtenidos mediante MIRU-VNTR 24 loci fueron:

- **Grupo 1.** Conformado por dos aislamientos con genotipo 134204432224126153322622 provenientes del pueblo indígena Emberá Chamí (departamento de Quindío) y SD (departamento de Risaralda). Los aislamientos pertenecían a diferentes pacientes.
- **Grupo 2.** Conformado por dos aislamientos con genotipo 223235332534425153233742, proveniente del pueblo indígena Emberá Chamí (departamento de Risaralda) y SD (departamento de Cesar). Los aislamientos pertenecían a diferentes pacientes.
- **Grupo 3.** Conformado por dos aislamientos con genotipo 223235322534425153333732 provenientes del pueblo indígena Camëntšá, resguardo indígena Cofan, departamento del Putumayo. Los aislamientos pertenecían a diferentes pacientes.
- **Grupo 4.** Conformado por dos aislamientos con genotipo 223245332434405153333732, provenientes de los pueblos indígenas Awa (Nariño) y SD (Guainía). Los aislamientos pertenecían a diferentes pacientes.

6.4.8 Caracterización de los aislamientos identificados por la combinación de *Spoligotyping* y MIRU-VNTR 24 loci

Se encontraron 231 genotipos los cuales se distribuyeron en 228 patrones únicos y 3 agrupamientos (cada uno con 2 aislamientos) (Gráfica 7).

Gráfica 7. (Continuación).



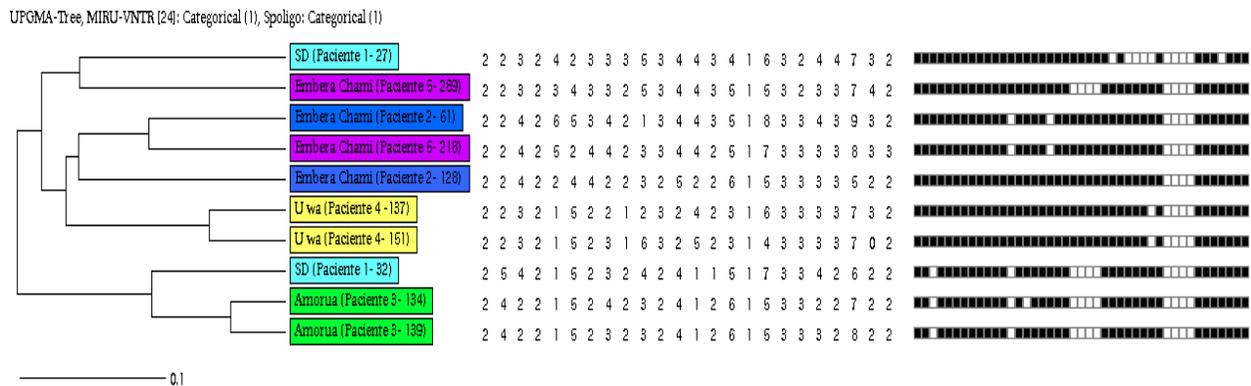
Los agrupamientos obtenidos por *Spoligotyping* y MIRU-VNTR 24 loci fueron:

- **Grupo 1.** Constituido por dos aislamientos de genotipo LAM 9 SIT 42 VNTR 134204432224126153322622, provenientes de los pueblos indígenas Emberá Chamí (departamento Quindío) y SD (departamento Risaralda). Los aislamientos pertenecían a diferentes pacientes.
- **Grupo 2.** Constituido por dos aislamientos de genotipo H3 SIT 50 VNTR 223235322534425153333732, provenientes del pueblo indígena Camëntšá y del mismo resguardo (departamento del Putumayo). Los aislamientos pertenecían a diferentes pacientes.
- **Grupo 3.** Constituido por dos aislamientos de genotipo H3 SIT 50 VNTR 223245332434405153333732, provenientes del pueblo indígena Awa (departamento Nariño) y SD (departamento Guainía). Los aislamientos pertenecían a diferentes pacientes.

6.4.9 Análisis de los aislamientos de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes que aportaron dos muestras en tiempos diferentes

10 aislamientos del estudio, obtenidos de diferentes muestras provenían de 5 pacientes y fueron caracterizados por *Spoligotyping* y MIRU-VNTR 24 loci, encontrando que correspondían a genotipos diferentes (Gráfica 8).

Gráfica 8. Dendrograma generado del estudio de similitud mediante las metodologías de *Spoligotyping* y MIRU-VNTR 24 loci para 10 aislamientos provenientes de 5 pacientes.



A continuación se realizará una descripción de caso para cada uno de los pacientes:

Paciente 1. Niño de 1 año, proveniente del departamento del Meta, registrado en Sivigila como un caso nuevo de TB extrapulmonar en el año 2011. El paciente aportó las siguientes muestras:

1. Muestra de absceso cutáneo: sembrada en el Hospital departamental de Villavicencio el día 02/11/2011, BK (-), de esta se recuperó el aislamiento de *M. tuberculosis* #27 que fue sensible para fármacos anti TB de primera línea. Su genotipo fue por *Spoligotyping* 77777775020731 (patrón huérfano) y MIRU-VNTR 223242333534434163244732.
2. Muestra de jugo gástrico: sembrada en el Hospital departamental de Villavicencio el día 02/11/2011, BK (-), de esta se recuperó el aislamiento de *M. tuberculosis* #32 que fue sensible para fármacos anti TB de primera línea. Su genotipo fue por *Spoligotyping* LAM 2 SIT17 y MIRU-VNTR 254215232424115173342622.

Aislamiento	Patrón <i>Spoligotyping</i>	MIRU 02	VNTR 42-Mtub04	VNTR 43	MIRU 04-ETR-D	MIRU 40	MIRU 10	MIRU 16	VNTR 1955-Mtub21	MIRU 20	VNTR QUB11b	ETR-A	VNTR 46-Mtub29	VNTR 47-Mtub30	VNTR 48-ETRB	MIRU 23	MIRU 24	MIRU 26	MIRU 27	VNTR 49-Mtub34	MIRU 31-ETR-E	VNTR 52-Mtub39	VNTR QUB-26	VNTR 53-Qub4156	MIRU 39
27		2	2 3	2	4 2 3	3	3 5 3	4	4 4 3 4	1	6	3	2	4	4	7	3	2	4	4	7	3	2	2	
32		2	5 4	2	1 5 2	3	2 4 2	4	1 1 5	1	7	3	3	4	2	6	2	2							

Paciente 2. Hombre de 58 años proveniente del departamento de Risaralda, registrado en Sivigila en el año 2013 como caso de TB pulmonar previamente tratado. Recibió tratamiento para TB sensible de diciembre de 2006 a julio de 2007. El paciente aportó las siguientes muestras:

1. Muestra de esputo a: sembrada en el Hospital San Rafael de Pueblo Rico, el día 3/4/2013, BK (+++), de ésta se recuperó el aislamiento de *M. tuberculosis* #61 que fue MDR con resistencia adicional a estreptomina y pirazinamida. Su genotipo fue por *Spoligotyping* X1 SIT217 y MIRU-VNTR 224425173325244000000000.
2. Muestra de esputo b: recibida como control de tratamiento y sembrada en el Hospital San Rafael de Pueblo Rico el día 7/6/2013, BK (-), de ésta se recuperó el aislamiento de *M. tuberculosis* #128, que fue MDR con resistencia adicional a

estreptomicina y pirazinamida. Su genotipo fue por *Spoligotyping* T1 SIT53 y MIRU-VNTR 224224422325226153333522.

Aislamiento	Patrón <i>Spoligotyping</i>	MIRU 02	VNTR 42-Mtub04	VNTR 43	MIRU 04-ETR-D	MIRU 40	MIRU 10	MIRU 16	VNTR 1955-Mtub21	MIRU 20	VNTR QUB11b	ETR-A	VNTR 46-Mtub29	VNTR 47-Mtub30	VNTR 48-ETRB	MIRU 23	MIRU 24	MIRU 26	MIRU 27	VNTR 49-Mtub34	MIRU 31-ETR-E	VNTR 52-Mtub39	VNTR QUB-26	VNTR 53-Qub4156	MIRU 39
61		2	2	4	2	6	5	3	4	2	1	3	4	4	3	5	1	8	3	3	4	3	9	3	2
128		2	2	4	2	2	4	4	2	2	3	2	5	2	2	6	1	5	3	3	3	3	5	2	2

Paciente 3. Niño de 3 años, proveniente del departamento de Casanare, registrado en Sivigila en el año 2013 como caso previamente tratado para de TB pulmonar y extrapulmonar. Recibió tratamiento para TB sensible de noviembre a diciembre de 2012, posteriormente abandono el tratamiento. El paciente aporó las siguientes muestras:

1. Muestra de jugo gástrico a: Sembrada en el Hospital de Yopal el día 03/07/2013, BK (+++); de ésta se recuperó el aislamiento de *M. tuberculosis* #134, su genotipo fue por *Spoligotyping* LAM2 SIT1691 y MIRU-VNTR 242215242324126153322722. A este aislamiento no se realizaron pruebas de sensibilidad por tener un resultado previo de una muestra de absceso epidural remitida al INS el 19/02/2013, con resultado sensible a fármacos anti TB de primera línea.
2. Muestra de Jugo gástrico b: Sembrada en el Hospital de Yopal el día 15/07/2013, BK (++); de esta se recuperó el aislamiento de *M. tuberculosis* #139 que fue sensible a fármacos anti TB de primera línea. Su genotipo fue por *Spoligotyping* LAM2 SIT17 y MIRU-VNTR 242215232324126153332822.

Aislamiento	Patrón <i>Spoligotyping</i>	MIRU 02	VNTR 42-Mtub04	VNTR 43	MIRU 04-ETR-D	MIRU 40	MIRU 10	MIRU 16	VNTR 1955-Mtub21	MIRU 20	VNTR QUB11b	ETR-A	VNTR 46-Mtub29	VNTR 47-Mtub30	VNTR 48-ETRB	MIRU 23	MIRU 24	MIRU 26	MIRU 27	VNTR 49-Mtub34	MIRU 31-ETR-E	VNTR 52-Mtub39	VNTR QUB-26	VNTR 53-Qub4156	MIRU 39
134		2	4	2	2	1	5	2	4	2	3	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	7	2	2
139		2	4	2	2	1	5	2	3	2	3	2	4	1	2	6	1	5	3	3	3	2	8	2	2

Paciente 4. Mujer de 30 años con desnutrición proveniente del departamento de Norte de Santander. Registrada en Sivigila como caso nuevo de TB pulmonar en el año 2013. La paciente aporó las siguientes muestras:

1. Muestra esputo a: Sembrada en el Hospital Pedro Antonio Villamizar del municipio de Toledo, Norte de Santander el día 15/07/2013, BK (++); de ésta se recuperó el aislamiento de *M. tuberculosis* #137 que fue sensible a fármacos anti TB de primera línea. Su genotipo fue por *Spoligotyping* H3 SIT50 y MIRU-VNTR 223215221232423163333732.
2. Muestra esputo b: recibida como control del tratamiento, sembrada en la IPS Sanaré del municipio de Toledo, Norte de Santander el día 10/08/2013, BK (+); de esta se recuperó el aislamiento de *M. tuberculosis* # 151 que fue sensible a fármacos de primera línea. Su genotipo fue por *Spoligotyping* H3 SIT50 y MIRU-VNTR 223215231632523143333702.

Aislamiento	Patrón <i>Spoligotyping</i>	MIRU 02	VNTR 42-Mtub04	VNTR 43	MIRU 04-ETR-D	MIRU 40	MIRU 10	MIRU 16	VNTR 1955-Mtub21	MIRU 20	VNTR QUB11b	ETR-A	VNTR 46-Mtub29	VNTR 47-Mtub30	VNTR 48-ETRB	MIRU 23	MIRU 24	MIRU 26	MIRU 27	VNTR 49-Mtub34	MIRU 31-ETR-E	VNTR 52-Mtub39	VNTR QUB-26	VNTR 53-Qub4156	MIRU 39
137		2	2	3	2	1	5	2	2	1	2	3	2	4	2	3	1	6	3	3	3	3	7	3	2
151		2	2	3	2	1	5	2	3	1	6	3	2	5	2	3	1	4	3	3	3	3	7	0	2

Paciente 5. Mujer de 31 años proveniente de departamento Risaralda. Registrada en Sivigila como caso nuevo de TB pulmonar en el año 2014. La paciente aportó las siguientes muestras:

1. Muestra esputo a: Sembrada en el Hospital San Rafael de Pueblo Rico, Risaralda el día el 12/4/2014 en el Hospital San Rafael con BK (++); de ésta se recuperó el aislamiento de *M. tuberculosis* #218 que fue MDR con resistencia adicional a estreptomycin y pirazinamida, sensible para fármacos de segunda línea. Su genotipo fue por *Spoligotyping* X1 SIT217 y MIRU-VNTR 224252442334425173333833.
2. Muestra esputo b: Sembrada en el Hospital San Rafael de Pueblo Rico, Risaralda el día 02/10/2014, BK (-); de ésta se recuperó el aislamiento de *M. tuberculosis* #289 que fue MDR con resistencia adicional a estreptomycin y sensibilidad a fármacos de segunda línea. Su genotipo fue por *Spoligotyping* LAM9 SIT 42 y MIRU-VNTR 223234332534435153233742.

Aislamiento	Patrón <i>Spoligotyping</i>	Loci																							
		MIRU 02	VNTR 42-Mtub04	VNTR 43	MIRU 04-ETR-D	MIRU 40	MIRU 10	MIRU 16	VNTR 1955-Mtub21	MIRU 20	VNTR QUB11b	ETR-A	VNTR 46-Mtub29	VNTR 47-Mtub30	VNTR 48-ETRB	MIRU 23	MIRU 24	MIRU 26	MIRU 27	VNTR 49-Mtub34	MIRU 31-ETR-E	VNTR 52-Mtub39	VNTR QUB-26	VNTR 53-Qub4156	MIRU 39
218		2	2	4	2	5	2	4	4	2	3	3	4	4	2	5	1	7	3	3	3	3	8	3	3
289		2	2	3	2	3	4	3	3	2	5	3	4	4	3	5	1	5	3	2	3	3	7	4	2

6.5 Poder discriminatorio de *Spoligotyping*, MIRU-VNTR 24 loci y *Spoligotyping* + MIRU-VNTR 24 loci

El poder de discriminación (HGDI) para cada técnica de genotipificación por separado y combinadas, se encuentra en la tabla 8.

Tabla 8. Índice de discriminación HGDI para las técnicas de genotipificación utilizadas en el estudio

Técnica	Total genotipos	Patrones únicos	# grupos	conformación de grupos	# aislamientos agrupados	% de agrupamiento	HGDI
<i>Spoligotyping</i> y MIRU-VNTR 24 loci	231	228	3	2	6	2,6	0,99988
MIRU-VNTR 24 loci	234	230	4	2	8	3,4	0,99985
<i>Spoligotyping</i>	102	72	30	2 a 33	176	75,5	0,9635

6.6 Análisis de asociación de variables

6.6.1 Asociación de sublinajes identificados por *Spoligotyping* y sensibilidad a fármacos de primera línea

El análisis mostró que existe asociación entre el sublinaje T ($p=0,018$) y el sublinaje X ($p=0,022$) para ser resistente a fármacos anti-TB (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis bivariado de sublinajes genéticos identificados por *Spoligotyping* con resistencia a fármacos de primera línea.

Sublinaje	Patrón de sensibilidad				Total	p*
	Resistente		Sensible			
	n	%	n	%		
Huérfanos	7	10	63	90	70	0,111
T	6	31,6	13	68,4	19	0,018
LAM	3	3,5	84	96,6	87	Ref
Haarlem	2	5,4	35	94,6	37	0,634
X	2	40	3	60	5	0,022
Beijing	1	50	1	50	2	0,088
U	1	12,5	7	87,5	8	0,301
S	0	0	6	100	6	1,000

*Prueba de significancia: Fisher exact, Nivel de confianza para las dos pruebas 95%

6.6.2 Asociación de variables sociodemográficas, sublinajes genéticos y agrupamientos por *Spoligotyping*

El análisis bivariado mostró que existe asociación entre personas previamente tratadas ($p=0,011$) y aquellos que han tenido recaída ($p= 0,039$), con no agrupamiento, De igual forma, los genotipos huérfanos ($p=<0,001$) y el sublinaje Beijing ($p=0,014$) se asociaron con el no agrupamiento (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis bivariados de variables sociodemográficas y sublinajes genéticos, con condición de agrupamiento por metodología *spoligotyping*.

Variables		Agrupamiento				total	p*
		Si		No			
		n	%	n	%		
Sexo	Hombre	84	70	36	30	120	Ref
	Mujer	78	68,4	36	31,6	114	0,794**
Edad	0 a 4	11	73,3	4	26,7	15	1,000*
	5 a 14	11	84,6	2	15,4	13	0,514*
	15 a 44	93	72,1	36	27,9	129	Ref
	45 a 59	23	59	16	41	39	0,120**
	≥60	24	63,2	14	36,8	38	0,290**
Tratamiento	Nuevo	140	73,7	50	26,3	190	Ref
	PT	7	43,8	9	56,2	16	0,011**
	Recaída	3	37,5	5	62,5	8	0,039*
	Fracaso	2	66,7	1	33,3	3	1,000*
	Fallecido	2	66,7	1	33,3	3	1,000*
	SD	8	57,1	6	42,9	14	0,181**
MDR	Si	8	66,7	4	33,3	12	1,000*
	No	154	69,4	68	30,6	222	Ref
Sublinajes Genéticos	LAM	78	89,7	9	10,3	87	Ref
	H	33	89,2	4	10,821	37	1,000*
	T	14	73,7	5	26,3	19	0,126**
	U	6	75	2	25	8	0,231*
	S	4	66,7	2	33,3	6	0,147*
	X	4	80	1	20	5	0,445*
	Beijing	0	0	2	100	2	0,014*
	Huérfano S	23	32,9	47	67,1	70	<0,001**

PT: Previamente tratado, SD: Sin dato, *Prueba de significancia: Fisher exact **Prueba de significancia: Chi cuadrado, Nivel de confianza para las dos pruebas 95%

6.6.3 Asociación de variables sociodemográficas y sublinajes genéticos por *Spoligotyping*, con sensibilidad a fármacos de primera línea

El análisis bivariado mostró que existe asociación entre paciente que fracasa ($p=0,005$) y ser MDR, Con respecto a los sublinajes, se encontró que los sublinajes S ($p= 0,010$) y X

($p=0,007$) están asociadas a ser MDR, No se encontró asociación significativa entre pertenecer a algún pueblo indígena y tener MDR (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis bivariados de variables sociodemográficas, sublinajes genéticos identificadas por *Spoligotyping*, con presentar MDR.

Variables		MDR				Total	p*
		Si		No			
		n	%	n	%		
Sexo	Hombre	6	5	114	95	120	Ref
	Mujer	6	5,3	108	94,7	114	0,927**
Edad	0 a 4	1	6,7	14	93,3	15	0,545*
	5 a 14	0	0	13	100	13	1,000*
	15 a 44	6	4,7	123	95,3	129	Ref
	45 a 59	3	7,7	36	92,3	39	0,435**
	≥60	2	5,3	36	94,7	38	1,000**
Tratamiento	Nuevo	7	3,68	183	96,32	190	Ref
	PT	1	6,25	15	93,75	16	0,482*
	Recaída	1	12,5	7	87,5	8	0,285*
	Fracaso	2	66,67	1	33,33	3	0,005*
	Fallecido	1	33,33	2	66,67	3	0,120*
	SD	0	0	14	100	14	1,000*
Sublinajes Genéticos	LAM	1	1,15	86	98,85	87	Ref
	H	1	2,70	36	97,30	37	0,509*
	T	2	10,53	17	89,47	19	0,082*
	U	1	12,5	7	87,5	8	0,162*
	S	2	33,3	4	66,7	6	0,010*
	X	2	40	3	60	5	0,007*
	Beijing	1	50	1	50	2	0,447*
	Huérfanos	2	2,9	68	97,1	70	0,586*
Pueblos indígenas	Emberá	7	25	21	75	28	Ref
	Chamí						
	Emberá	2	50	2	50	4	0,557*
	Awá	1	5,6	17	94,4	18	0,124*
	Camëntśá	1	33,3	2	66,7	3	1,000*
	Wounaan	1	12,5	7	87,5	8	0,651*

PT: Previamente tratado, SD: Sin dato, *Prueba de significancia: Fisher exact **Prueba de significancia: Chi cuadrado, Nivel de confianza para las dos pruebas 95%

6.6.4 Asociación entre poblaciones indígenas con sublinajes genéticos por *Spoligotyping*

El análisis bivariado mostró que existe asociación entre los aislamientos de los pueblos indígenas Arhuaco ($p=0,012$) y Camëntśá ($p=0,033$) con pertenecer al sublinaje H, los aislamientos del pueblo indígena Wounaan ($p=0,014$) mostraron asociación con sublinaje

U y en el pueblo Motilon Barí ($p=0,002$) mostrarón asociación con el sublinaje T. Los aislamientos de los pueblos Awá ($p=0,001$) y Arhuaco ($p=0,042$) no se asociaron a pertenecer al sublinaje LAM. En el anexo 4 se observan los valores de asociación calculados para los demás pueblos indígenas y las respectivos sublinajes genéticos.

7. Discusión

Los pueblos indígenas hacen parte de los grupos vulnerables definidos por la OMS y por el Programa Nacional de Control de Tuberculosis y Lepra en Colombia, estos constituyen una de las poblaciones con mayores tasas de morbi-mortalidad asociada a TB (OPS, 2007). Según Cardona *et al.*, 2013, algunos de los factores asociados a ésta vulnerabilidad implican características inherentes propias de éstas poblaciones tales como su condición nómada y su asentamiento en zonas rurales que dificultan el acceso oportuno a los servicios médicos, así como la poca adherencia al tratamiento antituberculosis observado en estos grupos poblacionales.

El número de casos de TB registrados en éste estudio, represento el 5,6% del total de los casos de TB reportados al Sivegila en población indígena de Colombia, durante los años 2009 a 2014 (n= 4.205) (INS, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014); esto debido principalmente a que la TB en Colombia se diagnostica por BK; (89,5% de los casos de TB para el año 2015) (INS, 2015) y no por cultivo, que es a partir del cual se recuperan aislamientos clínicos para la caracterización de sensibilidad a fármacos y epidemiología molecular.

A pesar que durante el periodo de estudio analizado se observó un incremento progresivo de más de 13,4 veces el número de cultivos remitidos al INS del año 2009 a 2014 (2009 n=7 y 2014 n=94) provenientes de comunidades indígenas; posiblemente debido a la implementación progresiva de la circular 058 del 2009 (Colombia, 2009) y posterior publicación del Plan Estratégico “Colombia Libre de Tuberculosis 2010–2015” (Min. Protección social, 2009), que estableció acciones contra la TB en pueblos indígenas; en este caso a todas las personas SR pertenecientes a pueblos indígenas se les debe realizar cultivo y pruebas de sensibilidad a fármacos.

Por otra parte, según el último censo nacional realizado por el DANE en 2005, los departamentos de Vaupés, Guainía y La Guajira, concentraban el mayor número de población indígena en todo el país (DANE, 2007); motivo por el cual éstas zonas podrían concentrar gran parte de la carga de TB en ésta población. En el presente estudio, los departamentos de Vaupés y Guainía aportaron bajo número de casos de TB, mientras que se presentaron mayor número de casos en los departamentos de La Guajira, Nariño y Risaralda. Esta información pone de manifiesto la necesidad de fortalecer los programas de control de TB en los departamentos de Vaupés y Guainía, que en los últimos años solo han reportado al sistema de vigilancia entre 9 y 19 casos de TB al año, lo que representa el 0,2% de los casos totales para Colombia, siendo estos departamentos habitados principalmente por población indígena vulnerable y con un NBI entre 55% y 61% (DANE, 2007). De la misma forma es necesario fortalecer los programas de TB en La Guajira, Nariño y Risaralda, que aunque reportan un mayor número de casos no reflejan la verdadera magnitud del problema, teniendo en cuenta las características de su población y las estimaciones para Colombia de la OMS que proyectan una falta de diagnóstico en 3000 casos por año (WHO, 2015).

Con respecto a los casos de TB discriminados por pueblos indígenas, el mayor número de casos se presentó en el pueblo Wayúu; éste pueblo indígena se encuentra ubicado en la península de La Guajira con desplazamientos hacia Venezuela; se considera que las condiciones geográficas propias de ésta zona del país favorecen posiblemente la presencia de casos de TB; por ejemplo, los Wayúu carecen de un sistema continuo de agua potable y el suministro se hace por molinos que funcionan irregularmente, fenómeno que podría contribuir a la aparición de condiciones asociadas al desarrollo de la TB como la desnutrición (Herrera *et al.*, 2005; Avendaño, 2008). A pesar de que en éste pueblo aún están vigentes tradiciones ancestrales para controlar la enfermedad, se han dado cambios culturales y los pacientes con TB son aceptados, lo que supone no solamente la desestigmatización de la enfermedad, sino que adicionalmente pone de manifiesto una oportunidad para la búsqueda de casos activos por parte de los entes territoriales (Díaz, 2014).

El segundo pueblo indígena con mayor número de casos de TB fue el Emberá Chamí, localizado principalmente en el eje cafetero colombiano, esto posiblemente se deba a las creencias culturales arraigadas, descritas previamente para este pueblo indígena

(Hernández *et al.*, 2013), en donde dependiendo del origen de la enfermedad, los jefes de la tribu asignan el tratamiento cuando consideran que la enfermedad es de origen espiritual, se opta por la medicina tradicional guiada por chamanes; por el contrario, cuando consideran que la enfermedad es producida por la transmisión de personas ajenas al pueblo indígena denominados colonos, se acude a la medicina moderna. Algunas de las razones por las que los pueblos indígenas instauran un tratamiento con medicina tradicional para curar la TB, es la creencia de que la causa de la enfermedad tiene un origen espiritual, que afecta la mente y el cuerpo del individuo (Osso: Tos; Jai: Espíritu), causando diferentes síntomas como fiebre, diarrea, tos, dolor, lesiones dérmicas y desórdenes mentales que según sus tradiciones se encuentran asociados a la brujería, situaciones que no permiten la instauración del tratamiento convencional y perpetúan la cadena de trasmisión.

El tercer pueblo indígena con mayor número de casos de TB fue Awá; según la OPS, ellos son considerados como una de las poblaciones más vulnerables junto con los Ticuna del Amazonas, debido a sus condiciones socio-culturales (OPS, 2007). En este estudio los Ticuna aportaron el 2,6% de los casos de TB.

El pueblo Awá es amerindio y habita en la frontera Colombo-Ecuatoriana y sus principales asentamientos son registrados en Ricaurte, Tumaco y Barbacoas, en el departamento de Nariño. A pesar del poco conocimiento que se tiene sobre las tradiciones de éste pueblo que pudieran dar explicación al importante número de casos de TB registrados, diferentes condiciones como las fumigaciones con glifosato así como la invasión de tierras, sumado a la presencia de grupos armados ilegales, han derivado en pobreza, escasez de alimentos de origen animal, poca fertilidad de los suelos, afectando no solo la producción agrícola para alimentación, sino a su vez, la cosecha de plantas utilizadas en medicina tradicional, impactando el estado de salud de estos indígenas y lo que podría favorecer la aparición de enfermedades como la TB (Herrera *et al.*, 2005; Bisbicús *et al.*, 2010; PNUD, 2012).

El cuarto pueblo con mayor número de casos de TB fue el Nasa Paéz. Los Nasa Paéz son un pueblo agrícola, caracterizado por policultivo en pequeña escala y su economía se centra en el autoconsumo; se considera el segundo en Colombia en cuanto a tamaño de población, con resguardos en los departamentos del Huila, Tolima y en su gran

mayoría en el Cauca (DANE, 2007); no obstante, la presencia de grupos armados al margen de la ley en territorio Nasa ha generado el desplazamiento forzoso en los últimos años (Min. Cultura, 2010; Observatorio de Derechos Humanos y DIH, 2010). Sumado a lo anterior y a las características geográficas de los territorios ocupados por los Nasa (ceranos a yacimientos de agua, áreas de reservas forestales y páramos), hacen que solo el 12% de los territorios de los resguardos sean aptos para la producción pecuaria y agraria (Min. Cultura, 2010; Observatorio de Derechos Humanos y DIH, 2010); razón por la cual la calidad alimenticia pudiera verse afectada, reflejando los altos niveles de desnutrición y TB presentes en éste pueblo (Min. Cultura, 2010).

El quinto pueblo indígena más afectado por TB fue el U wa, la mayoría de los casos se presentaron en mujeres (92%). Los grupos alimenticios que se consumen en éste pueblo indígena son hortalizas (95,4%), frutas (94,7%), lácteos (14,6%) y granos (10,5%), con un promedio de dos comidas al día. Adicionalmente, en cuanto a consumo de alcohol y sustancias psicoactivas, el 47% las mujeres se embriagan y generalmente consumen chicha y coca (Mora *et al.*, 2007) lo que podría debilitar su sistema inmune así como su estado nutricional permitiendo el desarrollo de la enfermedad.

En Colombia la población indígena vive en difíciles condiciones sociales, el 63% vive bajo la línea de pobreza, el 47,6% no tiene los ingresos para adquirir alimentos con nutrientes mínimos diarios, adicionalmente, el 34,5% no tiene acceso a la salud (INDEPAZ, 2009); factores que favorecen la aparición, el establecimiento y la reactivación de enfermedades como la TB.

Con respecto al sexo de los pacientes con TB en los pueblos indígenas del estudio, se encontró que el número de casos fue similar en mujeres y hombres, contrastando con los reportes mundiales que tradicionalmente a través de los años han presentado a los hombres como mayormente afectados por la TB (WHO, 2013; WHO, 2014; WHO, 2015); por ejemplo, para el año 2014 el 66,3% de las personas afectadas por TB fueron hombres y el 33,3% mujeres. El alto número de casos de TB registrados en mujeres indígenas puede estar relacionado con deficiencias en el tratamiento de los casos índice, así como a factores sociales tales como el machismo donde el hombre indígena decide si la mujer debe acudir o no a centros de salud cuando se encuentra enferma (Sieder y Sierra, 2011), y el bajo grado de escolaridad que no les permite participar en la toma de

decisiones, dificultando el acceso a un diagnóstico y atención oportuna (Oshi *et al.*, 2016). Esta situación debe poner en alerta al sistema de salud para reforzar los programas de prevención, diagnóstico, seguimiento y control en las familias y así evitar la transmisión principalmente a hijos menores de edad de madres afectadas por la enfermedad.

Con respecto a la edad, el grupo de mayor afectación por TB estuvo comprendido entre 15 a 29 años, siendo los extremos de la vida las etapas en la cual se registraron menos casos; situación coincidente con los estudios previos realizados por Culqui *et al.*, 2010, quienes estudiaron la TB en pueblos indígenas de Perú y reportaron que el 78,6% de los casos presentes en ésta población correspondían a personas en edad productiva (adolescentes y adultos), 2,5% a niños e infantes y 7% a adultos mayores. Lo anterior puede deberse al desplazamiento que deben realizar miembros de pueblos indígenas en edad productiva por alimento o recursos, conllevando al contacto con personas no indígenas y por ende, con diversos tipos de enfermedades (Unicef, 2009).

En relación a los BK, se observó que el 42,7% de éstas tuvieron resultados $\geq ++$, lo que indica un diagnóstico tardío de la TB; esto podría deberse al difícil acceso a los resguardos indígenas, por la falta de transporte, la distancia hasta el casco urbano, lo cual dificulta el desplazamiento tanto de personas indígenas enfermas a centros de salud, como de brigadas de salud a los resguardos y especialmente a la dispersión de las comunidades (Herrera *et al.*, 2005), permitiendo así el desarrollo natural de la enfermedad y la multiplicación del bacilo. Estudios realizados por Ribeiro *et al.* 2014 y Gaviria *et al.*, 2010 relacionan el diagnóstico tardío de la TB con el estigma social provocado por la enfermedad y con el insuficiente conocimiento de ésta por parte de los profesionales de la salud para identificar a tiempo SR (Ribeiro *et al.*, 2014; Gaviria *et al.*, 2010). Por otra parte un estudio realizado por Rodríguez *et al.*, 2016 en 8 de las principales ciudades de Colombia, reveló que en ellas se presentó un diagnóstico tardío de la TB, con un retraso en más de 30 días entre la aparición de los síntomas y el comienzo del tratamiento.

En cuanto a las Bk positivas provenientes de niños menores de 15 años, éstas reflejaron pacientes multibacilares, lo que genera una alerta por ser un foco importante de diseminación de la TB en ambientes escolares; contrario a esto, la mayoría de casos de

TB por lo general en etapas infantiles son determinados como BK negativos (Gava *et al.*, 2013). Estudios epidemiológicos han descrito que los menores de 15 años provenientes de pueblos indígenas tienen incidencias mayores en comparación con población no indígena por factores culturales previamente mencionados, así como por el consumo de dietas bajas en contenido proteico que favorece la desnutrición (Rumiche *et al.*, 2003; De Pinho *et al.*, 2012).

Por otra parte, este estudio evidenció que existen problemas para resolver los casos de TB en población indígena, debido a que 11% de los casos corresponden a episodios de TB previamente tratados; esto puede deberse al abandono del tratamiento por diferentes condiciones como falta de recursos para desplazarse y de manutención para asistir diariamente al centro de salud que provee el tratamiento, así como largas distancias de los resguardos que hacen que los indígenas tengan que abandonar su comunidad por los 6 meses de tratamiento, situación que está en contra de sus tradiciones culturales referidas a no alejarse de sus familias por periodos de tiempo prolongados, dificultando la adherencia y finalización del tratamiento (Hernández *et al.*, 2013).

Un estudio realizado en pueblos indígenas de Colombia, reportó altos porcentajes de abandono al tratamiento antituberculoso, como el caso del departamento de Amazonas, en donde se registró un porcentaje promedio de abandono de 12,8% entre los años 2001 a 2005 con históricos anteriores al 2001 hasta del 30%; adicionalmente el mismo estudio recopiló testimonios donde se exponen algunas de las causas de abandono al tratamiento antituberculosis por parte de los indígenas; textualmente se presentan los siguientes apartes (OPS, 2007):

“en ciertas zonas de la Sierra Nevada de Santa Marta el promotor bilingüe fue teniendo acceso al paciente y era posible verificar la administración del medicamento; en otros casos las distancias entre la vivienda y el puesto de salud generó el abandono del tratamiento por parte de algunos de los pacientes, otras veces las autoridades espirituales (Mamos-Tiyiwatpu) autorizaban suspender la toma del medicamento para iniciar el trabajo tradicional”.

Este estudio también evidencio factores de riesgo presentes en la población indígena que pueden afectar la adherencia al tratamiento como desnutrición, diabetes, y farmacodependencias, coincidente con lo expuesto por Medel *et al.*, 2016.

En cuanto a los aislamientos MDR, en el periodo de estudio (2009 a 2014) se presentaron en el 5,1% de los casos; la incidencia mundial anual según la OMS es del 3,3% (WHO; 2015c); aunque no es posible la comparación de los datos del periodo de estudio con las proporciones mundiales de MDR, se debe indicar que cualquier número de casos de TB MDR es indicador de fallas en el tratamiento, transmisión de cepas con resistencia primaria, falta de adherencia de los pacientes, falta de seguimiento a los casos y en general orienta hacia la implementación de acciones programáticas que permitan controlar la TB resistente a fármacos, teniendo en cuenta que el tratamiento para aislamientos sensibles es menos toxico y más efectivo comparado con los esquemas de tratamiento antituberculosis de segunda línea disponibles para Colombia.

La TB-MDR puede ser adquirida mediante 1) infección primaria, es decir la infección con una cepa de *M. tuberculosis* que presenta resistencia a H y R, 2) resistencia adquirida, definida como la infección con una cepa de *M. tuberculosis* que es sensible a fármacos de primera línea, pero con el tiempo adquiere resistencia gracias a factores como la administración de bajas concentraciones de fármacos, terapia intermitente, monoterapia, tratamiento inadecuado o incompleto (Amukoye, 2008). Para el caso del presente estudio, 7 de los aislamientos MDR corresponden a pacientes nuevos (infección primaria) y 4 aislamientos a pacientes previamente tratados, caso contrario fue informado por Culqui *et al.*, 2010 para el año 2008 en una muestra de 702 indígenas en Perú, donde identificaron 9 casos de TB-MDR (1,3%) de los cuales 6, pertenecían a pacientes previamente tratados y 3 a pacientes nuevos.

Dado que el control de la TB, así como su erradicación están estrechamente ligados al entendimiento de la enfermedad, es necesario conocer los aspectos sociales, culturales, económicos y biológicos que contribuyen a la persistencia del bacilo en la comunidad. En este escenario, la epidemiología molecular se ha posicionado como una herramienta útil para el estudio de la dinámica de transmisión de la enfermedad, gracias a la implementación de técnicas como el *Spoligotyping* y MIRU-VNTR 24 loci (Dorronsoro y Torroba, 2007).

En este estudio se encontró que los sublinajes genéticos por *Spoligotyping* más frecuentes en pueblos indígenas en su orden fueron LAM, Haarlem y T, lo que concuerda con los sublinajes genéticos previamente la población colombiana (Rozo 2009; Ferro *et al.*, 2011; Nieto *et al.*, 2012; Cerezo *et al.*, 2012; Realpe *et al.*, 2014; Puerto *et al.*, 2015; Beltrán 2016; Castro *et al.*, 2017); sin embargo, cabe resaltar alto número de genotipos huérfanos registrados, debido a que evidencian la falta de estudios de genotipificación de TB a nivel nacional. Este comportamiento en cuanto a la similitud de genotipos posiblemente sea a causa de la interacción cultural y social que han tenido a través del tiempo las personas indígenas con las no indígenas, facilitando el flujo de microorganismo.

Genotipos de particular interés en salud pública nacional son los pertenecientes al sublinaje Beijing debido a su virulencia y su fuerte asociación con MDR e incluso XDR (Chen *et al.*, 2014; Álvarez *et al.*, 2016). Para el presente estudio, se registró circulación de dos genotipos Beijing-like, uno de ellos Beijin-like SIT 190 con perfil de sensibilidad MDR en población indígena del municipio de Buenaventura; zona del país donde ya existían reportes previos de circulación de este genotipo (Puerto *et al.*, 2015; Ferro *et al.*, 2011; Álvarez *et al.*, 2016, Murcia *et al.*, 2010). El segundo genotipo, Beijing-like SIT 406, fue sensible a fármacos antituberculosis de primera línea y representa el primer registro de circulación de este genotipo para el país, provenía del municipio de Tumaco; lo que indica que los genotipos pertenecientes al sublinaje Beijing, podrían estar distribuyéndose a nuevas zonas del país, a causa del flujo migratorio de personas con TB.

Por otra parte, éste estudio identificó 14 genotipos por *Spoligotyping* que no habían sido reportados previamente en población colombiana, siendo éstos LAM2 SIT 1691, T2 SIT 52, H3 SIT 418, H3 SIT 615, LAM2 SIT 179, LAM 6 SIT 1768, LAM9 SIT 1074, LAM9 SIT 1530, S SIT 1253, S SIT 1938, T1 SIT 278, T1 SIT 628, T1 (Tuscany Variant) SIT 159 y U SIT 1451 y 51 genotipos huérfanos (de 54 patrones encontrados) que no han sido reportados en la base de datos internacional SpolDB4 ni en estudios previos en Colombia (Rozo 2009; Ferro *et al.*, 2011; Nieto *et al.*, 2012; Cerezo *et al.*, 2012; Realpe *et al.*, 2014; Puerto *et al.*, 2015; Beltrán 2016; Castro *et al.*, 2017), estos nuevos registros podrían ser el reflejo del bajo número de estudios de caracterización molecular de TB realizados en

el país. Los anteriores genotipos podrían estar circulando exclusivamente en población indígena y sería importante profundizar en su estudio.

Solamente tres patrones huérfanos identificados por *Spoligotyping* en población indígena de Risaralda y Putumayo habían sido previamente descritos en Colombia, circulando en los departamentos de Putumayo, Cauca y Bogotá (Realpe *et al.*, 2014; Puerto *et al.*, 2015); es probable que la llegada de los genotipos de *M. tuberculosis* hacia la población indígena se haya dado debido a que los pueblos indígenas por factores sociales como el conflicto armado y búsqueda de mejoramiento en la calidad han migrado por diferentes departamentos del país (Idrovo *et al.*, 2004)

Analizando el dendrograma generado por la metodología de *Spoligotyping*, se evidenció que el 69,2% de los genotipos se encontraban agrupados, sugiriendo transmisión activa de la TB especialmente en los pueblos Wayúu, Emberá Chamí, U'wa y Awá. De igual forma, se debe tener en cuenta que el *Spoligotyping* usado como único método de genotipificación posee bajo poder de discriminación (Savine *et al.*, 2002), por lo que es probable que se sobreestime la frecuencia de transmisión; sin embargo es importante considerar el poder de discriminación que tuvo el *Spoligotyping* para este estudio (0,963).

Al analizar los agrupamientos generados a partir de metodología de MIRU-VNTR 24 loci se observa que disminuyó la agrupación de aislamientos al 3,4%, debido a su mayor poder de discriminación. Al combinar las dos metodologías (*Spoligotyping* y MIRU VNTR 24 loci) los aislamientos agrupados disminuyeron al 2,6; estos resultados sugieren que en el 97,4% de los casos de TB no hubo transmisión activa y que tal vez los eventos se debieron a procesos de reactivación endógena. A pesar de que este trabajo fue el primer estudio nacional en el que se caracterizan un número importante de aislamientos pertenecientes a población indígena de Colombia, cabe la pena resaltar que la naturaleza de los resultados, también pueden deberse al bajo número de aislamientos por pueblo indígena que se recolectaron por año, lo que no permitiría observar a fondo la dinámica de transmisión de la TB en cada pueblo indígena.

Por otra parte, el poder de discriminación de las técnicas de tipificación molecular empleadas en el estudio, al ser utilizadas por separado (*Spoligotyping*: 0,9635, MIRU-VNTR 24 loci: 0,99985) y al ser combinadas (*Spoligotyping* + MIRU-VNTR 24 loci:

0,99988), fue mayor a 0,95 en los tres casos, lo que indica que éstas técnicas permiten diferenciar entre aislamientos no relacionados (Hunter *et al.*, 1998); de igual forma, se puede evidenciar el poder de discriminación se incrementa directamente proporcional al número de muestras analizadas y al número de técnicas de genotipificación que se implementen como lo sugiere Barlow *et al.*, 2001; Rozo y Ribón 2010.

Otros estudios nacionales evidencian la misma situación como el realizado por Cerezo *et al.*, 2012 en 152 aislamientos provenientes de población bogotana, donde registró un HGDI para *Spoligotyping* de 0,897, MIRU 12 loci de 0,983 y *Spoligotyping* + MIRU 12 loci de 0,992. Rozo en el 2009 analizó el comportamiento de la TB en dos poblaciones de Cauca (n:85) y Cali (n:32), registró los siguientes HGDI respectivamente para las dos ciudades: *Spoligotyping* 0,8830 y 0,8481, MIRU 12 loci 0,9375 y 0,9515, *Spoligotyping* + MIRU 12 loci 0,9657 y 0,9677 (Rozo, 2009).

En relación a los cinco casos especiales de pacientes que aportaron dos muestras, el paciente 1 corresponde al caso confirmado de infección mixta de TB, definida como: “la infección con múltiples cepas de *M. tuberculosis* distinguibles por sus diferentes genotipos, dentro del mismo paciente antes, durante o después de un tratamiento exitoso” (Fang *et al.*, 2008). Las dos diferentes muestras clínicas del paciente (absceso cutáneo y jugo gástrico) se procesaron el mismo día, en el mismo centro médico, éstas presentaron diferente patrón genético mediante las metodologías de *Spoligotyping* y MIRU-VNTR 24 loci. Caso similar fue presentado por García *et al.*, donde aislamientos recuperados de diferentes muestras clínicas de un mismo paciente, evidenciaban patrón genético diferente, indicando que el paciente cursaba una infección mixta (García *et al.*, 2003).

Los casos de TB correspondientes a los pacientes 2, 3, 4 y 5, se clasificaron como posibles casos de infección mixta. Los patrones genéticos de los aislamientos de estos pacientes presentaron polimorfismos tanto por *Spoligotyping* o MIRU-VNTR 24 loci. Debido al tiempo en cual fueron recolectadas las dos muestras clínicas de cada uno de los pacientes, a partir de las cuales se recuperaron los aislamientos; es posible que éstos pacientes cursaran una infección mixta que no fue identificada en el primer aislamiento y posterior instauración del tratamiento para TB, afectó el establecimiento del primer aislamiento identificado, dando como resultado el establecimiento del segundo

aislamiento que se encontraba en el paciente. Richardson *et al.*, estudiaron pacientes a los cuales se les identificó infección mixta, y a los cuales se les realizó toma de muestras clínicas, al momento de diagnóstico, al iniciar tratamiento y días posteriores al inicio del tratamiento; evidenciando, que al día siguiente de iniciar el tratamiento para TB en uno de estos pacientes, uno de los dos aislamientos responsables de la infección, se eliminaba dejando un único aislamiento en el paciente (Richardson *et al.*, 2002)

Las recurrencias de TB producidas en ciudades de alta incidencia se atribuyen principalmente a reinfección. (Millet *et al.*, 2013); para el caso de los 5 pacientes anteriormente mencionados, estos habitaban departamentos con incidencias de TB superiores a la incidencia nacional (24 casos/100.000 habitantes). El paciente 2 provenía del departamento de Risaralda, con una incidencia de 45,5 casos/100.000 habitantes, el paciente 3 proveniente del departamento de Casanare con una incidencia de 26,5 casos/100.000 habitantes; el paciente 4 provenía del departamento de Norte de Santander con una incidencia de 27,5 casos/100.000 habitantes, el paciente 5 provenía del departamento de Risaralda, con una incidencia de 49,8 casos/100.000 habitantes y con altas tasas de TB fármaco resistente (INS, 2013; 2014 (a) y 2014 (b)).

En conclusión aunque una de las limitaciones de este estudio fue el bajo número de aislamientos analizados, es importante destacar que éste es el primer estudio nacional donde se caracterizan un número importante de aislamientos provenientes de población indígena colombiana y se hace el primer acercamiento a los genotipos de *M. tuberculosis* circulantes en este grupo poblacional. Los resultados de esta investigación son parte de la evidencia de la situación real del problema de TB en los pueblos indígenas de Colombia; este conocimiento permitirá a los tomadores de decisiones de política pública, orientar las acciones encaminadas hacia el fin de la epidemia de la TB, como lo establecen los lineamientos mundiales de la OMS para el año 2035.

8. Conclusiones y recomendaciones

8.1 Conclusiones

- ✓ Los genotipos identificados por *Spoligotyping* circulantes en población indígena son iguales a los que se han reportado previamente para la población colombiana no indígena siendo estos del sublinaje LAM, Haarlem y T. Se identificaron un número importante de genotipos que no se han reportado en el país y que posiblemente sean exclusivos de población indígena colombiana.
- ✓ Primer reporte para el país del genotipo Beijing-like SIT 406.
- ✓ Se identificó un posible caso de transmisión activa de TB en el pueblo indígena Camëntšá, a través del uso combinado de las metodologías de *Spoligotyping* y MIRU-VNTR 24 loci.
- ✓ Todos los casos de TB fueron causados por *M. tuberculosis*; no se identificaron aislamientos pertenecientes a otras especies del cMtb.
- ✓ Gracias a la implementación de dos técnicas de genotipificación se comprobó un caso de infección mixta y cuatro posibles casos de infección mixta por *M. tuberculosis* en población indígena de Colombia.
- ✓ Se identificaron 229 casos de TB provenientes de población indígena, los pueblos más afectados por esta enfermedad fueron Wayúu, Embera Chamí, Awa y Nasa Páez y U wa y los departamentos con mayor número de pacientes indígenas con TB fueron La Guajira, Nariño y Risaralda.

- ✓ El 97% de los casos de TB de la población indígena estudiada tuvieron presentación pulmonar, el 91% fueron sensibles a los fármacos antituberculosis, se encontró una alta proporción de TB en mujeres. Todos los casos de TB fueron causados por *M. tuberculosis*; no se identificaron aislamientos pertenecientes a otras especies del *cMtb*.

8.2 Recomendaciones

A partir del presente estudio es posible sugerir lo siguiente:

- ✓ Se sugiere realizar estudios sobre epidemiología molecular de TB específicos para cada uno de los pueblos indígenas de Colombia, teniendo en cuenta la diversidad cultural y social de cada uno de éstos..
- ✓ Se debe mejorar la calidad de la información consignada en las fichas de vigilancia de las micobacterias remitidas al INS, al igual que la articulación de los programas de TB y VIH en población indígena colombiana.
- ✓ Se debe incrementar el número de cultivos para *M. tuberculosis* que se realizan para diagnóstico de TB en población indígena, mediante la difusión y cumplimiento de la política pública (circular 058 de 2013, en la que se establece la implementación obligatoria de cultivo para población vulnerable incluyendo la población indígena).
- ✓ Es necesario fortalecer las acciones de promoción, prevención, diagnóstico, tratamiento, seguimiento y vigilancia de la TB en los departamentos con población indígena en Colombia.
- ✓ Es necesario ofrecer programas de protección social a la población indígena colombiana con el objetivo de mitigar los factores de riesgo asociados para el desarrollo de TB.

A. Anexo 1: Cebadores utilizados para metodología MIRU-VNTR 24 loci

MIRUs		Secuencia
Posición	Nombre	
154	MIRU 2	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT
580	MIRU 4	GCGCGAGAGCCCGAACTGC GCGCAGCAGAAACGCCAGC
960	MIRU 10	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGTACCT
1644	MIRU 16	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC
2059	MIRU 20	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG GGAGACCGCGACCAGGTAATTGTA
2531	MIRU 23	CTGTCGATGGCCGCAACAAAACG AGCTCAACGGTTTCGCCCTTTTGTC
2687	MIRU 24	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA
2996	MIRU 26	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG
3007	MIRU 27	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA
3192	MIRU 31	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT
4348	MIRU 39	CGCATCGACAACTGGAGCCAAAC CGGAAACGTCTAGCCCCACACAT
802	MIRU 40	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA

VNTRs		Secuencia
Posición	Nombre	
424	Mtub 04	CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT GGCAGCAGAGCCCGGATTCTTC
1955	Mtub 21	AGATCCCAGTTGTGTCGTGTC CAACATCGCCTGGTTCTGTA
2347	Mtub 29	GCCAGCCGCCGTGCATAAACCT AGCCACCCGGTGTGCTTGTATGAC
2401	Mtub 30	CTTGAAGCCCGGTCTCATCTGT ACTTGAACCCACGCCATTAGTA
3171	Mtub 34	GGTGCGCACCTGCTCCAGATAA GGCTCTATTGCTGGAGGTTGTAC
3690	Mtub 39	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC TAGAGCGGCACGGGGAAAGCTTAG
2165	ETRA	AAATCGGTCCCATCACCTTC CGAAGCCTGGGGTGCCCGGATTT
2461	ETRB	ATGGCCACCGATACCGCTTCAGT CGACGGGCATCTTGGATCAGCTAC
577	ETRC	CGAGAGTGGCAGTGGCGTTATCT AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA
4156	Qub4156	TGACCACGGATTGCTTAGT GCCGGCGTCCATGTT
2163b	Qub11b	CGTAAGGGGGATGCGGGAATA CGAAGTGAATGGTGGCAT
4052	Qub26	AACGCTCAGCTGTCCGAT CGGCCGTGCCGCGAGTCTCCCGAT

B. Anexo 2: Tabla de lectura utilizada para MIRU-VNTR 24 loci

Locus	MIRU 02	Mtub04	ETRC	MIRU 04	MIRU 40	MIRU 10	MIRU 16	Mtub21	MIRU 20	163b=QI	ETRA	Mtub29	Mtub30	ETRB	MIRU 23	MIRU 24	MIRU 26	MIRU 27	Mtub34	MIRU 31	Mtub39	QUB26	QUB4156	MIRU 39
Convention	154	424	577	580	802	960	1644	1955	2059	2163	2165	2347	2401	2461	2531	2687	2996	3007	3171	3192	3690	4052	4156	4348
Allele																								
0	402	537	171	175	354	482	585	116	437	67	195	335	252	347	150	395	285	498	326	492	272	153	563	540
1	455	588	208	252	408	537	618	149	514	136	270	392	305	404	200	447	336	551	380	545	330	264	622	593
2	508	639	266	329	462	590	671	206	591	205	345	449	363	461	253	501	387	604	434	598	388	375	681	646
3	561	690	324	406	516	643	724	263	668	274	420	506	421	518	306	555	438	657	488	651	446	486	740	699
4	614	741	382	483	570	696	777	320	745	343	495	563	479	575	359	609	489	710	542	704	504	597	799	752
5	667	792	440	560	624	749	830	377	822	412	570	620	537	632	412	663	540	763	596	757	562	708	858	805
6	720	843	498	637	678	802	883	434	899	481	645	677	595	689	465	717	591	816	650	810	620	819	917	858
7	773	894	556	714	732	855	936	491	976	550	720	734	653	746	518	771	642	869	704	863	678	930	976	911
8	826	945	614	791	786	908	989	548	1053	619	795	791	711	803	571	825	693	922	758	916	736	1041	1035	964
9	879	996	672	868	840	961	1042	605	1130	688	870	848	769	860	624	879	744	975	812	969	794	1152	1094	1017
10	932	1047	730	945	894	1014	1095	662	1207	757	945	905	827	917	677	933	795	1028	866	1022	852	1263	1153	1070
11	985	1098	788	1022	948	1067	1148	719	1284	826	1020	962	885	974	730	987	846	1081	920	1075	910	1374	1212	1123
12	1038	1149	846	1099	1002	1120	1201	776	1361	895	1095	1019	943	1031	783	1041	897	1134	974	1128	968	1485	1271	1176
13	1091	1200	904	1176	1056	1173	1254	833	1438	964	1170	1076	1001	1088	836	1095	948	1187	1028	1181	1026	1596	1330	1229
14	1144	1251	962	1253	1110	1226	1307	890	1515	1033	1245	1133	1059	1145	889	1149	999	1240	1082	1234	1084	1707	1389	1282
15	1197	1302	1020	1330	1164	1279	1360	947	1592	1102	1320	1190	1117	1202	942	1203	1050	1293	1136	1287	1142	1818	1448	1335

D. Anexo 4: Análisis bivariado de pueblos indígenas con sublinajes genéticos identificados mediante *Spoligotyping*.

a. Pueblos Indígenas con sublinaje genético T.

Pueblos indígenas	Sublinaje genético				Tota	P*
	T					
	SI	%	NO	%		
Motilon Barí	5	62,50	3	37,5	8	0,002
Emberá chamí	2	7,14	26	92,86	28	1,000
Wayúu	2	6,67	28	93,33	30	Ref
Awá	2	11,11	16	88,89	18	0,624
Caméntśá	1	33,33	2	66,67	3	0,256
Inga	1	33,33	2	66,67	3	0,256
Nasa Páez	1	6,67	14	93,33	15	1,000
Tikuna	1	16,67	5	83,33	6	0,431

*Prueba de significancia: Fisher exact. Nivel de confianza para las dos pruebas 95%

b. Pueblos Indígenas con sublinaje genético U

Pueblos indígenas	Sublinaje genético				Total	p*
	U					
	SI	%	NO	%		
Wounaan	4	50	4	50	8	0,014
Emberá chamí	2	7,14	26	92,86	28	Ref
Awá	1	5,56	17	94,44	18	1,000
Kogui	1	33,33	2	66,67	3	0,271

*Prueba de significancia: Fisher exact. Nivel de confianza para las dos pruebas 95%

c. Pueblos Indígenas con sublinaje genético LAM.

Pueblos indígenas	Sublinaje genético				Total	p*
	LAM					
	SI	%	NO	%		
Wayúu	18	60	12	40	30	Ref
Emberá chamí	10	35,71	18	64,29	28	0,064**
Nasa Páez	6	40	9	60	15	0,205**
Emberá Katío	5	71,43	2	28,57	7	0,687
U wa	5	38,46	8	61,54	13	0,193**
Guahibo	4	80	1	20	5	0,630
Amorúa	2	66,67	1	33,33	3	1,000
Awá	2	11,11	16	88,89	18	0,001
Guayabero	2	66,67	1	33,33	3	1,000
Hitnu	2	100	0	0	2	0,516
Kogui	2	66,67	1	33,33	3	1,000
Panare	2	66,67	1	33,33	3	1,000
Sikuani	2	50	2	50	4	1,000
Wounaan	2	25	6	75	8	1,000
Yukpa	2	66,67	1	33,33	3	1,000
Zenú	2	66,67	1	33,33	3	1,000
Arhuaco	1	12,50	7	87,50	8	0,042
Cubeo	1	33,33	2	66,67	3	0,531
Desano	1	100	0	0	1	0,299
Emberá	1	25	3	75	4	1,000
Ennaka	1	100	0	0	1	1,000
Guambiano	1	100	0	0	1	1,000
Kogui-Malayo- Arhuaco	1	50	1	50	2	1,000
Pastos	1	50	1	50	2	1,000
Quillacinga	1	100	0	0	1	1,000
Siona	1	50	1	50	2	1,000

*Prueba de significancia: Fisher exact **Prueba de significancia: Chi cuadrado, Nivel de confianza para las dos pruebas 95%

d. Pueblos Indígenas con sublinaje genético S.

Pueblos indígenas	Sublinaje genético				Total	p*
	S					
	SI	%	NO	%		
Awá	3	16,67	15	83,33	18	0,141
Arhuaco	1	12,50	7	87,50	8	0,381
Emberá	1	25	3	75	4	0,225
Wayúu	1	3,33	29	96,67	30	Ref

*Prueba de significancia: Fisher exact. Nivel de confianza para las dos pruebas 95%

e. Pueblos Indígenas con sublinaje genético Harleem.

Pueblos indígenas	Sublinaje genético				Total	p*
	Harleem					
	SI	%	NO	%		
Emberá chamí	7	25	21	75	28	0,074
Arhuaco	4	50	4	50	8	0,012
Awá	4	22,22	14	77,28	18	0,179
U wa	4	30,77	9	69,23	13	0,057
Camëntšá	2	66,67	1	33,33	3	0,033
Nasa Páez	2	13,33	13	86,67	15	0,591
Tucano	2	50	2	50	4	0,059
Wayúu	2	6,67	28	93,33	30	Ref
Inga	1	25	3	75	4	0,321
Kankuamo	1	100	0	0	1	0,097
Mokana	1	100	0	0	1	0,097
Nukak Makú	1	25	3	75	4	0,321
Tikuna	1	16,67	5	83,33	6	0,431
Yuco	1	100	0	0	1	0,097

*Prueba de significancia: Fisher exact. Nivel de confianza para las dos pruebas 95%

f. Pueblos Indígenas con sublinaje genético Beijing

Pueblos indígenas	Sublinaje genético				Total	p*
	Beijing					
	SI	%	NO	%		
Inga	1	25,00	3	75,00	4	1,000
Wounaan	1	12,50	7	87,50	8	Ref

*Prueba de significancia: Fisher exact. Nivel de confianza para las dos pruebas 95%

g. Pueblos Indígenas con sublinaje genético X.

Pueblos indígenas	Sublinaje genético				Total	p*
	X					
	SI	%	NO	%		
Emberá chamí	2	7,14	26	92,86	28	Ref
Nasa Páez	2	13,33	13	86,67	15	0,602
Tikuna	1	16,67	5	83,33	6	0,452

*Prueba de significancia: Fisher exact. Nivel de confianza para las dos pruebas 95%

E. Glosario

- **ALELO:** Forma alternativa de un gen.
- **DR:** Direct Repeat Locus presente en el genoma de los miembros del *cMtb*, consistente en regiones conservadas de 36 pb y regiones intercaladas que varían entre 34 y 41pb.
- **GENOTIPO:** Conjunto de genes característicos de una especie.
- **GENOTIPIFICACIÓN:** Determinación de las características genéticas de un organismo.
- **HAARLEM:** Sublinaje genético de cepas del *cMtb*, que pertenece al linaje Euro-americano.
- **LAM:** Sublinaje genético de cepas del *cMtb*, que pertenece al linaje Euro-americano.
- **PATRÓN HUÉRFANO:** Aislamiento cuyo genotipo no se encuentra registrado en la base de datos mundial SpolDB4.
- **PUEBLO INDÍGENA:** Grupo de personas que han habitado zonas antes de la conquista por los colonos.
- **SPOLIGOTYPING:** Técnica molecular utilizada para genotipificación de los miembros del *cMtb* mediante la caracterización del polimorfismo del locus DR.
- **TB-MDR:** Tuberculosis causada por cepas de *M. tuberculosis* resistentes a isoniácida y rifampicina.

- **TB-XDR:** Tuberculosis causada por cepas de *M. tuberculosis* MDR con resistencia adicional a una fluoroquinolona y al menos uno de tres fármacos inyectables.
-

Bibliografía

ÁLVAREZ, N., HAFT, D., HURTADO, U.A., ROBLEDO, J., ROUZAUD, F. 2016. Whole-Genome Sequence of a Beijing Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolate from Buenaventura, Colombia. En: *American Society for Microbiology*. vol. 4, no. 1, p. 1-2.

AMUKOYE, E. 2008. Multi drug resistant tuberculosis: a challenge in the management of tuberculosis. En: *African Journal of Health Sciences*. vol. 15, no 1, p. 6-13.

AVENDAÑO, R. 2008. La inseguridad rural en el territorio de la etnia guajira o wayúu. En: *Revista historia*. p.121 -126.

BARLOW, R., GASCOYNE-BINZI, D., GILLESPIE, S., DICKENS, A., QAMER, S., HAWKEY, P. 2001. Comparison of variable number tandem repeat and IS6110-restriction fragment length polymorphism analyses for discrimination of high- and low-copy-number IS6110 *Mycobacterium tuberculosis* isolates. En: *J Clin Microbiol*. vol. 39, no. 7, p. 2453-2457.

BARNES, F., CAVE, D. 2003. Molecular Epidemiology of Tuberculosis. En: *New England Journal of Medicine*. vol. 349, p. 1149-156.

BELTRÁN, M. Genotipificación de *Mycobacterium tuberculosis* en aislados clínicos obtenidos de pacientes VIH positivos de los Hospitales Simón Bolívar y Santa Clara de Bogotá. Trabajo de grado Maestría. Universidad Nacional de Colombia. 2016.

BISBICÚS, G., PAÍ, J., PAÍ, R. 2010. Comunicación con los espíritus de la naturaleza para la cacería, pesca, protección, siembra y cosecha en el pueblo indígena Awá de Nariño. En: *Programa somos defensores*. p. 90

BRUDEY, K., DRISCOLL, J.R., RIGOUTS, L., PRODINGER, W.M., GORI, A., AL-HAJOJ, S.A., *et al.*, 2006. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. En: *BMC Microbiol.* 6, 23

BURGOS, M.V., MÉNDEZ, J.C., RIBÓN, W. 2004. Molecular epidemiology of tuberculosis: methodology and applications. En: *Biomédica*. vol. 1, p. 188-201.

CAMINERO, J., CASAL, M., AUSINA, M., PINA, J. SAURETJ, S.A. 2014. Diagnóstico de la tuberculosis. En línea: <http://www.ops.org.bo/itb19141.pdf>. [Accesado: Noviembre de 2015].

CARDONA, J.A., HERNÁNDEZ, A.M. 2013. Conocimientos, actitudes y prácticas sobre tuberculosis en indígenas zenúes y habitantes de una zona rural colombiana. En: *Revista de Ciencias de la Salud*. vol. 11, no. 2, p. 159-173.

Castro, C., Ricardo, A., Zabaleta, A., Llerena, C., & Puerto, G. (2017). Characterization of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from HIV positive individuals in Colombia, 2012. En: *Biomédica*, 37(1), 86-95.

CDC. Core curriculum on tuberculosis: What the clinician should know. 2013 Sixth edition.

CEREZO, I., JIMÉNEZ, Y., HERNÁNDEZ, J., ZOZIO, T., MURCIA, M.I., RASTOGI, N. 2012. A first insight on the population structure of *Mycobacterium*

tuberculosis complex as studied by *Spoligotyping* and MIRU-VNTRs in Bogotá, Colombia. En: *Infection, Genetics and Evolution.*, vol. 12, no. 4, p. 657-663.

CHEN, Y., CHANG, J., HUANG, W., KUO, S., YEH, J., LEE, J., JANG, CH., SUN, J., CHIUEH, T., SU, I., DOU, H. 2014. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in aboriginal peoples of Taiwan, 2006 -2011. En: *Journal of Infection.*vol. 68. p. 332-337.

COLOMBIA. MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL. Circular Externa 000058 (11, Septiembre, 2009). Lineamientos para el manejo programático de la tuberculosis y lepra en Colombia. Bogotá D.C.: El Ministerio de la Protección Social, 2009. 4 p.

CORTÉS, E. Descripción de técnicas fenotípicas y moleculares para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* y micobacterias atípicas en el laboratorio clínico. Trabajo de Grado en Bacteriología. Colombia.: Pontificia Universidad Javeriana. 2009, 114 p.

CULQUI, D., TRUJILLO, O., CUEVA, N., AYLAS, R., SALAVERRY, O., BONILLA, C. 2010. Tuberculosis en la población indígena de Perú 2008. En: *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* vol. 1, no.1 p. 8-15.

DANE. La visibilización estadística de los grupos étnicos colombianos. 2005. En Línea: http://www.dane.gov.co/visibilidad_estadistica_etnicos.pdf. [Accesado: Febrero de 2016]

DANE. Colombia una Nacional Multicultural: Su diversidad étnica. 2007. En línea: http://www.dane.gov.co/files/censo2005/etnia/sys/colombia_nacion.pdf. [Accesado: Marzo de 2016]

DE PINHO, T., DA COSTA, A., SOUZA, R., CESAR, P. 2012. Spatial and temporal distribution of tuberculosis in indigenous and non-indigenous of Rondônia State, Western Amazon, Brazil. En: *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro*. vol. 28. no. 2. p. 267-280.

DÍAZ, R. 2014. Métodos de profilaxis wayuu asociados a la tuberculosis. Significados y funciones. En: *Opción, Año 30*. Vol. 73. p. 135-151.

DORRONSORO, I., TORROBA, L. 2007. Microbiología de la tuberculosis. En: *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. vol. 30, p. 67-84.

DYE C, WILLIAMS BG. 2010. The population dynamics and control of tuberculosis. En: *Science*. vol. 328, p. 856–861.

FANG, R., LI, X., WU. J., SHEN, X., XIAOHONG, G., DERIEMER, K., LIU, L., MEI, J., GAO, Q. 2008. Mixed infections of *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients in Shanghai, China. En: *Tuberculosis*. vol. 88. p. 469-473.

FERRO, B., NIETO, L.M., ROZO, J.C., FORERO, L., VAN-SOOLINGEN, D. 2011. Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*, Southwestern Colombia. En: *Emerging Infectious Diseases*. vol. 17, no. 7, p. 1259-1262.

GARCÍA DE VIEDMA, D., MARÍN, M., RUIZ SERRANO, M. J., ALCALÁ, L., & BOUZA, E. 2003. Polyclonal and compartmentalized infection by *Mycobacterium tuberculosis* in patients with both respiratory and extrapulmonary involvement. En: *The Journal of infectious diseases*, 187(4), 695-699.

GARZÓN, M.C., ANGEE, D.Y., LLERENA, C., ORJUELA, D., VICTORIA, J.E. 2008. Vigilancia de la resistencia del *Mycobacterium tuberculosis* a los

fármacos antituberculosos, Colombia 2004-2005. En: *Biomédica*. vol. 28, no. 3, p. 319-326.

GAVA, C., MALACARNE, J., GIRALDO, D., SANT, C., BASTOS, L., BASTA, P. 2013. Tuberculosis in indigenous children in hte Brazilian Amazon. En: *Rev. Saúde Pública*. vol. 47, no. 1, p. 77-85.

GAVIRIA, M., HENAO, H., MARTÍNEZ. T., BERNAL, E. 2010. Papel del personal de salud en el diagnóstico tardío de la tuberculosis pulmonar en adultos de Medellín, Colombia. En: *Rev Panam Salud Pública*. vol. 27, no. 2, p.83-92

GORI, A., BANDERA, A., MARCHETTI, G., DEGLI, A., CATOZZI, L., PIERO, G., GAZZOLA, L., FERRARIO, G., VAN-EMBDEN. J., VAN-SOOLIGEN, D., MORONI, M., FRANZETTI, F. 2005. *Spoligotyping and Mycobacterium tuberculosis*. En: *Emerging Infectious Diseases*. vol. 11, no. 8, p.1242-1248.

HERNÁNDEZ, J., DÁVILA, V., MARTÍNEZ, L., RESTREPO, L., GRAJALES, N., TORO, A., ARANGO, V., VARGAS, N., ESTRADA, M., LOPERA, J., GARCÍA, J., N., RESTREPO, L., MEJÍA, G., ZAPATA, E., GÓMEZ, V., LOPERA, D., DOMINICÓ, J., ROBLEDO, J. 2013. Tuberculosis in Indigenous Communities of Antioquia, Colombia: Epidemiology and Beliefs. En: *J Immigrant Minority Health*. vol. 15. p. 10-16.

HERRERA, T., TORRES, M., JUÁREZ, E., SADA, E. 2005. Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana. En: *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. vol. 18, no. 4.

HUNTER, P.R., GASTON, M.A. 1998. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. En: *Journal of Clinical Microbiology*. vol. 26, no. 11, p. 2465-2466.

IDROVO, A. 2004. Raíces históricas, sociales y epidemiológicas de la tuberculosis en Bogotá, Colombia. *En: Biomédica*. vol. 24. p. 356-365

IIDH. Instituto Interamericano de Derechos Humanos. 2006. Campaña educativa sobre derechos humanos y derechos indígenas. Salud indígena y derechos humanos. En Línea: <https://www.iidh.ed.cr/IIDH/media/2089/educativa-salud-indigena-2008.pdf>. [Accesado: Noviembre 2015]

INDEPAZ. 2009. Situación de los pueblos indígenas de Colombia. En: *Konrad Adenauer Stiftung*. papers N°4.

INS. 2009. Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Comportamiento de la notificación de Tuberculosis, Colombia Semana 1-52 de 2009. En Línea: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiologico/Tuberculosis%202009.pdf>. [Accesado: Marzo. 2016].

INS. 2010. Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Informe de evento. Comportamiento De La Notificación De Tuberculosis Colombia, Semana 1- 52 De 2010.Periodo 13. 2010. En Línea: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiologico/Tuberculosis%202010.pdf>. [Accesado: Marzo. 2016].

INS. 2011. Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Informe de evento. Comportamiento De La Notificación De Tuberculosis Colombia, Semana 1- 52 De 2011.Periodo 13- Cierre. En Línea: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiologico/Tuberculosis%202011.pdf>. [Accesado: Marzo. 2016].

INS. 2012. Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Informe de evento. Informe Del Evento Tuberculosis, Hasta El Periodo Epidemiológico 13 Del Año 2012 - Cierre. En Línea: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiologico/TUBERCULOSIS%202012.pdf> [Accesado: Marzo. 2016].

INS. 2013. Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Informe de evento. Informe Del Evento Tuberculosis Año 2013. En Línea: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiologico/TUBERCULOSIS%202013.pdf>. [Accesado: Marzo. 2016].

INS. 2014**(a)**. Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Informe de evento. Informe Final Tuberculosis, Colombia, 2014. En Línea: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiologico/Tuberculosis%202014.pdf>. [Accesado: Marzo. 2016].

INS. 2014**(b)**. Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Informe de evento. Informe Final Tuberculosis Farmacorresistente Colombia, 2014. En Línea: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20EpidemiologicoTuberculosis%20farmacorresistente%202014.pdf> [Accesado: Marzo. 2016].

INS. 2015. Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Informe Final Del Evento Tuberculosis, Colombia, 2015. En Línea: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiologico/Tuberculosis%202015.pdf> [Accesado: Marzo. 2016].

KAMERBEEK, J., SCHOULDS, L., KOLK, A., VAN-AGTERVELD, M., VAN-SOOLIGEN, D., KUIJPER, S., BUNSCHOTEN, A., MOLHUIZEN, H., SHAW, R.,

GOYAL, M., VAN-EMBDEN, J. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. En: *Journal of Clinical Microbiology*. vol. 35, no. 4, p. 907-914.

KENT, T.P., KUBICA, G.P. 1985. Public health mycobacteriology, a guide for the level III. Atlanta Centers for Disease Control. En Línea: <http://wonder.cdc.gov.asp>. [Accesado: Diciembre 2015].

LAWN, S.D., ZUMLA, A.I. 2011. Tuberculosis. En: *The Lancet*. vol. 378, p. 57-72.

MARRAFFINI, L., SONTHEIMER, E. 2010. CRISPR interference: RNA-directed adaptativw immunity in bacteria and archaeae. En: *Nature review Genetics*. Vol. 11

MATHEMA, B., KUREPINA, N. E., BIFANI, P. J., & KREISWIRTH, B. N. 2006. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. En: *Clinical microbiology reviews*, 19(4), 658-685.

MEDEL, B., CASTELLANOS, M., GARCÍA, M., MARTÍNEZ, R., DECROO, T., ZACHARIAH, R. 2016. Tuberculosis among indigenous municipalities in Mexico: analysis of case notification and treatment outcomes between 2009 and 2013. En: *Rev Panam Salud Publica*. vol. 39. no. 1. p. 32-37

MILLET, J., SHAW, E., ORCAU, A., CASALS. M., MIRO. J., CAYLA. J., THE BARCELONA TUBERCULOSIS RECURRENCE WORKING GROUP. 2013. Tuberculosis recurrence after completion treatment in a European city: Reinfection or relapse?. En: *Plos One*. vol. 8, p. e64898.

MINISTERIO DE CULTURA, REPÚBLICA DE COLOMBIA. 2010. Nasa (Páez), la gente del agua. En Línea: <http://www.mincultura.gov.co/areas/poblaciones/noticias/Documents/Caracterizaci%C3%B3n%20del%20pueblo%20Nasa.pdf>. [Accesado: Agosto 2016]

MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL, INSTITUTO NACIONAL DE SALUD, ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD. 2009. Plan Estratégico Colombia Libre de Tuberculosis 2010-2015: Para la Expansión y Fortalecimiento de la Estrategia Alto a la TB. p. 64 (ISBN 978-958-8472-09-6)

MONRAD, S., BEAUDEAU, F., CABARET, J. 2010. New Frontiers of Molecular Epidemiology of Infectious Diseases. ISBN 978-94-007-2114-2

MORA, E., PÁEZ, H., QUIÑÓNEZ, W., LÓPEZ, M. 2007. Mujer, salud y tradición en los U'wa de Colombia y cuestiones de género en las comunidades indígenas. En: *Feminismo/s*. p. 49-68.

MORÁN, M., ACEVES, D., PEÑA, P., GALLEGOS, M., FLORES, S., MONTOYA, H., FIGUERA, L., VILLA, M., SÁNCHEZ, J. 2000. Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en una población seleccionada del noroccidente de México. En: *Revista Panamericana de Salud Pública*. vol. 7, no. 6, p. 1-6.

MURCIA, M.I., MANOTAS, M., JIMÉNEZ, Y.J., HERNÁNDEZ, J., CEREZO-CORTÉS, M.I, LÓPEZ, L., ZOZIO, T., RASTOGI, N. 2010. First case of multidrug-resistant tuberculosis caused by a rare "Beijing-like". En: *Infection, Genetics and Evolution*. vol. 10, no. 5, p. 678-681.

NIETO, L., FERRO, B., VILLEGAS, S., MEHAFFY, C., FORERO, L., MOREIRA, C., RASTOGI, N., VAN SOOLIGEN, 2012. Characterization of

Extensively Drug-Resistant Tuberculosis Cases from Valle del Cauca, Colombia. En: *Journal of Clinical Microbiology* vol. 50, no. 12. p. 4185–4187

OBSERVATORIO DE DERECHOS HUMANOS y DIH. 2010. Diagnóstico de la situación del pueblo indígena Nasa o Páez. En Línea: http://historico.derechoshumanos.gov.co/Observatorio/Documents/2010/DiagnosticoIndigenas/Diagnostico_NASA-P%C3%81EZ.pdf. [Accesado: Agosto 2016].

OPS/OMS. Ministerio de la Protección Social de Colombia. Instituto Nacional de Salud. Agencia Canadiense para el Desarrollo Internacional. 2007. Tuberculosis en los pueblos indígenas de Colombia: el reto de la prevención y el control. Bogotá, Colombia. En línea: http://www.paho.org/col/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=publicaciones-ops-oms-colombia&alias=35-tuberculosis-en-los-pueblos-indigenas-de-colombia&Itemid=688

OPS, OMS, Ministerio de la Protección Social de Colombia, Instituto Nacional de Salud. 2007. Plan Estratégico: Colombia libre de Tuberculosis 2010-2015. Para la Expansión y el Fortalecimiento de la Estrategia Alto a la TB. Colombia. Tuberculosis en los pueblos indígenas de Colombia: el reto de la prevención y el control. En Línea: http://www.paho.org/col/index.php?option=com_content&view=article&id=245:tuberculosis-en-los-pueblos-indigenas-de-colombia-el. [Accesado: Enero 2016].

OPS. Manual para el manejo bacteriológico de la tuberculosis. Parte 1: Baciloscopia. 2008 **(a)**. En Línea: <http://files.sld.cu/tuberculosis/files/2009/12/tb-labs-baciloscopia1.pdf>. [Accesado: Febrero 2016].

OPS. Manual para el manejo bacteriológico de la tuberculosis. Parte 2: Cultivo. 2008 **(b)**. En Línea: [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/tuberculosis/tb-labs-cultivo\[2\].pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/tuberculosis/tb-labs-cultivo[2].pdf). [Accesado: Febrero 2016].

OSHI, D., OSHI, S., ALOBU, I., UKWAJA, K. Gender-Related Factors Influencing Women's Health Seeking For Tuberculosis Care In Ebonyi State, Nigeria. En: *Journal of Biosocial Science*. 2016. vol. 48, no. 1, p. 37- 50.

PALOMINO, J., CARDOSO, S., RITACO, V. Tuberculosis 2007 From basic science to patient care. First Edition. En Línea: <http://www.pneumonia.ro/student/tuberculosis2007.pdf>. [Accesado: Noviembre 2015].

PNUD. 2012. Pueblos indígenas. Diálogo entre culturas. Cuaderno del Informe de Desarrollo Humano de Colombia. En: *INHD*. ISBN 978-958-8758-08-04

PUERTO, G., CASTRO, C., RIBÓN, W. 2007. Reacción en cadena de la polimerasa: una contribución para el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar y de las micobacteriosis. En: *Infectio.*, vol. 11, no. 2.

PUERTO, G., ERAZO, L., WINTACO, M., CASTRO, C., RIBÓN, W., GUERRRERO, M.I. 2015. *Mycobacterium tuberculosis* genotypes determined by *Spoligotyping* to be circulating in Colombia between 1999 and 2012 and their possible associations with transmission and susceptibility to first-line drugs. En: *PlosOne*. vol. 10, no. 6.

RAMAKRISHNAN, L. 2012. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. En: *Nature Reviews Immunology*. vol. 12, no. 5, p. 352-366.

REALPE, T., CORREA, N., ROZO, J., FERRO, B., GÓMEZ, V., ZAPATA, E., RIBON, W., PUERTO, G., CASTRO, C., NIETO, L., DÍAZ, M., RIVERA, O., RASTOGI, N., ARBELAEZ, M., ROBLEDO, J. 2014. Population Structure among

Mycobacterium tuberculosis Isolates from Pulmonary Tuberculosis Patients in Colombia. En: *PlosOne*. Vol. 9

RIBEIRO, M., DALLA. L., SILVA. S. 2014. Factores asociados el diagnóstico precoz y tardío de la tuberculosis: Estudio descriptivo. En: *OBJN*. vol. 13 no. 1, p. 62-71.

RICHARDSON, M., CARROLL, N. M., ENGELKE, E., VAN DER SPUIY, G. D., SALKER, F., MUNCH, Z., ... & VAN HELDEN, P. D. 2002. Multiple *Mycobacterium tuberculosis* strains in early cultures from patients in a high-incidence community setting. En: *Journal of clinical microbiology*, 40(8), 2750-2754.

RODRÍGUEZ, D., VERDONCK, K., BISSELL, K., VICTORIA, J., KHOGALI, M., MARÍN, D., MORENO, E. 2016. Monitoring delays in diagnosis of pulmonary tuberculosis in eight cities in Colombia. En: *Rev Panam Salud Public*. vol. 39, no. 1. p. 12-18.

ROETZER, A., SCHUBACK, S., DIEL, R., GASAU, F., UBBEN, T., NAUTA, A., RICHTER, E., RUCH, S., NIEMANN, S. 2011. Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* Typing Methods in a 4-Year Study in Schleswig-Holstein, Northern Germany. En: *Journal Of Clinical Microbiology*. vol. 45, no 12, p.4173-4178.

ROZO, J. Diversidad genética de los aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* y su contribución en la incidencia de la tuberculosis en las poblaciones de Cali y Cauca. Trabajo de grado Maestría en Biología Molecular y Biotecnología. Bogotá D.C. Universidad de Pamplona. 2009. 178 p.

ROZO, J., RIBÓN, W. 2010. Molecular tools for *Mycobacterium tuberculosis* genotyping. En: *Rev. salud pública*. vol. 12, no. 3, p. 510 – 521.

RUMICHE, J., HERNÁNDEZ, E., MONTES, L., GAMARRA, G., CARLOS, N., ARIAS, G., SORIA, R., ACOSTA, E., AURAZO, A. 2003. Detección de casos de tuberculosis del colegio nacional “Jorge Basadre Grohmann” del P.J El independiente, EL agustino – Lima Perú. En: *Ciencia e investigación*. vol. 1. No. 2. p. 37-42.

SHABBEER, A., OZCAGLAR, C., YENER, B., BENNETT, K. 2012. Web tools for molecular epidemiology of tuberculosis. En: *Genetics and Evolution*. vol. 12, p. 767–781.

SAVINE, E., WARREN, R., VAN DER SPUY, G., BEYERS, N., VAN HELDEN, P., LOCHT, C., SUPPLY, P. 2002. Stability of Variable-Number Tandem Repeats of Mycobacterial Interspersed Repetitive Units from 12 Loci in Serial Isolates of Mycobacterium tuberculosis. En: *journal of clinical microbiology*. vol. 40. no. 12. P. 4561 – 4566.

SDP. Secretaria Departamental de Planeación. 2005. Caracterización de la población indígena que reside en el Distrito Capital según el censo de población 2005. En Línea: [http://www.sdp.gov.co/portal/page/portal/PortalSDP/Seguimiento Políticas/Políticas%20Poblacionales/pueblosIndigenas/Tab2/Caracterizaci%F3n%20Poblaci%F3n%20Ind%EDgena.%20Base%20Censo%202005.pdf](http://www.sdp.gov.co/portal/page/portal/PortalSDP/SeguimientoPolíticas/Políticas%20Poblacionales/pueblosIndigenas/Tab2/Caracterizaci%F3n%20Poblaci%F3n%20Ind%EDgena.%20Base%20Censo%202005.pdf). [Accesado: Marzo. 2016].

SIEDER, R., SIERRA, M. Acceso a la justicia para las mujeres indígenas en América Latina. 2011. En Línea: <http://www.cmi.no/publications/file/3941-acceso-a-la-justicia-para-las-mujeres-indigenas-en.pdf>. [Accesado: Junio. 2016].

SOLA, C. 2015. Clustred regular interspersed short palindromic repeats (CRISPR) genetic diversity studies as a mean to reconstruct evolution of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. En: *Tuberculosis*. Vol. 95, p. s159 – s166.

STEPHENS, C., PORTER, J., NETTLETON, C., WILLIS, R. 2006. Disappearing, displaced, and undervalued: a call to action for Indigenous health worldwide. En: *The Lancet*. vol. 367, no. 9527, p. 2019-2028.

SUPPLY, P., LESJEAN, E., SAVINE, K., KREMER, K., VAN-SOOLINGEN, D., LOCHT, C. 1997. Identification of novel intergenic repetitive units in a *Mycobacterial* two component system operon. En: *Molecular Microbiology*. vol. 26, no. 5, p. 991-1003.

SUPPLY, P., MAZARS, E., LESJEAN, S., VINCENT, V., GICQUEL, B., LOCHT, C. 2000. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. En: *Molecular Microbiology*. vol. 36, no. 3, p. 762-771.

SUPPLY, P., ALLIX, C., LESJEAN, S., CARDOSO-OELEMANN, M., RÛSCH-GERDES, S., WILLERY, E. 2001. *Spoligotyping*, a PCR-based method to simultaneously detect and type *Mycobacterium tuberculosis complex* bacteria. En Línea: <http://www.molecular-tb.org/gb/pdf/protocols/SpoligoManual.pdf>. [Accesado: Noviembre 2015]

TORTOLI, E. 2014. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. En: *Clinical Microbiology Reviews*. vol 27, no. 4, p. 727–752.

UNICEF. 2009. Los pueblos indígenas en Colombia: derechos, políticas y desafíos. © Unicef, Oficina De Área Para Colombia y Venezuela Bogotá, D.C., Colombia. p. 81.

VAN EMBDEN, J.D., CRAWFORD, J.T., *et al.* 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recomendations for a standarized methodology. En: *Journal of Clinical Microbiology*. vol. 31, no. 2, p. 406-409

VAN SOOLINGEN D, DE HAAS PE, KREMER K. 2001. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of mycobacteria. En: *Methods in Molecular Medicine*. vol. 54, p. 165-203.

WARREN, R., VICTOR, T., STREICHER, E., RICHARDSON, M., BEYERS, N., VAN-PITTIUS, N., VAN-HELDEN, P. 2004. Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. En: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. vol. 169, no. 5, p. 610–614.

WHO. Tuberculosis Laboratory Biosafety Manual. 2012. En Linea: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77949/1/9789241504638_eng.pdf. [Accesado: Noviembre 2015].

WHO. Global Tuberculosis report. 2013. Francia. p. 306. (ISBN 978 92 4 156465 6).

WHO. Global Tuberculosis report. 2014. Francia. p. 171 (ISBN 978 92 4 156480 9).

g

WHO. Global Tuberculosis report. 2015a. Francia. p. 204. (ISBN 978 92 4 156505 9)

WHO. 2015b. The end TB strategy. Geneva. p. 20. En línea: http://www.who.int/tb/End_TB_brochure.pdf?ua=1 (accesado Marzo 2016)

WHO. 2015c. Implementing tuberculosis diagnostics. Geneva. p. 47. (ISBN 978 92 4 150861 2)

ZAMANI, S., AFLAKI, M., FOOLAPI, A., DARBAN, D., BAMERI, Z., KHAZAEI, M., MEHDI, M. 2013. MIRU-VNTR analysis of the *Mycobacterium*

tuberculosis isolates from three provinces of Iran. En: *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. vol 45, p. 124-130.

ZHANG, Q., WAN, B., ZHOU, A., NI, J., XU, Z., *et al.* 2016. Whole genome analysis of an MDR Beijing/W strain of *Mycobacterium tuberculosis* with large genomic deletions associated with resistance to isoniazid. En: *Gene*. vol. 582, no. 2, p. 128-136.